



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Físico-Química

Tese de Doutorado



1150055820



IQ
T/UNICAMP Sh68L

**Liberação térmica e fotoquímica de
óxido nítrico a partir de S-nitrosotióis
incorporados em matrizes de
poli(etileno glicol) e em hidrogel de
copolímero em bloco PEO-PPO-PEO**

Autora: Sílvia Mika Shishido

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de
Oliveira

Abril/03

UNIDADE	IQ
Nº CHAMADA	111
V	EX
TOMBO BC	55820
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 1.100
DATA	17/09/03
Nº CDN	

CM00189081-4

510.0 300307

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Sh68I

Shishido, Silvia Mika

Liberação térmica e fotoquímica de óxido nítrico a partir de S-nitrosotióis incorporados em matrizes de poli(etileno glicol) e em hidrogel de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO / Silvia Mika Shishido. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Óxido nítrico. 2. S-nitrosotióis. 3. Poli(etileno glicol). I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Aos meus pais,
Masaoki e Maria
e meus irmãos
Miwa e Massaki

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Marcelo pela orientação, paciência, consideração e bom humor.

Ao professor Watson Loh pelas conversas produtivas durante o desenvolvimento do trabalho de colaboração.

À professora Marta Helena Krieger pelo otimismo, pela confiança e pelas perspectivas de trabalhos futuros.

Ao pessoal do laboratório I-114 e do laboratório 04 do Departamento de Fisiologia e Biofísica do IB: Melissa, Rodrigo, Amedea, Laís, Priscilla, Evandro, Nara, prof. Edvaldo Sabadini, Fernanda, Vanessa, Ritinha, Josias, Luciana, Rogério, Eduardo, Marlus (EQ/UNICAMP), Kelly, Zé e Leandro pela amizade.

À Cláudia Martelli pela atenção e colaboração.

À Profa. Tereza D. Z. Atvarz pelo empréstimo da lâmpada de vapor de Hg.

Ao Prof. Celso Davanzo e à Márcia pela ajuda com o Nicolet.

Ao professor Franck Quina e o doutorando Paulo Moreira da USP/SP, aos professores Miguel G. Neumann e Marcelo H. Gehelen e a técnica Carla. C. S. Cavalheiro do IQ-USP/SC pelo auxílio com as medidas de fotólise de pulso.

Ao professor Nelson H. Morgon pelo auxílio com as equações cinéticas e as conversas produtivas durante o trabalho de colaboração.

Aos professores Jarbas J. R. Rohwedder e Ivo M. R. Jr. pelo auxílio na confecção do circuito eletrônico e pelo empréstimo do material para os testes de detecção de nitrito utilizados neste trabalho.

À todos os funcionários do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Fontana, Marcos, Gilmar, Mário, Bel, André, Celi, Rodrigo, Flávio, Toninho e Nelson.

E ao Milton pelo apoio, carinho e compreensão.

À FAPESP pelo suporte financeiro (processo 98/03738-9)

RESUMO

Título: Liberação térmica e fotoquímica de óxido nítrico a partir de S-nitrosotióis incorporados em matrizes de poli(etileno glicol) e em hidrogel de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO.

Autora: Sílvia Mika Shishido

Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Palavras-chave: óxido nítrico, S-nitrosotióis, poli(etileno glicol).

Os S-nitrosotióis (RSNO) tem sido objeto de várias pesquisas recentes, devido à sua capacidade de atuar no armazenamento e transporte de óxido nítrico (NO^*) *in vivo*. Estes compostos são instáveis e podem liberar NO^* tanto térmica como fotoquimicamente. Neste trabalho os RSNOs S-nitrosocisteína (CiSNO), S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e S-nitrosoglutationa (GSNO) foram sintetizados através de uma nova técnica baseada no borbulhamento de uma mistura gasosa de NO^*/O_2 através das soluções dos respectivos tióis. Os RSNOs sintetizados foram incorporados em matrizes poliméricas de poli(etileno glicol) (PEG) e em hidrogel de copolímero em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (F-127). Além disso, foi utilizado um método espectroscópico novo para a caracterização do processo de gelificação do F-127, onde foi acompanhada a variação transiente da absorção da linha base. Através de acompanhamentos cinéticos da decomposição térmica e fotoquímica dos RSNOs, foi possível observar que as matrizes poliméricas e de hidrogel causam uma diminuição na velocidade de liberação de NO^* a partir destes compostos em relação às soluções aquosas. Esta diminuição foi atribuída a um aumento na taxa de recombinação induzida por estas matrizes. Foi observado também que o aumento na concentração inicial dos RSNOs leva a um aumento na velocidade de liberação de NO^* devido a uma reação de auto-catálise envolvendo os radicais tiila (RS^*) formados durante a decomposição. A partir destes resultados foi proposto um mecanismo de decomposição dos RSNOs, baseado no efeito das matrizes sobre a recombinação radicalar. Foram feitos experimentos variando-se a viscosidade do solvente para avaliar o efeito da viscosidade na velocidade de liberação de NO^* a partir da GSNO. Estes resultados permitiram cálculos de eficiência da gaiola que concordaram com o modelo de Noyes proposto para a reação de recombinação radicalar.

ABSTRACT

Title: Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in poly(ethylene glycol) and hydrogel of block copolymer of PEO-PPO-PEO matrices.

Author: Sílvia Mika Shishido

Advisor: Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Key words: Nitric oxide, S-nitrosothiols, poly(ethylene glycol).

S-nitrosothiols (RSNOs) have been investigated as compounds that act in the transport and storage of nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$) *in vivo*. These compounds are unstable and may release $\text{NO}^\bullet$ both, thermal and photochemically. In this work, we have observed that RSNOs can be synthesized directly in thiol-containing solutions, by using a reactive gaseous ($\text{NO}^\bullet/\text{O}_2$) mixture. We have incorporated S-nitrosocysteine (CySNO), S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) and S-nitrosogluthathione (GSNO) in non-toxic polymer matrices of poly(ethylene glycol) (PEG) and hydrogel of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer. A new spectrophotometric method was employed to characterize the gelation process, by following the transient absorption change of the base line. The kinetics of thermal and photochemical decomposition of RSNOs showed that polymeric matrices can reduce the thermal and photochemical $\text{NO}^\bullet$ release from these compounds. This behavior was assigned to a cage effect promoted the microenvironment existing in these matrices, which increases the rate of radical pair recombination in the homolytic S-N bond cleavage process. Furthermore, it was observed that an increase in the RSNOs initial concentration leads to an increase in the rate of $\text{NO}^\bullet$ release, due to an autocatalytic reaction promoted by thyl radicals formed during the decomposition of RSNOs. Based on these results, a mechanism was proposed for explaining the matrix effects on the thermal and photochemical $\text{NO}^\bullet$ release from RSNOs. Experiments varying the solvent viscosity have allowed calculating the cage efficiencies in the photochemical $\text{NO}^\bullet$ release from GSNO, which agree with the model proposed by Noyes for radical pair recombination.

Curriculum Vitae

1 - Dados Pessoais.

Nome: Sílvia Mika Shishido

Data de nascimento: 15 de julho de 1973, São Paulo – S.P.

e-mail: silvia_mika@yahoo.com.br

2 - Formação Acadêmica.

➤ Bacharel em Química.

Período: Janeiro de 1991 a Dezembro de 1995.

Instituto de Química - UNICAMP.

➤ Mestre em Química.

Período: Janeiro de 1995 a Junho de 1998.

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

Suporte financeiro – FAPESP . Período: Junho de 1995 a Junho a 1998.

Dissertação de Mestrado: “Fotoquímica de doadores de óxido nítrico (NO): Decomposição do nitroprussiato de sódio e da S-nitroso-L-cisteína em matrizes de água e de poli(etileno glicol)”

3 - Artigos publicados em periódicos arbitrados

- Shishido, S.M.; de Oliveira, M.G.. Polyethylene glycol matrix reduces the rate of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitrosos-N-acetylcysteine. *Photochem. Photobiol.* (2000) **71**, 273-280.
- Shishido, S.M. e de Oliveira, M.G.. Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: Nitric oxide release versus cyanide toxicity. *Prog. React. Kinetic Mec.* (2001) **26**, 239-261.
- Ricardo, K.F.S., Shishido, S.M., de Oliveira, M.G. e Krieger, M.H.. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine (SNAC) in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* (2002) **7**, 57-66.
- de Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B. e Morgon, N.H.. Thermal stability of primary S-nitrosothiols: The role of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem. A.* (2002) **106**, 8963-8970.

- Shishido, S.M., Seabra A.B., Loh W., de Oliveira M.G.. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in pluronic F-127 gel: Potential uses for local and controlled nitric oxide release *Biomaterial* (2003) – no prelo.

4 – Pedidos de patentes

- de Oliveira, M.G., Rohwedder, J.J.R., Shishido, S.M. e Seabra A.B.. “Sistema de nitrosação baseado no borbulhamento de uma mistura gasosa de óxido nítrico e ar, para a nitrosação de tióis e outros substratos.” – PI 0100577-4. (Menção Honrosa no Prêmio Governador do Estado – 2001)
- de Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B.. “Formulações de S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico incorporados em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol e metodologia para incorporação de S-nitrosotióis em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol.” – PI 0004238-2. (Menção Honrosa no Prêmio Governador do Estado – 2001)
- de Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B. e Loh, W.. “Formulações de S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico incorporados em géis aquosos de copolímero em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)”. (Menção Honrosa no Prêmio Governador do Estado – 2002)

5 - Resumos de trabalhos apresentados em congressos, indexados no ISI.

- Santos, K.F.R., Shishido, S.M., Laurindo, F.R.M., de Oliveira, M.G., Krieger, M.H.. Nitrosothiol (SNAC) recovery the vascular dysfunction in the knockout LDLR-/- mice. *Hypertension*. (2001) **37**, 1039.
- Santos, K.F.R., Shishido, S.M., Laurindo, F.R.M., de Oliveira, M.G., Krieger, M.H.. The novel NO donor S-nitroso-N-acetylcysteine prevents early endothelial function changes and plaque growth in LDLR-/- mice. *Free Radical Bio. Med.* (2001) **31**, Suppl. 1.

6 – Número de resumos publicados em anais de reuniões científicas no exterior: 5.

7 – Número de resumos publicados em anais de reuniões científicas no Brasil: 8.

ABREVIATÓES

Ab: Aberchrome - anidrido succínico ((E)- α -(2,5-dimetil-3-furiletilideno)(isopropilideno)

Ach: acetilcolina

CG: guanilato ciclase

cGMP: guanosina mono-fosfato cíclica

CiSH: cisteína

CiSNO : S-nitrosocisteína

EDRF: fator de relaxação derivada do endotélio

F: eficiência da gaiola

GSH: glutathione

GSNO: S-nitrosoglutationa

HB: ponte de hidrogênio

HD: 2,4 - trans-hexadien-1-ol

k: constante de velocidade

NAC: N-acetilcisteína

NEED: cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina

NG: nitroglicerina

NO: óxido nítrico

NPS: nitroprussiato de sódio

η : viscosidade

$1/\eta$: fluidez

PEG: poli(etileno glicol)

PEO-PPO-PEO: poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)

RS[•]: radical tiila

RSH: tióis

RSNO: S-nitrosotióis

RSSR: dímero formado a partir dos RSNOs

SNAC: S-nitroso-N-acetilcisteína

SNAP: S-nitroso-N-acetilpenicilamina

t_{1/2}: meia vida

Φ: rendimento quântico

UV: ultra-violeta

v: velocidade

v_i : velocidade inicial

Vis: visível

vVdW: volume de Van der Waals

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Óxido Nítrico (NO).....	1
1.1.1. Importância bioquímica do óxido nítrico.....	1
1.1.2. Propriedades físico-químicas do óxido nítrico.....	5
1.2. Doadores de NO.....	7
1.2.1. S-nitrosotióis (RSNOs).....	8
1.2.2. Nitroprussiato de sódio.....	10
1.3. Efeito da recombinação radicalar na estabilidade dos S-nitrosotióis	11
1.4. Matrizes poliméricas.....	16
1.4.1. Polí(etileno glicol) (PEG).....	16
1.4.2. Copolímero em bloco de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO).....	18
1.5. PEG e copolímero em bloco F-127 como matrizes para incorporação de S-nitrosotióis.....	21
2. Objetivos.....	23
3. Parte experimental.....	23
3.1. Reagentes.....	23
3.2. Descrição do sistema de nitrosação.....	24
3.3. Síntese da GSNO por via úmida.....	27
3.4. Incorporação dos RSNOs em hidrogéis de copolímero em bloco F-127.....	27
3.5. Decomposição dos RSNO - Acompanhamento cinético das decomposições (UV/Vis) e caracterização dos produtos formados...	29
3.5.1. Caracterização do NO liberado por IV	30
3.5.2. Caracterização da cistina formada por UV/Vis.....	31
3.5.3. Detecção de NO ₂ ⁻ pelo Método de Griess.....	32
3.6. Fotólise dos RSNOs – descrição do sistema de irradiação.....	32
3.7. Descrição dos outros equipamentos e aparatos utilizados neste	

trabalho.....	35
3.7.1. Medidas de fotólise de flash.....	35
3.7.2. Medidas de viscosidade.....	36
3.7.3. Medidas de densidade.....	37
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1. Síntese.....	39
4.1.1. Efeito do excesso de agente nitrosante.....	42
4.1.2. Efeito do excesso de tiól.....	45
4.2. Decomposição dos RSNOs. Caracterização dos produtos formados.	47
4.2.1. Caracterização dos produtos formados.....	47
4.2.2. Decomposição térmica dos RSNOs.....	51
4.2.3. Fotodecomposição dos RSNOs.....	61
4.3. Efeito da matriz de PEG.....	62
4.3.1. Decomposição térmica dos RSNOs.....	62
4.3.2. Fotodecomposição dos RSNOs e do NPS.....	64
4.4. Efeito da matriz de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO.....	85
4.4.1. Interpretação do mecanismo de micelização e gelificação de copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO.....	85
4.4.2. Caracterização do processo de gelificação.....	88
4.4.3. Efeito da matriz de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO na decomposição térmica e fotoquímica dos RSNOs	96
5. Conclusões.....	102
6. Referências.....	102

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óxido nítrico.

1.1.1. Importância bioquímica do óxido nítrico.

Desde a descoberta de que o óxido nítrico (NO^{*}) é uma espécie endógena que atua como mensageiro entre as células dos animais superiores (incluindo os humanos), houve um grande aumento do interesse científico por essa molécula. (D.L.H. Williams, 1996). Em 1980 Furchgott e Zawadski constataram acidentalmente que o efeito vasorrelaxador da acetilcolina (Ach) dependia da presença do endotélio íntegro. Vasos dos quais o endotélio havia sido removido respondiam com constrição a este agente. Estes pesquisadores propuseram a hipótese de que o relaxamento era causado pela ação da Ach sobre receptores de células endoteliais que, quando estimulados, induziam a síntese de uma substância que atuaria na musculatura vascular, relaxando-a. Denominaram a substância de Fator de Relaxação Derivado do Endotélio ou “Endothelium Derived Relaxing Factor” (EDRF).

Em 1986, descobriu-se que o EDRF é um inibidor da agregação plaquetária e da adesão de trombócitos ao endotélio de vasos. (Radomski *et al.*, 1987 (a) e (b)). Nesta época, observações independentes realizadas por Palmer e colaboradores (1987) e Ignarro e colaboradores (1988) revelaram que o EDRF poderia ser o NO^{*}. Em 1987 Moncada e colaboradores (1989) demonstraram que culturas de células endoteliais sintetizavam o NO^{*} a partir de átomos de nitrogênio do terminal guanidino da L-arginina levando à formação de L-citrulina. Verificou-se também que a reação era mediada por uma enzima solúvel, a NO-sintase. O NO^{*} foi então identificado como sendo o EDRF. Estes dados levaram à indicação de uma rota enzimática específica para a síntese de NO^{*}, passível de manipulação farmacológica e bioquímica (Francischetti *et al.*, 1995).

A natureza difusiva do NO^{*} permite que ele tenha uma capacidade única de participação na comunicação transcelular. A meia vida do NO^{*} em meio biológico é de aproximadamente 1 s. Mesmo durante este tempo curto, o NO^{*} pode difundir-se a distâncias que correspondem a vários diâmetros celulares, assim, ele pode exercer a função de mensageiro (Koppenol, 1998). O NO^{*} liberado localmente no endotélio vascular pode se comunicar rapidamente com células adjacentes que contenham guanilato-ciclase, levando-as a atuar em conjunto em respostas fisiológicas.

A figura 1 mostra uma representação esquemática da atuação do NO^{*} endógeno no relaxamento da musculatura lisa, causando a vasodilatação. O processo de relaxação inicia-se com a ativação da acetilcolina (Ach) que ativa os canais de cálcio (Ca²⁺) nas células endoteliais, permitindo a sua passagem. O aumento na concentração de Ca²⁺ ativa a NO-sintase, que sintetiza NO^{*} a partir de O₂ e L-arginina, produzindo NO^{*} e L-citrulina. O NO^{*} difunde-se para as células da musculatura lisa onde ativa a guanilato ciclase (GC), que produz guanosina mono-fosfato cíclica (cGMP) a partir de guanosina tri-fosfato, desencadeando o processo de relaxação (Fricker, 1995; Butler e Rhodes, 1997; Mateo e Artiñano, 2000).

A meia vida curta do NO^{*} cria a possibilidade de que ele atue como um neurotransmissor, difundindo-se para fora dos neurônios imediatamente após a sua síntese (Snyder, 1992). As pesquisas dos últimos 20 anos mostraram que o NO^{*} está envolvido em muitos processos fisiológicos importantes além da vasodilatação, como a modulação da neurotransmissão, a toxicidade mediada pelos macrófagos, a inibição da agregação plaquetária e a neurodegeneração (Marín, 1997; Janero, 2000; Ford e Lorkovic, 2002; Stewart e Heales, 2003).

O NO^{*} também é sintetizado e liberado por macrófagos ativados e neutrófilos e parece ser responsável pelas ações citotóxicas destas células. Neste caso, a citotoxicidade se deve a uma concentração alta e localizada de NO^{*} (de 2 a 3 ordens de magnitude mais alta que a concentração gerada pelas células endoteliais) (Koppenol, 1998). Altas concentrações de NO^{*} podem causar

danos a proteínas que contêm ferro, levando à ruptura das funções celulares. Em concentrações altas, o NO^* também pode reagir com o ânion superóxido levando à formação do ânion peroxinitrito (OONO^-) e de outras espécies radicalares citotóxicas (Hensley *et al.*, 1997).

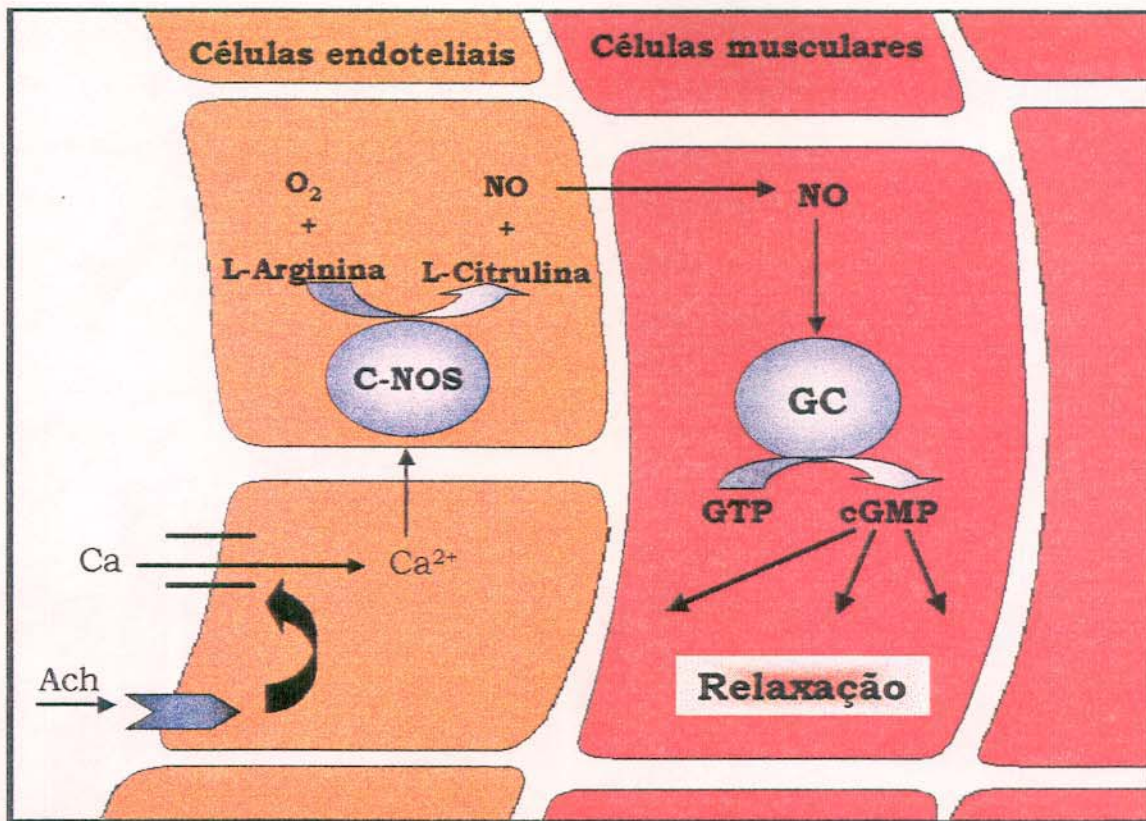


Figura 1. Representação esquemática da vasodilatação causada pelo NO^* endógeno (Fricker, 1995; Butler e Rhodes, 1997; Mateo e Artiñano, 2000).

A gama completa de ações bioquímicas do NO^* não é conhecida até o momento. A vasodilatação é talvez a sua ação bioquímica mais importante. Esta descoberta permitiu compreender em parte a ação de drogas vasodiladoras já utilizadas há muito tempo, como os nitratos, a nitroglicerina (NG) e o nitroprussiato de sódio (NPS). Estes compostos são utilizados em larga escala no tratamento de pacientes que sofrem de angina e hipertensão. A ação dos nitratos e nitrocompostos se baseia na sua redução com produção de NO^* ,

que atua então diretamente na musculatura dos vasos sangüíneos (D.L.H. Williams, 1996; Ignarro *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). As reações do NO[•] e consequentemente seus efeitos estão relacionados com a sua concentração, localização e o meio no qual ele é produzido. O NO[•] ou os produtos de sua reação com o O₂ e O₂⁻ podem modificar diferentes macromoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, para produzir tanto efeitos fisiológicos como patológicos (Davis *et al.*, 2001). Como resultado de todas estas descobertas, o NO[•] foi eleito em 1992, como a molécula do ano pela revista *Science*. Além disso, em 1998 Furchgott, Murad e Ignarro receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina pela descoberta da atuação do NO[•] como uma molécula mensageira no sistema cardiovascular.

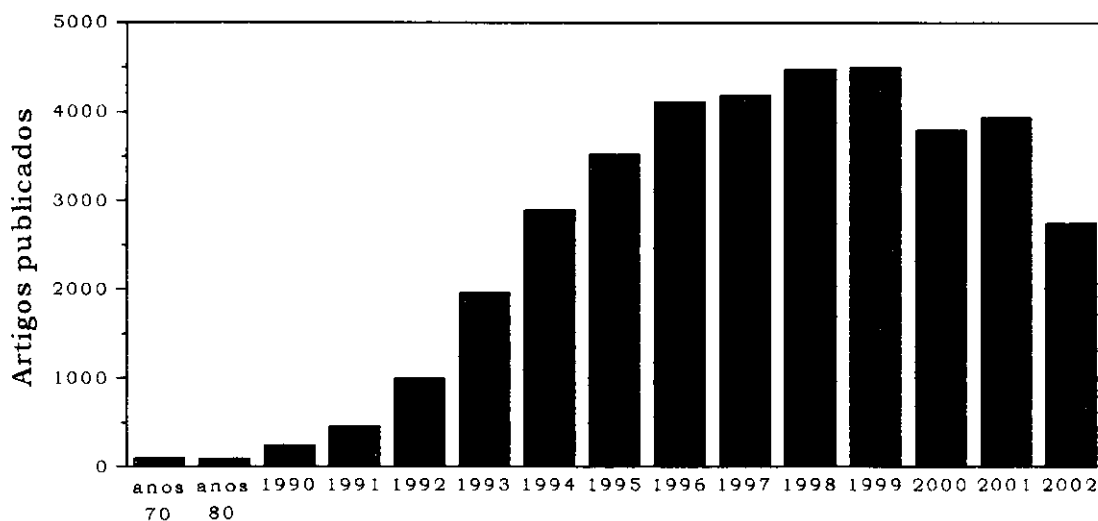


Figura 2. Número de artigos publicados contendo NO[•] no título nos últimos 30 anos. Os valores mostrados para os anos 70 e 80 são a média dos artigos publicados nestas décadas (ISI).

A figura 2 mostra o grande aumento no número de artigos publicados contendo NO[•] no título, que se iniciou na década de 90 e continua relativamente alta até hoje. Desta forma, qualquer composto capaz de gerar NO[•], seja em processos térmicos ou fotoquímicos, apresenta em princípio, um

grande interesse relacionado com a possibilidade de sua utilização na geração de NO[•] *in vivo*.

1.1.2. Propriedades físico-químicas do óxido nítrico.

O NO[•] tem a configuração eletrônica $\sigma^2\sigma^{*2}, \sigma^2\pi^4\pi^{*1}$ (Fig. 3), com um elétron desemparelhado no seu orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) π^* . Possui ordem de ligação de 2,5 (6 elétrons nos orbitais ligantes - 1 elétron no orbital anti-ligante), consistente com a distância inter-atômica de 1,15 Å, que é intermediária entre a distância de uma ligação tripla do NO⁺ de 1,06 Å e da distância representativa de uma ligação dupla, que é cerca de 1,20 Å (Wilkinson *et al.*, 1987).

Este radical dificilmente forma o dímero N₂O₂, pois a maior parte dos radicais dimerizam devido ao aumento na ordem total de ligações, após a dimerização (Jolly, 1964). No caso do N₂O₂ a ordem de ligação é igual a 5, que é igual à soma das ordens de ligação de duas moléculas de NO[•] separadas. Além disso, a entalpia (energia liberada) de dimerização é de apenas -2,6 kcal.mol⁻¹, com uma redução da entropia, uma vez que o dímero é mais ordenado do que duas moléculas de monômero separadas. A 300° C e 1 atm, o valor de -TΔS é de +4,3 kcal.mol⁻¹. Estes fatores tornam a dimerização desfavorável, sendo que o dímero pode existir apenas em altas concentrações de NO[•] no estado sólido na temperatura do nitrogênio líquido, onde a contribuição entrópica dependente da temperatura é minimizada. À temperatura ambiente, o NO[•] se apresenta na sua forma gasosa e é notavelmente estável, tendo sido mantido nesta fase por pelo menos 40 anos sem evidência de decomposição (Beckman, 1996).

O elétron desemparelhado no orbital π^* pode ser facilmente removido (potencial de ionização de 9,23 eV) ocorrendo a formação do cátion nitrosônio (NO⁺). O NO[•] pode também ser reduzido formando o ânion nitroxila (NO⁻). Em meio aquoso na presença de oxigênio, ele é rapidamente destruído formando NO₂[•] que por hidrólise origina nitratos e nitritos. Contudo, em concentrações

baixas na ausência de oxigênio ele pode sobreviver por um tempo consideravelmente longo (alguns segundos) (Clarke e Gaul, 1993). O estado de oxidação do nitrogênio se reflete na frequência de estiramento da ligação N-O (Stamler *et al.*, 1992 (b)) como pode ser visto na tabela. 1.

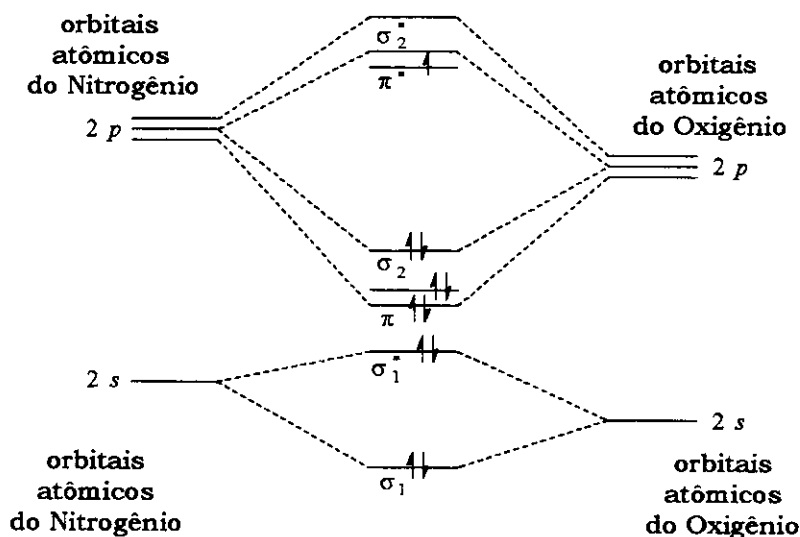


Figura 3. Orbitais moleculares do NO* (Wilkinson *et al.*, 1987).

Tabela 1. Propriedades dos monóxidos de nitrogênio (Stamler *et al.*, 1992 (a)).

Molécula	Número de oxidação do nitrogênio	Comprimento da ligação (Å)	Estiramento N-O (cm ⁻¹)
NO ⁺	3+	0,95	2300
NO*	2+	1,15	1840
NO ⁻	1+	1,26	1290

O NO* possui um momento de dipolo elétrico pequeno e é quase igualmente solúvel em muitos solventes. À pressão de vapor de 1 atm os coeficientes de partição entre o solvente e a fase gasosa seguem a ordem: metanol 0,36; benzeno 0,30; pentano 0,25 e água 0,07 indicando que o NO* é

relativamente lipofílico. O coeficiente de partição no sistema 1-octanol/água foi relatado como sendo de 6,5, o que sugere que a solubilidade do NO[•] em membranas pode ser de 6 a 7 vezes maior que na fase aquosa. Então, é esperado que (como o O₂) ele possa se difundir facilmente da água para solventes orgânicos, através de membranas biológicas e para interiores hidrofóbicos de proteínas (R.J.P. Williams, 1996), tendo já sugerido-se que as membranas podem atuar como reservatórios de NO[•] (Malinski *et al.*, 1993; Koppenol, 1998).

O coeficiente de difusão do NO[•] em água é de $2,07 \times 10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ a 20 °C, quase idêntico ao do monóxido de carbono (CO), como esperado para moléculas de tamanhos similares (Koppenol, 1998). O NO[•] gasoso é paramagnético, mas em solução não são observados picos no espectro de ressonância paramagnética de elétrons (Wilkinson *et al.*, 1987).

1.2. Doadores de NO[•]

Os reagentes químicos mais utilizados como doadores contínuos de NO[•] em condições fisiológicas são a nitroglicerina (NG), o nitroprussiato de sódio (NPS) e a S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (Shaffer, 1992). Além destes compostos, existem muitos outros doadores de NO[•] como os nitratos orgânicos, nitritos orgânicos, derivados de floxanos, complexos NO-amino (NOCs), S-nitrosotióis (RSNOs), complexos ferro-nitrosila e rutênio-nitrosila (Katayama, 1995).

Os floxanos, nitratos e nitritos orgânicos reagem com os tióis endógenos para formar intermediários RSNOs que são responsáveis pela liberação de NO[•]. A ação destas classes de doadores de NO[•] depende da presença de tióis (RSH). Quando estes são consumidos em grandes quantidades, sua disponibilidade diminui, causando tolerância a estes medicamentos. Os nitratos e nitritos mais comuns são o dinitrato de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol, nitrito de amila e a NG (Katayama, 1995). A NG foi utilizada durante mais de 100 anos

para tratamento de angina e outros problemas de circulação (D.L.H.Williams, 1996). Até então, o mecanismo de ação deste doador de NO[•] era desconhecido. Recentemente, foi descoberto que a NG é metabolizada dentro da mitocôndria pela enzima nitrato redutase (aldeído deshidrogenase mitocondrial) que catalisa especificamente a decomposição de NG, formando 1,2-dinitrato de glicerina e nitrito, levando à produção de cGMP e à relaxação da musculatura lisa (Chen, 2002).

1.2.1. S-nitrosotióis (RSNOs)

Sabe-se que no meio celular e no plasma existem muitas espécies que podem desativar rapidamente o NO[•], como o oxigênio, ânion superóxido e o ferro de grupos heme. Assim, o NO[•] *in vivo* apresenta uma meia vida ($t_{1/2}$) de aproximadamente 0,1 s em contraste com a $t_{1/2}$ do EDRF que é da ordem de segundos. Tal diferença nas meias vidas sugere que o NO[•] é estabilizado por uma molécula carregadora que prolonga seu tempo de vida mantendo sua atividade biológica (Stamler *et al.*, 1992 (b)).

Uma classe de moléculas biológicas importantes que pode exercer esta função são os tióis de baixo peso molecular, que são abundantes no plasma humano (Gaston, 1999). Estes compostos podem ser facilmente nitrosados, gerando os S-nitrosotióis (RSNOs) que são significativamente mais estáveis que o NO[•] (Oae e Shinahama, 1983). Os RSNOs também apresentam propriedades vasodilatadoras e são capazes de inibir a agregação plaquetária (Ricardo *et al.*, 2002; Stamler *et al.*, 1992 (b)). Assim, os RSNOs além do seu potencial de uso como drogas liberadoras de NO[•] podem também atuar no armazenamento e transporte de NO[•] *in vivo* (D.L.H. Williams, 1996). Os RSNOs têm sido detectados em fluidos plasmáticos do revestimento das vias aéreas, nas plaquetas e em neutrófilos. Eles podem assim atuar como carregadores de NO[•] na forma de tióis livres ou proteínas contendo cisteína em sistemas biológicos (Stamler *et al.* 1992 (a)). Os RSNOs podem ser então, ferramentas úteis no

tratamento de doenças que envolvem disfunções no metabolismo de NO[•] (Eiserich *et al.*, 1998).

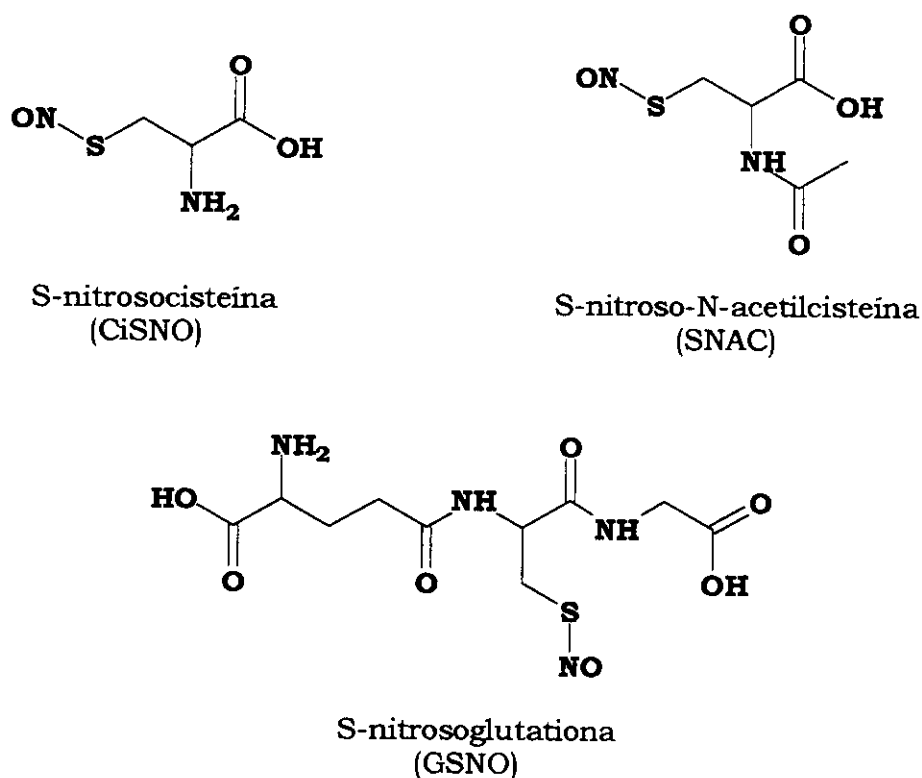


Figura 4. Estruturas dos S-nitrosotióis utilizados neste trabalho.

Tióis de baixo peso molecular como a cisteína (CiSH) e a glutathiona estão envolvidos em vários processos bioquímicos. A CiSH é o tiol de baixo peso molecular mais abundante no plasma humano (Tsikas *et al.*, 1998). A N-acetil cisteína (NAC) é um produto endógeno do metabolismo da CiSH, estando presente na urina humana como produto da N-acetilação da CiSH no rim (Tsikas *et al.*, 1998, Gissen, 1994). Este composto possui grande potencial para tratamento de disfunções pulmonares, sendo utilizado como agente mucolítico. Além disso, foi descoberto que a NAC é um precursor e estimulador da síntese endógena de glutathiona (GSH) e um potente agente anti-oxidante. A GSH é um tripeptídeo contendo cisteína e participa de várias reações enzimáticas como o transporte de aminoácidos, defesa contra radicais livres e outras espécies

reativas de oxigênio e algumas substâncias químicas tóxicas (Gissen, 1994). Estes três tióis são facilmente nitrosados na presença de N_2O_3 ou NO_2^- em meio ácido originando os RSNOs correspondentes. As estruturas destes RSNOs estão apresentadas na figura 4.

1.2.2. Nitroprussiato de sódio (NPS)

Complexos ferro-nitrosila também podem ser usados como doadores de NO^* e o principal complexo Fe-NO é o nitroprussiato de sódio $[Fe(CN)_5(NO)]^{2-}$, NPS (Katayama, 1995; Butler e Rhodes, 1997). Como pode ser observado em sua estrutura (Fig. 5), este complexo possui um átomo de ferro como íon central com 5 ligantes CN^- e 1 ligante NO^+ . O NPS tem sido utilizado clinicamente há mais de 80 anos como vasodilatador em ataques de hipertensão, devido ao seu efeito ser muito rápido e no tratamento de hipertensão crônica, pois não causa tolerância. Porém, existe a possibilidade da liberação dos ligantes CN^- que pode levar a efeitos tóxicos (Bates *et al.*, 1991). Em geral é considerado que os ligantes CN^- liberados reagem com metahemoglobina para produzir cianometahemoglobina, que é considerada uma espécie não-tóxica. Porém, se a infusão de NPS exceder o valor de $2 \mu g \text{ kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ou quando os doadores de espécies contendo enxofre e metahemoglobina são reduzidos, os CN^- podem se acumular, causando intoxicação por cianetos (Friederich e Butterworth, 1995).

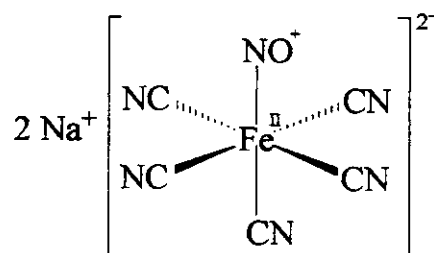


Figura 5. Estrutura do nitroprussiato de sódio.

Este complexo pode ser estocado na sua forma cristalina por anos à temperatura ambiente, se for mantido em local seco e protegido da luz (Wang *et al.*, 2002). Em solução, o NPS mantém-se estável, sendo que a liberação de

seus ligantes ocorre na presença de um agente redutor ou sob irradiação. Sabe-se que a fotossustituição do ligante L dos complexos $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{L}]^{2-}$ é dependente do comprimento de onda de irradiação (Lima *et al.*, 1994). No caso do NPS, a liberação seletiva de NO (sem que ocorra a liberação de ligantes CN^-) pode ocorrer selecionando-se o comprimento de onda de irradiação ($\lambda > 480 \text{ nm}$) (de Oliveira e Shishido, 2001).

Em sistemas biológicos, o ligante NO do NPS pode ser liberado por vias enzimáticas ou não enzimáticas. A redução não enzimática pode ocorrer devido à presença de tióis, hemoproteínas e ascorbato, que são abundantes na maior parte dos tecidos biológicos e induzem a liberação de quantidades significantivas de NO a partir do NPS (Wang *et al.*, 2002).

Além da utilização do NPS para finalidades clínicas, este complexo é muito utilizado como padrão em experimentos que utilizam modelos *in vivo* e *in vitro*, para a comparação do efeito vasodilatador. Além do NPS, existem outros complexos metálicos de NO que também apresentam ação vasodilatadora como os complexos de Rutênio nitrosilados, por exemplo, o *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3)](\text{PF}_6)_3$, o *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})\text{Cl}(\text{ciclame})](\text{ClO}_4)_2$ e o *trans*- $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NH}_3)_4(\text{POEt})_3](\text{PF}_6)_3$ (Hayton *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2002; Torsoni *et al.*, 2002; Tfouni *et al.*, 2003; Clarke, 2003).

1.3. Efeito da recombinação radicalar na estabilidade de S-nitrosotióis.

Sabe-se que a presença do solvente altera tanto a frequência como a direção das colisões das moléculas, quando são comparadas as reações em solução e em fase gasosa. A energia cinética das moléculas em solução e em fase gasosa (à mesma temperatura) é aproximadamente a mesma, mas existem duas modificações com respeito a frequência de colisões, a saber:

- O espaço livre (espaço onde as moléculas do soluto podem se difundir) entre duas moléculas do solvente equivale a somente um quarto do volume total, assumindo-se que as moléculas são esferas empacotadas. Isto tende a

aumentar a frequência de colisão e o efeito máximo é obtido quando o raio da molécula do soluto é muito menor que o raio da molécula do solvente.

- O agrupamento de colisões é diferente. Em solução, as colisões tendem a ser repetidas, ocorrendo múltiplas colisões entre duas moléculas reativas. Estas séries de colisões são denominadas de encontros, isso ocorre porque as moléculas de solvente tendem a formar uma gaiola ao redor dos pares que estão colidindo, prendendo-os por um período antes deles se afastarem (Cox, 1996).

No caso de reações que envolvem a clivagem homolítica de ligações covalentes, com a formação de pares de radicais, as moléculas do solvente atuam como uma “gaiola” impedindo sua separação imediata. Assim, os pares de radicais que são impedidos de se afastarem, voltam a colidir recombinando-se. Neste processo, os fragmentos podem nunca atingir uma separação maior que um diâmetro molecular e então, a recombinação pode ocorrer num período entre o tempo de uma vibração (10^{-13} s) e o tempo de um deslocamento difusivo (10^{-11} s) (Kaczmarek *et al.*, 1995).

Os pares de radicais produzidos a partir do mesmo precursor são chamados de pares geminados (do latim *geminus*, gêmeos) (Noyes, 1955) e aqueles que são formados através de difusão são chamados pares randômicos, que neste trabalho serão chamados de pares não-geminados. A formação dos produtos a partir dos pares geminados depende de uma redução na difusão para evitar que os radicais originais se afastem uns dos outros de forma permanente e irreversível. Esta redução da difusão pode ser causada pelo solvente, pela presença de uma gaiola de zeólito (Turro *et al.*, 1985) ou pela adsorção em uma superfície de sílica (Johnston *et al.*, 1984; Leffer e Zupancic, 1980; Baretz e Turro, 1983).

Todas as reações bimoleculares (inclusive a recombinação não geminada) envolvem dois passos, a difusão dos reagentes para que o par se encontre e uma colisão que leve à reação. Na análise das reações de recombinação não geminada, os estudos através da teoria de colisões se depararam com um comportamento não esperado. As velocidades de algumas reações

bimoleculares pareciam ser totalmente insensíveis às alterações da viscosidade da solução, sendo que obviamente as espécies reativas necessitam difundir-se (Leffer, 1993). Isto foi explicado por Rabinowitch e Wood após estes pesquisadores terem feito alguns experimentos com um aparato semelhante a uma mesa de bilhar, com bolas de solvente e duas bolas de reagente. Estes pesquisadores observaram que as colisões entre os reagentes ocorrem em séries. Uma vez que os reagentes se encontram, as moléculas de solvente vizinhas tendem a mantê-los juntos, fazendo com que estas moléculas de reagente colidam entre si de 10 a 100 vezes (em um solvente com viscosidade próxima à da água) antes de reagirem ou de eventualmente se separarem. Se as colisões ocorrem em séries, a velocidade (v) com a qual a reação ocorre é proporcional ao número de encontros por segundo vezes o número de colisões por encontro, isto é:

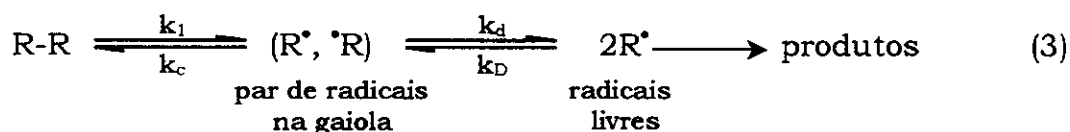
$$v \propto (\text{encontros/s}) \times (\text{colisões/encontro}) \quad (1)$$

$$\text{e } v \propto \text{colisões/s} \quad (2)$$

A razão da “insensibilidade” das velocidades da maior parte das reações de recombinação não geminada, em relação à viscosidade do meio, se deve ao fato de que um aumento na viscosidade reduz a frequência de encontro, mas por outro lado, ocorre um aumento do número de colisões por encontro. Estes efeitos se cancelam a menos que as reações sejam inerentemente tão prováveis ou os encontros tão prolongados que a reação durante o encontro é inevitável. Assim, as velocidades das reações denominadas controladas por difusão são proporcionais à frequência de encontros, isto é, quanto maior a probabilidade de encontro de duas espécies reativas, maior a velocidade de reação (Leffer, 1993).

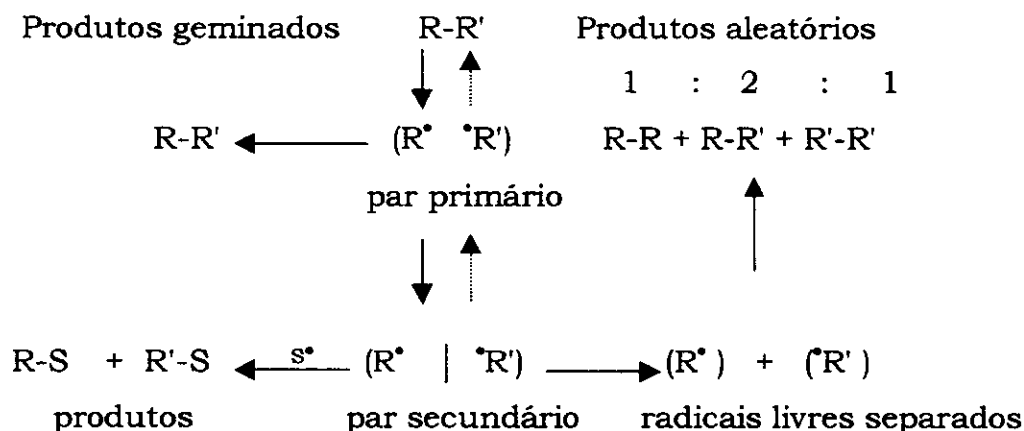
O conceito de efeito gaiola foi inicialmente descrito por Franck e Rabinowitch (1934) para explicar a redução da eficiência da fotodissociação do I_2 em solução em relação à fase gasosa (Male *et al.*, 1998). Estes autores atribuíram este efeito à “gaiola” formada pelas moléculas do solvente que

rodeiam o soluto. Assim, os fragmentos liberados pela quebra da ligação colidem com a gaiola (que evita que os fragmentos se distanciem) tornando a se ligar e regenerando a molécula original (Koenig, 1973). Este conceito está ilustrado na equação 3.



onde k_1 é a constante de velocidade de formação dos pares de radicais presos na gaiola; k_c é a constante de velocidade da recombinação geminada; k_d é a constante de velocidade do afastamento dos radicais; k_D é a constante de velocidade de segunda ordem da recombinação aleatória dos radicais que escaparam da gaiola.

O termo efeito gaiola é freqüentemente mencionado no modelo proposto por Noyes (1955) (esquema 1).



Esquema 1: Modelo de recombinação radicalar proposto por Noyes (1955).

Segundo o modelo de Noyes (1955) o dímero R-R' forma o par primário dos radicais que estão "presos" na gaiola. Destes pares primários, uma parte se recombina restaurando o dímero original e a outra forma os pares secundários que estão mais afastados. Parte dos pares secundários se recombina e parte se

afasta para reagir com outros radicais formando produtos e dímeros aleatoriamente.

O efeito da viscosidade do solvente no processo de recombinação já tem sido estudado por vários autores (Demeter *et al.*, 1995; Lima e Murakami Iha, 1996; Langford e Shaw, 1997; Lima *et al.*, 1999; Yoder *et al.*, 2001). Por exemplo, Traylor e co-autores (1993) estudaram o efeito da viscosidade na fotólise de complexos porfirínicos de 1-metilimidazol-ferro(II)-NO nos solventes: glicerina, tolueno, nujol e soluções aquosas de 1-metilimidazola. Foi observado que os solventes polares reduzem o rendimento quântico na fotoejeção do NO, que o efeito estérico é relativamente pequeno e que o aumento da viscosidade leva a uma redução do valor de rendimento quântico na fotólise destes complexos.

Gershogoren, e co-autores (1998) acompanharam a fotólise de I_3^- em uma série de solventes polares (H_2O , CH_3CN , etanol, álcool isobutílico). Estes pesquisadores acompanharam as absorbâncias transientes resultantes da fotólise no infra-vermelho próximo e no UV. A recombinação geminada foi observada em tempos de poucos ps. Neste trabalho foi observado que a massa das moléculas do solvente pode estar governando a probabilidade de recombinação geminada.

Male, e co-autores (1998) estudaram o efeito da massa e do tamanho dos pares de radicais formados na eficiência de recombinação, baseado na teoria de Noyes. Estes pesquisadores utilizaram radicais do tipo $[(RCp)(CO)_3M^*]$, $^*M(CO)_3(CpR)$ ($M=Mo$ ou W ; CpR = vários ligantes ciclopentadienilas) que foram gerados fotoquimicamente através da clivagem homolítica da ligação metal-metal do $(RCp)_2M_2(CO)_6$. Neste trabalho foram obtidos valores de eficiência da gaiola em função da viscosidade e foram utilizados os seguintes solventes: C_4H_8 , $C_{10}H_{22}O_5$, CCl_4 , C_6H_{14} , $C_{12}H_{26}$, $C_{16}H_{34}$, $C_{18}H_{38}$ e $C_{22}H_{46}$. Male e colaboradores concluíram que para a série de moléculas contendo o Mo como metal, os valores de eficiência da gaiola foram proporcionais à $massa^{1/2}/raio^2$, como previsto por Noyes. Porém, a comparação entre as séries com Mo e W não pôde ser feita devido à diferença na energia de ligação destes metais.

1.4. Matrizes poliméricas

1.4.1. Poli(etileno glicol) (PEG)

Os poli(etileno glicóis) (PEGs) são polímeros sintéticos, solúveis em água e compostos por unidades oxietileno com grupos terminais hidroxila ($\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{OH}$) (Davidson, 1980). Estes polímeros apresentam uma combinação interessante de propriedades como estabilidade térmica e fotoquímica, lubricidade, solubilidade em água, baixa toxicidade e volatilidade e são disponíveis em uma ampla faixa de massas molares, desde líquidos viscosos até sólidos à temperatura ambiente (Davidson, 1980; Sánches-Soto *et al.*, 1990). Devido a essas características, os PEGs são utilizados em alimentos, pomadas, cremes cosméticos, loções e como carregadores inertes em vários medicamentos que necessitam de uma liberação lenta do princípio ativo (Davidson, 1980; Harris, 1992; Okano, 1998).

Uma das características muito interessantes dos PEGs é a sua alta solubilidade em água. À temperatura ambiente, o PEG é completamente miscível com a água em todas as proporções e em todos os graus de polimerização (Bailey, 1976). Em contraste ao PEG outros poliéteres semelhantes ao PEG, como o poli(óxido de metileno) e o poli(óxido de trimetileno), não são solúveis à temperatura ambiente, enquanto o poli (óxido de propileno) é apenas parcialmente solúvel em água (Baley, 1959; Molyneux, 1983). Devido a sua baixa toxicidade, o uso interno de PEG em humanos possui a aprovação da “Food and Drug Administration” (FDA) dos E.U.A.. O PEG é imunogênico e é utilizado em meios de culturas de tecidos e para a preservação de órgãos. Além disso, o PEG pode ser imobilizado em superfícies para inibir a ação antigênica e para camuflar drogas evitando reações alérgicas (Harris, 1992). O PEG é vendido comercialmente como Colyte ou GoLYTELY na forma de pó para preparo de soluções administradas por via oral e é utilizado para a limpeza do cólon para exames de colonoscopia (endoscopia do cólon) (West Shore Endoscopy Center). Este polímero pode ser utilizado também para

encapsular enzimas utilizadas em várias terapias, como a adenosina deaminase utilizada para tratamento de doenças relacionadas com imunodeficiência, a superóxido-dismutase para terapia após transplantes de rim e estreptoquinase para terapias após cirurgias de coração. Vários outros usos para o PEG podem ser encontrados na literatura, sendo que um resumo deles pode ser encontrado nos livros “Poly(ethylene glycol) Chemistry – Biotechnical and Biomedical Applications” editado por J. Milton Harris e “Biorelated Polymers and Gels – Controlled Release and Applications in Biomedical Engineering” editado por Teruo Okano.

Mais recentemente, os PEGs têm sido utilizados para uma reação conhecida como “peguilação”, apresentando um grande potencial terapêutico e biotecnológico. Nestas reações, o grupo hidroxila (terminal) do PEG é ativado através de sua substituição por um grupo funcional eletrofílico. Como o PEG apresenta dois grupos hidroxilas terminais (-OH) normalmente um dos grupos terminais -OH é substituído por um grupo metoxila, tornando o PEG monofuncional. Este PEG monometoxilado é ativado através de várias maneiras: pode-se utilizar o cloreto cianúrico, o succinato, glutarato, etc. (Harris *et al.*, 2001). Após sua ativação o PEG é ligado a polipeptídeos, lipossomas, partículas e drogas não peptídicas. Esta reação permite que estes compostos “peguilados” não sejam reconhecidos no organismo como corpos estranhos, impedindo a ativação de macrófagos e evitando a destruição do princípio ativo antes que este atinja o sítio alvo (Veronese, 2001; Harris *et al.*, 2001; Greenwald, 2001).

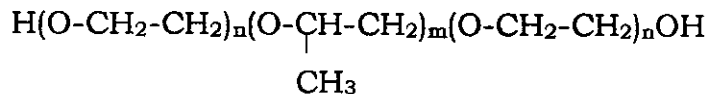
Suh e co-autores (2002) sintetizaram um carregador polimérico de gene que tem como alvo as células endoteliais angiogênicas. Estes pesquisadores utilizaram o PEG ativado com N-hidroxissuccinamida – sulfona conjugado com um polímero catiônico, a polietilenoimina (PEI) e um $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ integrin ligado a um peptídeo RGD, o ACDCRGDCFC, via um espaçador PEG, resultando no polímero PEI-g-PEG-RGD. Neste trabalho, é sugerido que o polímero PEI-g-PEG-RGD pode atuar como um transportador de DNA para terapia de gene, em analogia ao complexo PEI/DNA já existente. Estes pesquisadores observaram

que o complexo formado pelo DNA e o polímero PEI-g-PEG-RGD apresenta uma distribuição de tamanho mais uniforme do que o complexo PEI/DNA, uma alta especificidade e alta eficiência na transfecção. Além disso foi observado que a presença do PEG aumenta a solubilidade do complexo contendo o DNA, aumenta sua estabilidade e reduz sua citotoxicidade. Assim, estes pesquisadores concluem que este complexo pode ser utilizado para a terapia de gene *in vivo*, sendo especialmente adequado para a injeção sistêmica. Qiu e colaboradores (2003) preparam um copolímero baseado em PEG contendo múltiplos grupos tióis, que é capaz de formar o hidrogel *in situ*, quando injetado subcutaneamente. Neste trabalho foi utilizado o α,ω -diamino-poli(etileno glicol) e o ácido tritil-mercaptosuccínico para a reação de polimerização e o α,ω -divinilsulfona-poli(etileno glicol) (PEGDVS) como agente indutor do entrelaçamento das cadeias para a formação do hidrogel. Estes pesquisadores acompanharam a liberação de proteínas *in vitro* (albumina bovina ligada à fluoresceína) e *in vivo* (modelo de RANTES), onde observaram que este hidrogel pode liberar proteínas por um período prolongado, desde dias até várias semanas. Assim eles sugerem este copolímero como um novo biomaterial para o transporte de proteínas.

Outros exemplos podem ser encontrados na revisão escrita por Greenwald (2001) intitulado “PEG drugs: an overview” onde o autor revisa o avanço obtido nos últimos 5 anos em relação ao uso do PEG conjugado com drogas anti-câncer, drogas contendo grupos amino e propostas de aplicações das proteínas conjugadas.

1.4.2. Copolímero em bloco poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO)

O copolímero em bloco PEO-PPO-PEO (F-127) utilizado neste trabalho, apresenta a unidade de repetição:



onde $n = 95$ e $m = 64$. Este copolímero apresenta massa molar de aproximadamente $12.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e porcentagem de unidades de óxido de etileno de 70 % (Alexandridis, 1996). O copolímero em bloco PEO-PPO-PEO é solúvel em água e comercialmente disponível com os nomes poloxamer P 407 (produzido pela ICI, Inglaterra) ou pluronic F-127 (produzido pela BASF - Alemanha).

Copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO já vêm sendo utilizados em diversas aplicações industriais como detergentes, estabilizadores de dispersões, lubrificantes e na formulação de cosméticos (Schmolka, 1984) e de tintas (Winnik *et al.*, 1992). Na área farmacêutica, os copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO tem sido utilizados para a solubilização de princípios ativos insolúveis em água e para a sua liberação controlada (Yokoyama, 1992), bem como na cobertura de ferimentos de queimadura (Henry e Schmolka, 1989) e para a proteção de microorganismos contra danos mecânicos (Murhammer e Goochee, 1990). A toxicidade do copolímero em bloco F-127 é baixa, sendo tóxico apenas em doses altas (em torno de $137,5 \text{ mg/kg}$ de peso corpóreo) onde foi observado um significativo aumento dos triglicerídeos e do colesterol no soro, não afetando outros parâmetros químicos do sangue (Blonder *et al.*, 1999). Além destas propriedades, os copolímeros PEO-PPO-PEO apresentam gelificação térmica reversa (a gelificação ocorre com o aumento da temperatura) na faixa de concentração de 20-50% em massa. Tais características têm levado a pesquisas sobre o uso dos copolímeros PEO-PPO-PEO como possíveis sistemas de liberação de drogas em seres humanos (Gilbert *et al.*, 1986).

Wanka e co-autores (1994) determinaram o diagrama de fases para este copolímero (Fig. 6). Neste diagrama de fases pode-se observar que em temperaturas baixas (abaixo de $\sim 10^\circ\text{C}$) em toda a faixa de concentração, a solução contendo o copolímero F-127 se mantém como uma solução isotrópica. Estes pesquisadores mostraram através de medidas de tensão superficial que a concentração micelar crítica (cmc) para soluções contendo este copolímero é de $4 \times 10^{-3} \%$ em massa a $T=25^\circ\text{C}$ e $7 \times 10^{-1} \%$ em massa a $T=15^\circ\text{C}$. Assim, pode-se concluir que praticamente toda a região isotrópica é formada por soluções

contendo micelas, exceto na região com temperaturas e concentrações de F-127 muito baixas. Com o aumento da temperatura (acima de $\sim 20^\circ\text{C}$), as micelas se empacotam formando uma estrutura cúbica. Nesta região as soluções se apresentam na forma de gel. A energia envolvida nesta transição é muito pequena, sendo considerada uma transição praticamente atérmica. O valor de variação de entalpia é de aproximadamente $1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Wanka *et al.* 1990 e 1994), que é muito pequena se comparada com a energia envolvida no processo de micelização ($166\text{-}444 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Wanka *et al.*, 1990; Beezer *et al.*, 1998). Em temperaturas altas ocorre a fusão do gel, obtendo-se novamente um líquido. Segundo estes pesquisadores, nesta região cristais de F-127 coexistem com a solução contendo micelas ainda estruturadas na sua forma cúbica, porém a rigidez do gel é perdida.

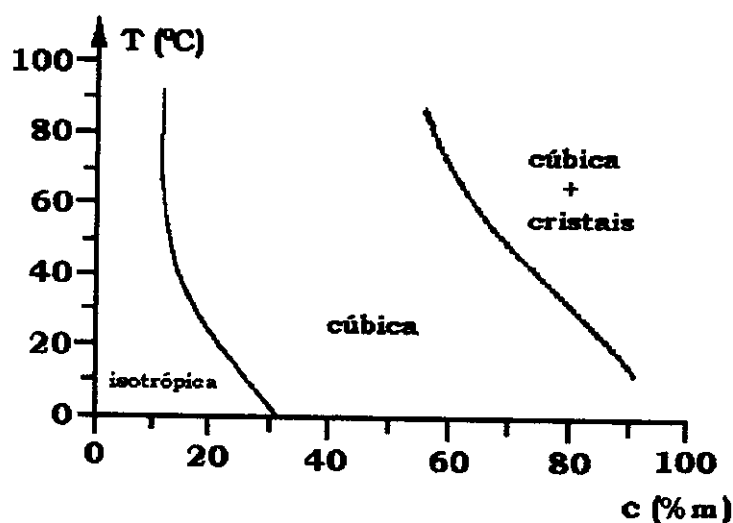


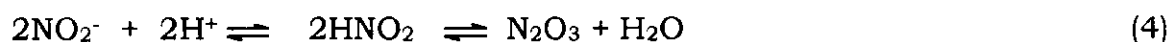
Figura 6. Representação do diagrama de fases do F-127 com base no trabalho de Wanka e colaboradores (1994)

Existem estudos da aplicação deste copolímero como veículo injetável intramuscular, subcutâneo, epidural (Guzmán *et al.*, 1992, Paavola *et al.*, 2000) como supositório líquido (Choi *et al.*, 1998) ou associados a outras formas de liberação controlada como micro e nanoesferas (Barrichello *et al.*, 1999).

1.5. PEG e F-127 como matrizes para incorporação de S-nitrosotióis

Recentemente, as pesquisas envolvendo sistemas de liberação controlada de drogas e outros agentes bioativos a partir de sistemas contendo polímeros, tem atraído a atenção de pesquisadores do mundo inteiro. As aplicações de sistemas de liberação controlada de drogas incluem liberação contínua durante dias/semanas/meses/anos e localizada, como em tumores (Huang e Brazel, 2001). Os veículos que prolongam a liberação de drogas são de grande interesse pois eles possibilitam uma maior seletividade da atividade farmacológica (Kim e Fassihi, 1997) e podem aumentar a absorção da substância ativa, permitindo a redução de sua concentração (Davidson, 1980). A presença de PEG em soluções de proteínas, por exemplo, altera substancialmente suas propriedades como a estabilidade e tempo de residência (Brucato e Pizzo, 1990). Na área farmacêutica, os copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO podem evitar a adsorção de proteínas, proteger proteínas e células, estabilizar partículas coloidais, prolongar seu tempo de circulação *in vivo*, transportar drogas na forma de micelas, géis e emulsões conjugando moléculas biologicamente ativas. Por exemplo, sabe-se que o NO[•] apresenta grande potencial como agente antimicrobioal, atuando na defesa do organismo frente a infecções causadas por protozoários, como a *Leishmania* (Zeina *et al.*, 1997; Mossalayi *et al.*, 1999; Brunet, 2001; Arevalo *et al.*, 2002). Doadores de NO[•] já vêm sendo incorporados em matrizes e utilizados no tratamento da Leishmaniose cutânea em humanos. Zeina e colaboradores utilizaram a nitroglicerina (NG) como doador de NO[•] incorporado em emplastos auto-adesivos. O tratamento dos pacientes foi feito durante 7 dias, trocando-se o emplasto a cada 24 horas. Estes pesquisadores observaram uma considerável redução do tamanho da lesão e as evidências histológicas mostraram a ausência de infecção por *Leishmania*. Davidson (2000) e colaboradores utilizaram o nitrito de potássio como agente doador de NO[•]. Estes pesquisadores basearam-se no equilíbrio que ocorre em meio ácido mostrado na equação 4. Assim, eles prepararam um creme contendo KNO₂ (como doador de NO[•]), um creme contendo KCl, e outros dois contendo ácidos,

um com ácido ascórbico (ASC) e outro com ácido salicílico (SAL), como sendo os meios ácidos necessários para a liberação de NO[•] a partir do KNO₂. O tratamento foi feito utilizando-se os cremes em conjunto, os pacientes deveriam misturar o creme de KNO₂ com o de ASC, ou o de KNO₂ com o de SAL, ou o de KNO₂ com o de KCl. Neste trabalho foi observado que somente 28% dos pacientes (11 pacientes de 40) apresentaram melhora e somente 12% (5 dos 40 pacientes) foram curados após 2 meses de tratamento.



López-Jaramillo e colaboradores (1998) obtiveram resultados melhores. Eles prepararam um creme contendo S-nitrosopenicilamina. Esses pesquisadores relataram que após o tratamento de 30 dias com aplicações a cada 4 h (exceto durante o sono), todas as lesões haviam sido curadas, foi observada a ausência de *Leshmania* nas culturas de células e não foram observados efeitos colaterais. Esses exemplos ilustram a versatilidade e o potencial dessa classe de compostos como matrizes para a incorporação de S-nitrosotióis.

A obtenção de S-nitrosotióis termicamente estáveis, capazes de liberar NO[•] apenas fotoquimicamente, apresenta um interesse adicional e bastante recente nos tratamentos denominados de fotoquimioterapia. Nestes tratamentos o NO[•] pode ser liberado em tecidos específicos pela irradiação com luz visível, exercendo nos mesmos uma ação citotóxica, tumoricida (Wood *et al.*, 1996; Sexton *et al.*, 1994).

Portanto, é de grande importância observar o efeito destas matrizes no comportamento térmico e fotoquímico de doadores de NO[•] (tanto de nitrosotióis como do NPS), devido à possibilidade de uma liberação controlada de NO[•] e pelo seu potencial em aplicações na área farmacêutica.

2. Objetivos

- Desenvolver um sistema controlado de síntese de S-nitrosotióis em matrizes aquosas e de PEG puro.
- Caracterizar o comportamento térmico e fotoquímico de liberação de NO[•] a partir dos S-nitrosotióis sintetizados e a partir do NPS em solução aquosa e em matrizes de PEG e hidrogéis de PEO-PPO-PEO.
- Caracterizar e modular o comportamento térmico de fases de hidrogéis de PEO-PPO-PEO contendo S-nitrosotióis.
- Analisar e interpretar o efeito das matrizes nas cinéticas de liberação térmica e fotoquímica de NO[•] a partir dos doadores, com base em modelos de recombinação radicalar

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Os tióis, as matrizes de PEG e o tampão fosfato pH = 7.4 (PBS) utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corp.. Os tióis utilizados foram a cisteína (CiSH) com massa molar (MM) de 121,2 g mol⁻¹, a N-acetilcisteína (NAC) com MM = 163,2 g mol⁻¹ e a glutathiona (GSH) com MM = 307,3 g mol⁻¹. Os PEGs utilizados foram os de massa molar nominal (MM_n) de 200, 300, 400 e 600. Estes PEGs apresentam a distribuição de MM de 190-210 g mol⁻¹ no caso do PEG 200, de 285-315 g mol⁻¹ para o PEG 300, de 375-420 g mol⁻¹ para o PEG 400 e de 570-630 g mol⁻¹ para o PEG 600. Estas matrizes e os tióis foram utilizados sem nenhuma purificação adicional. Para o preparo de todas as soluções aquosas foi utilizada água desionizada, Milli-Q. O copolímero em bloco F-127 (EO₉₅-PO₆₄-EO₉₅) com MM $\approx$ 12.000 g mol⁻¹ foi cedido pela ICI e foi utilizado sem nenhuma purificação adicional.

No sistema de nitrosação foram utilizados cilindros de NO* gasoso e N₂, adquiridos da White Martins e um cilindro de ar sintético (N₂/O₂, 79/21 v/v, H₂O < 2 ppm, THC, CO + CO₂ < 0,3 ppm), adquirido da Air Liquide. O KMnO₄ utilizado no sistema foi adquirido da Synth.

Para a síntese por via úmida foram utilizados HCl e éter etílico adquiridos da Synth, NaNO₂ da Sigma-Aldrich Corp. e acetona da Merck.

Na caracterização dos produtos formados, foram utilizados cistina comercial adquirida da Nuclear, sulfanilamida e cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEDD) da Sigma-Aldrich Corp., HCl da Synth e NaNO₂ da Merse.

Como seqüestrador de radicais tiila foi utilizado *trans-trans*-2,4-hexadien-1-ol adquirido da Sigma-Aldrich Corp..

3.2. Descrição do sistema de nitrosação

Na primeira etapa deste trabalho foi desenvolvido um sistema de nitrosação utilizando-se uma mistura gasosa de NO*/O₂, que produz o agente nitrosante responsável pela S-nitrosação dos tióis.

As soluções aquosas de RSNOs foram preparadas na faixa de concentração de 1×10^{-4} a 6×10^{-2} mol L⁻¹. Em matrizes de PEG foram utilizadas concentrações expressas em porcentagem em massa (% m/m), que variaram de 0,03 a 1% m/m. Os RSNOs em soluções aquosas e em matrizes de PEG foram sintetizados nas próprias soluções. As soluções de RSH (precursores dos RSNOs) para a síntese em solução aquosa e em matriz de PEG, foram preparadas por simples pesagem utilizando-se uma balança analítica e a dissolução foi feita utilizando-se um agitador magnético (Fisaton). A reação de nitrosação foi feita logo após a dissolução ter sido completada, isto é, todas as reações de síntese foram feitas em soluções de RSH recém preparadas.

A figura 7 mostra o sistema de nitrosação desenvolvido. Neste sistema, os gases provenientes dos cilindros são conduzidos através de tubos de polietileno, passando pelos fluxômetros (Sigma-Aldrich Corp.).

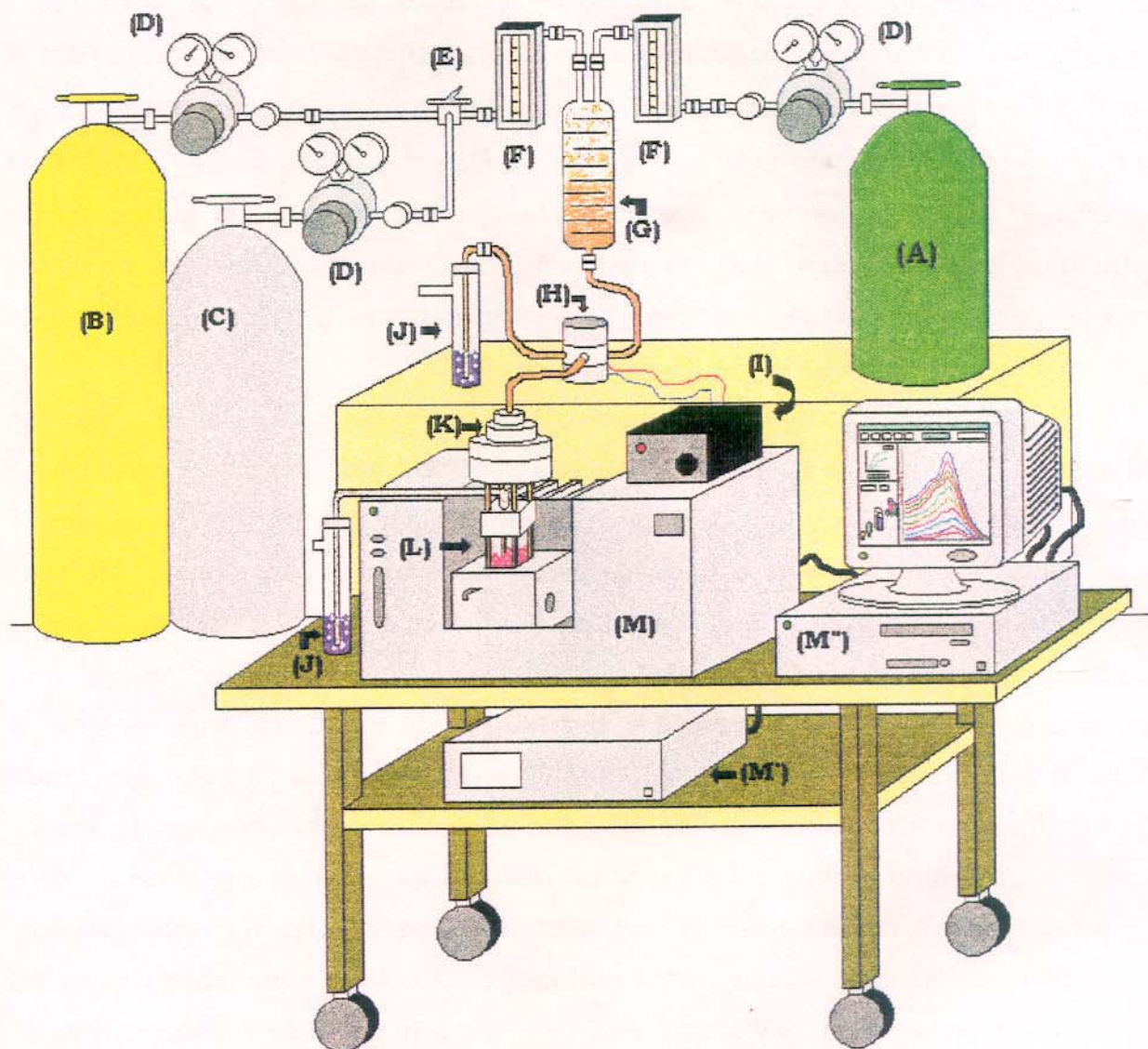


Figura 7. Apresentação esquemática do sistema de nitrosação com todos os seus componentes principais. Onde (A) cilindro de NO^* , (B) cilindro de ar sintético, (C) cilindro de nitrogênio, (D) válvulas reguladoras de pressão dos cilindros, (E) torneira em T, (F) fluxômetros para medição do fluxo ou vazão de gás, (G) misturador de gases, (H) válvula solenóide, (I) controlador da válvula solenóide, (J) frasco para descarte do excesso da mistura gasosa, (K) frasco de equalização de pressão e distribuição da mistura gasosa, (L) frasco de reação, (M) espectrofotômetro UV/Vis para o acompanhamento da reação, (M') controlador de temperatura do suporte termostatzado com sistema Peltier e (M'') micro computador interfaceado com o espectrofotômetro para o monitoramento da reação.

Os gases chegam até o misturador de gases (de vidro), onde ocorre a reação entre o $\text{NO}^\bullet$ e O_2 , formando os óxidos de nitrogênio necessários para a reação de nitrosação. A razão $\text{NO}^\bullet:\text{O}_2$ utilizada em todas as sínteses foi fixada em 5,6:5,6 mL/min para evitar excesso de O_2 em relação ao $\text{NO}^\bullet$. Todas as conexões foram feitas com peças de teflon. Os fluxos dos gases foram controlados através das válvulas dos próprios cilindros. A mistura de gases passa por uma válvula solenóide (Cole Parmer) com três saídas, sendo controlada através de um circuito eletrônico.

O circuito eletrônico foi confeccionado para este sistema com o planejamento e auxílio do Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP. A válvula solenóide tem por finalidade desviar o fluxo de gases (que se mantém constantemente direcionado para o frasco de descarte) para o frasco de reação. Para a obtenção de uma mistura gasosa homogênea foi utilizado um frasco de reação com sistema de equalização de pressão e distribuição da mistura gasosa em quatro saídas. O frasco de reação foi conectado a uma saída para os gases (por onde foi eliminado o excesso de gás) sendo este, conectado também a um frasco de descarte. O tempo de borbulhamento da mistura gasosa foi controlado através de pulsos com duração de tempo regulável. Estes pulsos foram controlados por um circuito eletrônico acionado manualmente. O acompanhamento da reação foi feito na região do UV/Vis utilizando-se o espectrofotômetro de arranjo de diodos, e o frasco de reação utilizado foi uma cubeta de quartzo ou de poliestireno de 1 cm de caminho ótico. Após a síntese, o sistema é lavado com um fluxo de gás N_2 , que foi acoplado ao sistema através de uma torneira em T que permite a passagem de N_2 ou ar sintético. Após a reação de nitrosação, as soluções foram ou estocadas a -18°C , para testes de estabilidade durante estocagem ou submetidas a acompanhamento cinético da liberação de $\text{NO}^\bullet$ a partir dos RSNOs contidos nestas soluções. Este sistema, juntamente com o método de síntese foram submetidos a um pedido de patente junto ao INPI (de Oliveira *et al.*, 2000).

3.3. Síntese de GSNO por via úmida

A GSNO, que pode ser precipitada e armazenada na forma sólida, foi sintetizada por via úmida, de acordo com o procedimento descrito por Hart (1985). Cerca de 1,5 g de GSH foram dissolvidas em 8 mL de HCl 0,9 N. Foram adicionadas 0,3 g de NaNO₂ e a solução foi colocada em banho de gelo (T~4° C) sob agitação magnética durante 40 min. Ainda sob agitação e em banho de gelo, foram adicionados 10 mL de acetona mantendo-se a agitação por mais 10 min, onde ocorre a precipitação da GSNO. O sólido foi filtrado e lavado 5 vezes com 5 mL de H₂O resfriada, 5 vezes com 5 mL de acetona e 3 vezes com 1 mL de éter etílico. Finalmente, o sólido foi seco utilizando-se um liofilizador (FTS Systems, modelo VP 50R) por um período de 24 horas. A GSNO obtida foi guardada em um frasco protegido da luz, colocado dentro de outro recipiente hermeticamente fechado contendo agente secante, num refrigerador.

3.4. Incorporação e caracterização dos RSNOs em géis de copolímero em bloco F-127.

Para a preparação de soluções de copolímero em bloco F-127 foram utilizadas concentrações expressas em porcentagem em massa (% m/m) de copolímero e mol g⁻¹ de hidrogel para os RSH e RSNO. Foram utilizadas concentrações de 10 e 20,5 % m/m de copolímero, 13,8 mmol g⁻¹ para GSNO, 15,1 mmol g⁻¹ para GSH e 28,4 mmol g⁻¹ para NAC e SNAC. As concentrações de RSNO e RSH foram ajustadas com o intuito de manter a concentração de copolímero e a temperatura de gelificação fixas. No caso dos géis de F-127, os RSNOs não foram sintetizados na própria solução contendo o copolímero, devido à formação de espuma estável. Nestes casos, os RSNOs foram sintetizados em solução aquosa e então incorporados às soluções contendo o copolímero em bloco.

Para preparar as soluções com o copolímero em bloco F-127 foi utilizado o método descrito por Schmolka (1972). Os flocos de F-127 foram pesados em

balança analítica e dissolvidos em água desionizada (Milli-Q), utilizando-se agitação magnética. Durante a dissolução a solução foi mantida resfriada a uma temperatura de $\sim 5^{\circ}\text{C}$, utilizando-se um banho de gelo. A agitação foi controlada de forma a evitar a formação de espuma estável, tendo em vista que este copolímero em bloco é um surfatante. A solução contendo o F-127 foi mantida resfriada ($\sim 10^{\circ}\text{C}$) durante um período de pelo menos 8 h para ocorrer a dissolução completa do F-127. O RSNO foi incorporado a esta matriz através da mistura de uma solução aquosa contendo o RSNO com a solução de F-127. A mistura foi agitada com agitador magnético, em banho de gelo para manter a solução de F-127 na sua forma líquida (sem a formação do gel), durante cerca de 30 min. Após a incorporação do RSNO na matriz contendo o copolímero em bloco F-127, a solução foi transferida para uma cubeta. A cubeta contendo a solução foi colocada no suporte termostatizado, onde foi termostatizada durante 10 min a 37°C para que ocorresse a formação do gel.

As caracterizações dos processos de micelização e gelificação foram feitas utilizando-se medidas calorimétricas e espectrofotométricas. As medidas de calorimetria diferencial de varredura de alta sensibilidade (HSDSC) foram feitas em um DSC de alta sensibilidade, modelo VP (Microcal Inc.). Para estas medidas foram utilizados 0,2 mL das soluções de F-127 puro (com concentrações de 20,5 e 10% m/m) e contendo NAC, SNAC, GSH e GSNO (28,8; 15,1 e 13,8 mmol g^{-1} de hidrogel respectivamente). A velocidade de aquecimento utilizada foi de 15 graus h^{-1} na faixa de temperatura de $3,5$ a 45°C . Todas as medidas foram feitas utilizando-se a água desionizada (Milli-Q) como referência. Os valores de ΔH associados com os picos endotérmicos foram calculados utilizando-se o programa MicroCal Origin – DSC, versão 5.0.

A caracterização espectroscópica do processo de gelificação foi feita utilizando-se um espectrofotômetro com arranjo de diodos (Hewlett-Packard, modelo, 8453) com suporte para cubeta com temperatura controlada por sistema Peltier. Este suporte permitiu a aquisição de espectros durante o aquecimento com incrementos de 1°C , na faixa de $20 - 45^{\circ}\text{C}$. A velocidade de aquecimento do aparelho foi de $5,5$ graus min^{-1} . Antes da aquisição de cada

espectro a amostra foi termostatizada durante 10 minutos. Os acompanhamentos foram feitos em $\lambda = 700$ nm, em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico utilizando-se ar como referência. Assim, foi possível se obter curvas de variação de absorbância *versus* temperatura.

3.5. *Decomposição dos RSNOs - Acompanhamento cinético das decomposições (UV/Vis) e caracterização dos produtos formados.*

A estabilidade dos RSNOs foi caracterizada através do monitoramento espectroscópico da variação das bandas de absorção características destes compostos com o tempo. Os acompanhamentos cinéticos na região do UV/Vis foram feitos em $\lambda = 336$ e 545 nm, utilizando-se um espectrofotômetro com arranjo de diodos, (HP). Para estes experimentos foram utilizadas cubetas de quartzo para os acompanhamentos em $\lambda = 336$ nm e de poliestireno para acompanhamentos em $\lambda = 545$ nm, ambas com 1 cm de caminho ótico.

As variações de absorbância foram convertidas para variações de concentração de RSNO, através da divisão dos valores de absorbância (A) pela absortividade molar (ϵ). Utilizando-se a equação 6, foram obtidos variações de $[\text{NO}^*]$ em função do tempo.

$$[\text{NO}^*] = [\text{RSNO}]_i - [\text{RSNO}]_t \quad (6)$$

onde $[\text{RSNO}]_i = (A_{\text{RSNO}})_i / \epsilon_{\text{RSNO}}$ é a concentração inicial de RSNO e $[\text{RSNO}]_t = (A_{\text{RSNO}})_t / \epsilon_{\text{RSNO}}$ é a concentração de RSNO no tempo t.

As velocidades iniciais de liberação de NO^* foram obtidas pela regressão linear das curvas cinéticas, de acordo com a equação 7. O método de velocidades iniciais permite a comparação das velocidades de liberação de NO^* a partir de seus doadores utilizando-se curvas cinéticas curtas, com tempo total de acompanhamento de cerca de 2 h.

$$v_i = \frac{\Delta[\text{NO}^*]}{\Delta t} \quad (7)$$

onde $\Delta[\text{NO}^\bullet]$ e Δt são a variação de concentração de $\text{NO}^\bullet$ e o intervalo de tempo, respectivamente.

A regressão linear foi aplicada para os intervalos iniciais das curvas cinéticas, correspondentes a cerca de 10% da extensão da reação. Cada ponto da curva cinética corresponde a uma média de dois experimentos, e as barras de erros correspondem às estimativas dos desvios padrões de duplicatas. As curvas cinéticas apresentadas na forma de variação de absorbância em função do tempo também foram normalizadas utilizando-se uma equação 8.

$$\text{Abs}_{\text{norm}} = \text{Abs}_t + (1 - \text{Abs}_i) \quad (8)$$

onde, Abs_{norm} é o valor de absorbância normalizada, Abs_t é a absorbância no tempo t e Abs_i é o valor de absorbância inicial.

O acompanhamento da reação de decomposição utilizando-se o seqüestrador de radicais tiila *trans,trans*-2,4-hexadien-1-ol (HD) foi feita nas soluções de RSNO $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, dissolvendo-se cerca de 0,017 g de HD em 3 mL da solução de RSNO.

3.5.1. Caracterização do $\text{NO}^\bullet$ liberado por espectroscopia no infravermelho (IV)

A caracterização espectroscópica do $\text{NO}^\bullet$ na região do IV, foi feita utilizando-se um espectrofotômetro FTIR (Nicolet – modelo 502) na faixa de $4000 - 800 \text{ cm}^{-1}$. Nesta região foi possível detectar o espectro roto-vibracional do $\text{NO}^\bullet$. Para a obtenção deste espectro foi utilizada uma cela desmontável de IV para gases com 50 mm de caminho ótico e janelas de CaF_2 (Sigma-Aldrich Corp.). Para evitar o vazamento dos gases coletados foi aplicado um filme de graxa de silicone entre as janelas e os anéis de vedação de silicone da cela. Uma solução de SNAC 1% m/m em matriz de PEG 400 foi irradiada em uma cubeta de quartzo acoplada à cela de gás (Fig. 8). A irradiação foi feita por cerca de 3 h com luz UV/Vis utilizando-se uma lâmpada de vapor de Hg de 100 W (Oriol).

Esse sistema foi evacuado previamente para evitar a formação de outros gases como $\text{NO}_2^\bullet$, N_2O_3 e N_2O_4 (eqs. 9 -11).

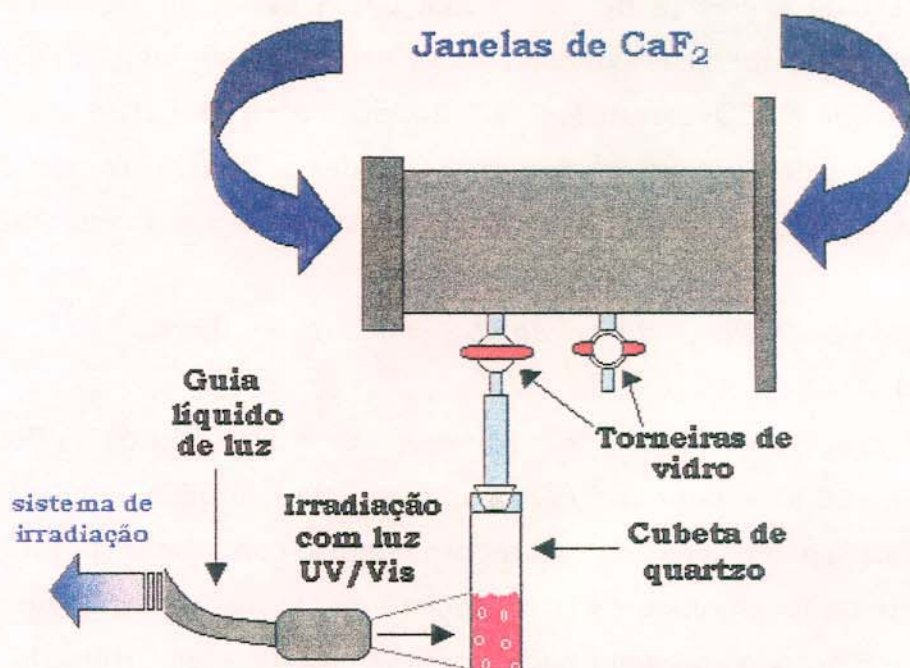
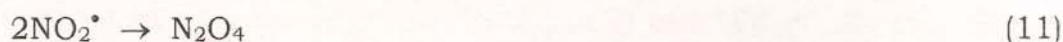


Figura 8. Representação esquemática do aparato montado para a detecção do $\text{NO}^\bullet$ gasoso liberado na fotólise dos RSNOs.

3.5.2. Caracterização da cistina formada por UV/Vis

O espectro no UV/Vis foi utilizado para a confirmação da formação de cistina como produto da decomposição dos RSNOs. Esta caracterização foi feita através da comparação entre os espectros da cisteína, da cistina comercial e da CiSNO irradiada com luz UV/Vis, durante 1 h utilizando-se uma lâmpada de vapor de Hg de 100 W (Oriel). A concentração das três soluções foi de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.5.3. Detecção de NO_2^- pelo Método de Griess

Este método se baseia na detecção espectroscópica da reação da sulfanilamida com o NO_2^- , formando um intermediário que reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEDD) em meio ácido, resultando em azo corante com $\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$ (Cook *et al.*, 1996). Para este experimento foi utilizada $\text{CiSNO } 2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sulfanilamida $5,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e NEDD $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $\text{HCl } 4 \text{ mol L}^{-1}$. A curva de calibração foi feita utilizando-se estas mesmas concentrações de sulfanilamida, NEDD, HCl e as concentrações de NaNO_2 foram 3, 5, 10, 25, 50, 75 e $100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Para a curva de calibração as soluções foram incubadas a 25°C durante 10 min e a amostra com CiSNO foi deixada no escuro à temperatura ambiente durante 6 h.

3.6. Fotólise dos RSNOs – descrição do sistema de irradiação

A figura 9 mostra o sistema de irradiação utilizado nos acompanhamentos cinéticos das reações de fotólise no UV/Vis. O espectrofotômetro foi colocado sobre uma mesa com rodas possibilitando o deslocamento de todo o sistema para o acoplamento dos sistemas de nitrosação e irradiação. Em todos os acompanhamentos cinéticos, foi utilizado o sistema de agitação magnética do próprio suporte de cubetas do espectrofotômetro. Foram feitas irradiações contínuas, incidindo-se o feixe de luz na face superior da cubeta, através do guia líquido de luz. Essa mesma face foi protegida com uma placa de quartzo para reduzir o contato entre as soluções a serem irradiadas e o ar. Foi aplicado um filme de graxa de silicone (CVC 97-GBR) entre a cubeta e a placa para se obter uma melhor vedação entre estas duas superfícies. A aquisição de espectros foi controlada pelo programa de cinética Multicell Kinetics Software – HP 89532K (Hewlett Packard).

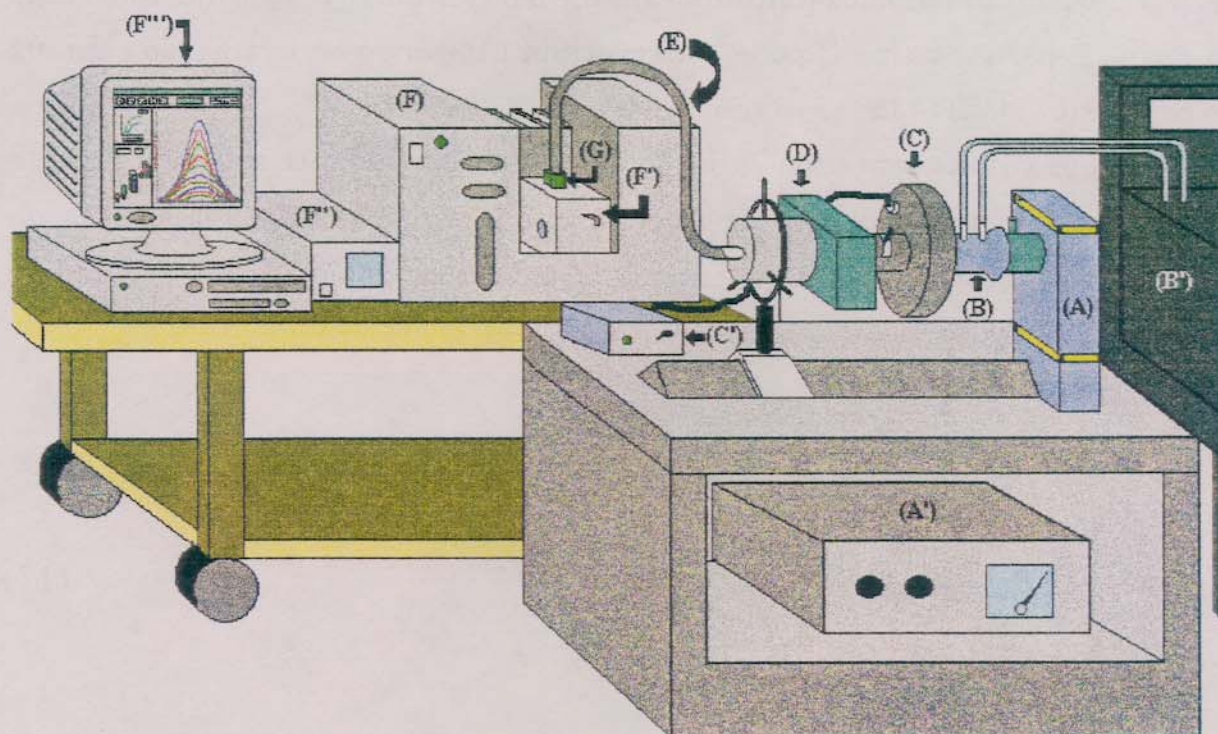


Figura 9. Representação esquemática do sistema de irradiação. (A) Lâmpada de vapor de Hg (Oriell Corp. ou Philips. de 100, 125 ou 200 W), (A') fonte de alimentação da lâmpada (Oriell Corp.), (B) filtro de água com camisa de água termostatzada (Oriell Corp.), (B') banho termostatzado para a refrigeração do filtro de água (Ética), (C) obturador eletromecânico (Oriell Corp.), (C') controlador do obturador eletromecânico (Oriell Corp.), (D) Filtro ótico (Carl Zeiss M4-QIII), (E) guia líquido de luz (Oriell Corp.), (F) espectrofotômetro (HP 8453), (F') suporte termostatzado para as cubetas (HP), (F'') controlador de temperatura do suporte (F''') microcomputador interfaceado com o espectrofotômetro, (G) cubeta de quartzo contendo a solução.

Para as fotodecomposições utilizando-se o filtro ótico com comprimentos de onda de irradiação no intervalo de 300 a 400 nm, foi possível calcular o rendimento quântico (Φ) de decomposição dos RSNOs. Nestes casos foi utilizado o Aberchrome® 540 como actinômetro químico. O Aberchrome® 540 é uma fulgida na forma E (anidrido succínico ((E)- α -(2,5-dimetil-3-furiletilideno)(isopropilideno)) e é um corante fotocromico que sofre uma rotação com formação de anel quando é irradiado com $\lambda > 300$ nm (eq. 12). A formação deste anel resulta em um corante vermelho na forma C (anidro 7,7a-dihidro-

2,4,7,7,7a-pentametilbenzo[b]furano-5,6-dicarboxílico). A reação de conversão da forma E para a forma C pode ser revertida utilizando-se irradiação com luz na região do visível (435 – 545 nm).

A figura 10 mostra uma variação espectral representativa obtida durante a irradiação de uma solução de Aberchrome ® 540 em tolueno. Através do aumento na absorbância em 494 nm é possível calcular o fluxo de fótons de acordo com a equação 13.

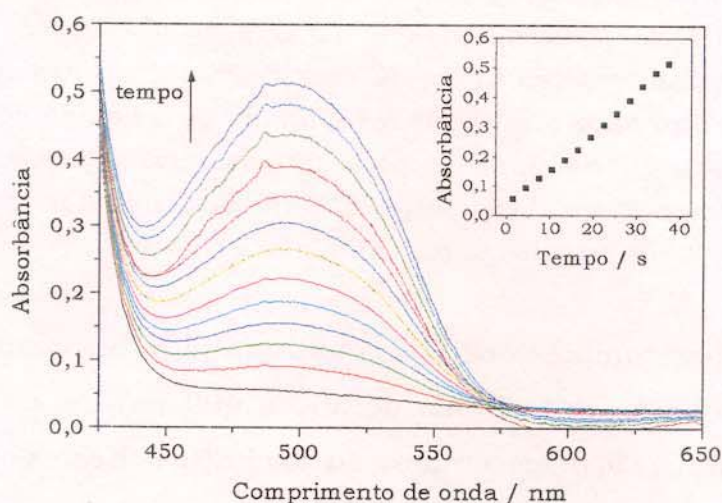
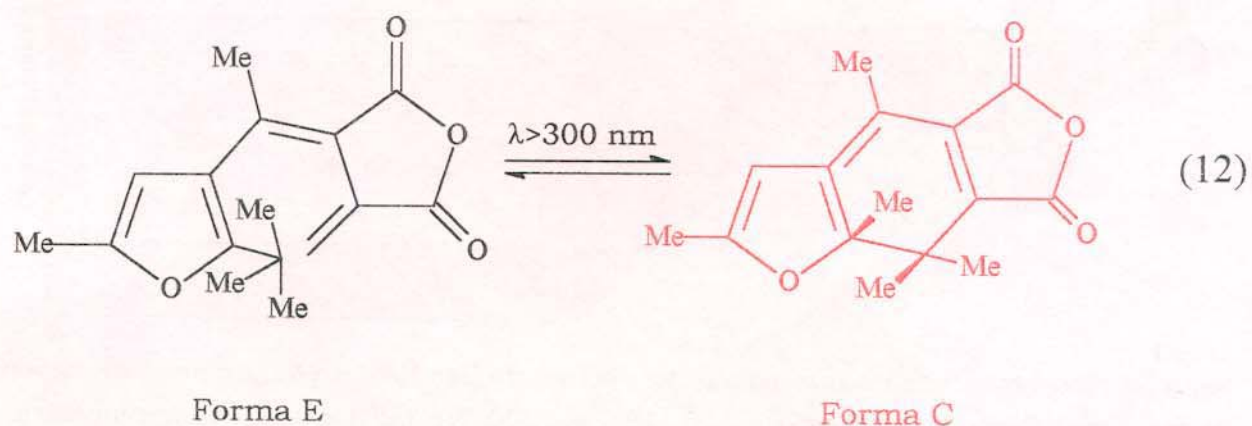


Figura 10. Variação espectral obtida durante a irradiação do Aberchrome com filtro com $300 < \lambda < 400 \text{ nm}$ e lâmpada de vapor de Hg de 200W. No detalhe está apresentada a curva cinética correspondente à variação espectral. O solvente utilizado é o tolueno. $[Ab] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, intervalo entre os espectros = 3 s.

$$I = \frac{A.V.N}{\phi_C \cdot \epsilon \cdot t} \text{ fótons s}^{-1} \quad (13)$$

onde: V= volume da solução irradiada em dm³

N = número de Avogadro

ϕ_c = rendimento quântico de fotociclização do Aberchrome irradiado na faixa de 310 a 370 nm (0,20) (Heller e Langar, 1981).

ϵ = 8200 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ em 494 nm

t = tempo (s)

Assim, para os experimentos onde foi utilizado o filtro ótico que permite a passagem de 300< λ <400 nm, foi possível fazer o cálculo do rendimento quântico, possibilitando comparações quantitativas.

3.7. Descrição dos outros equipamentos e aparatos utilizados neste trabalho.

3.7.1. Medidas de fotólise de pulso

Para as medidas de fotólise de pulso feitas no IQ/USP de São Paulo, foi utilizado um laser Quantel YG 660 Nd/YAG com $\lambda_{\text{irr}} = 355$ nm (segundo harmônico do laser) com $\lambda_{\text{acomp.}} = 336$ nm. Os pulsos tiveram 8 ns de duração e foram acumulados 10 pulsos para o aumento da razão sinal ruído. A potência do laser foi reduzida para valores < 30 mJ pulso⁻¹. As medidas foram feitas em solução aquosa e em PEG/H₂O na concentração de 0,03% m/m ($\sim 1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), utilizando-se cubetas com a 4 faces polidas. A figura 11 mostra uma representação esquemática do equipamento utilizado nas medidas de fotólise de pulso. A fotólise por pulso permite a criação de uma situação fora do equilíbrio químico em um intervalo de tempo curto. Isso permite que espécies reativas como os radicais, as moléculas no estado excitado e os íons instáveis possam ser produzidos em quantidades suficientemente altas permitindo sua observação direta. A resolução temporal de sistemas convencionais utilizados para fotólise é da ordem de segundos, enquanto na fotólise por pulsos essa resolução é da ordem de nanosegundos (Cox, 1994).

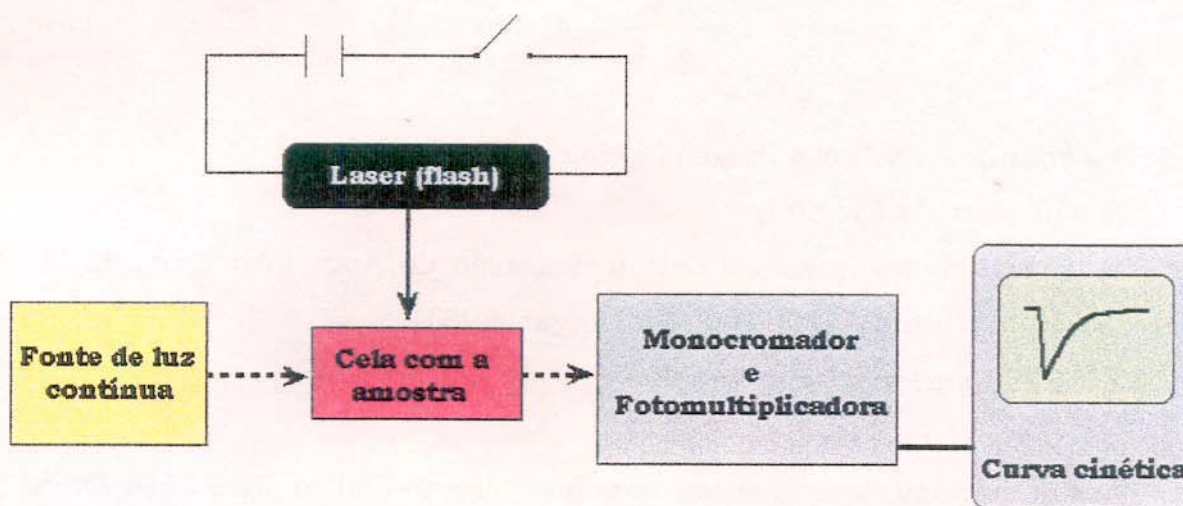


Figura 11. Representação esquemática do equipamento de fotólise de pulso.

3.7.2. Medidas de viscosidade

Para as medidas de viscosidade foi montada uma cuba com paredes de vidro e três faces desta cuba foram revestidas externamente com isopor (como isolante térmico). Para a termostatização da cuba foi colocada uma série de tubos de cobre conectados entre si e acoplados a um banho termostatizado. Para as medidas de tempo de escoamento foi utilizado um viscosímetro de Ostwald (viscosímetro capilar) que foi termostatizado dentro da cuba de vidro. A figura 12 mostra a representação esquemática da cuba de vidro com o sistema de termostatização acoplado ao banho termostático com o viscosímetro de Ostwald.

Com este viscosímetro foram medidos os tempos de escoamento de uma solução de GSNO 0,03% m/m e uma solução de NPS 0,4% m/m ambas em matriz de PEG 600 entre os pontos A e B (Fig. 12) nas temperaturas de 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 e 45,0 °C para a solução de GSNO e de 20,0; 30,0 e 40,0 °C para o NPS.

Estes tempos de escoamento foram convertidos em viscosidades intrínsecas, multiplicando-se o tempo de escoamento pela constante do

viscosímetro, determinada pelo fabricante. A viscosidade cinemática (utilizada neste trabalho) foi calculada através da multiplicação da viscosidade intrínseca pela densidade da solução em cada temperatura.

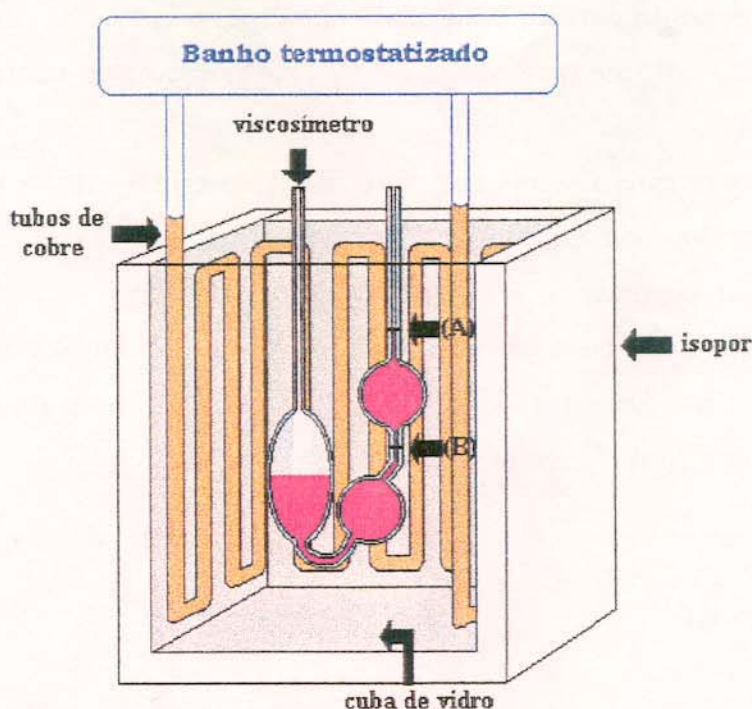


Figura 12. Representação esquemática da cuba termostaticada e do viscosímetro de Ostwald, utilizados para as medidas de tempo de escoamento de uma solução de GSNO 0,03% m/m e NPS 0,4% m/mm ambos em matriz de PEG 600. $T = 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0$ e $45,0$ °C para a solução de GSNO e $T = 20,0; 30,0$ e $40,0$ °C para a solução de NPS. (A) indica o ponto no qual o cronômetro é disparado e (B) indica o ponto no qual o cronômetro é desligado.

3.7.3. Medidas de densidade.

As medidas de densidade das soluções de GSNO 0,03% m/m e NPS 0,4% m/m ambas em PEG 600, foram feitas utilizando-se o densímetro (Anton Paar, modelo DMA 58), nas temperaturas de $20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0$ e $45,0$ °C para a solução de GSNO e $20,0; 30,0$ e $40,0$ °C para o NPS.

Este equipamento consiste em um tubo em forma de U dentro de um compartimento termostaticado com o sistema Peltier. Este tubo é estimulado

eletricamente a sofrer oscilações. Assim, a densidade da amostra é obtida através da medida eletrônica do período de oscilação, que é influenciado pela massa da amostra. As seções retas do tubo são consideradas as molas do oscilador e a direção do estímulo da oscilação é perpendicular ao plano formado pelo tubo em U. O volume que oscila é limitado por pontos protuberantes fixos dentro do sistema.

Assumindo-se que a temperatura é mantida constante, a densidade pode ser calculada através da equação 17, considerando-se as equações 14 - 16. Para este cálculo considera-se o tubo como um corpo oco com massa M , suspenso por uma mola com constante c . O volume do corpo oco (tubo) é então preenchido com uma amostra de densidade ρ . A frequência de oscilação deste sistema de massa e mola, é dada pela equação 14.

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{c}{M + \rho V}} \quad (14)$$

onde f é a frequência de oscilação, c a constante da mola, M a massa do tubo vazio, ρ a densidade da amostra e V o volume contido no tubo.

O período T pode ser descrito por

$$T = 2\pi \sqrt{\frac{M + \rho V}{c}} \quad (15)$$

assim,

$$\rho = T^2 \cdot \frac{c}{4\pi^2 \cdot V} - \frac{M}{V} \quad (16)$$

Substituindo-se os termos

$$A = \frac{c}{4\pi^2 \cdot V} \text{ e } B = \frac{M}{V}$$

Obtém-se

$$\rho = A.T^2 - B \quad (17)$$

As constantes A e B envolvem a constante da mola do oscilador, a massa do tubo vazio e o volume da amostra envolvido na oscilação. A e B são constantes e padronizados para cada oscilador. Estas constantes podem ser obtidas através de medidas de calibração, quando o oscilador é preenchido com substâncias de densidade conhecida. Neste caso foi utilizada a água como substância para a calibração (manual do densímetro) .

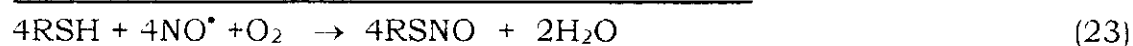
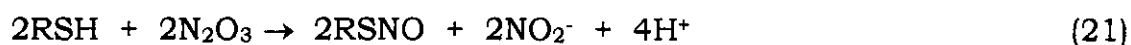
Para o oscilador usado neste equipamento, a exatidão das medidas é de $\pm 5 \times 10^{-5} \text{ g cm}^{-3}$ para um intervalo de densidade $\leq 0,5 \text{ g cm}^{-3}$ em torno do ponto de calibração.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - Síntese

Os nitrosotióis utilizados apresentam duas bandas características em 336 e em 545 nm (Fig. 13), atribuídas às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n_N \rightarrow \pi^*$ respectivamente. Os valores de ϵ variam de 800-1044 $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e de 14-20 $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ para as bandas de 336 e 545 nm respectivamente. Foi observado que o NO^* apenas, não é capaz de promover a reação de nitrosação, necessitando-se a presença de O_2 . Como já sugerido por Stamler e colaboradores (92) e Wink e colaboradores (94), o principal agente nitrosante deve ser o N_2O_3 , produto da reação do NO^* com o O_2 (eqs. 18 e 19). Além disso, Gow e co-autores (97) observaram que em condições fisiológicas o NO reage diretamente com os tióis na presença de um receptor de elétrons. Assim, a reação de S-nitrosação pode ser explicada considerando-se as reações e equilíbrios, abaixo, iniciando-se com a oxidação do NO^* . O NO_2^* reage com outro NO^* para a formação do N_2O_3 . Nas soluções aquosas a espécie N_2O_3 sofre

hidrólise de acordo com o equilíbrio 20. Nestes casos a disponibilidade da espécie N_2O_3 é altamente dependente do pH.



Como o pKa do HNO_2 é 3.36, acima deste pH o ácido nitroso deve estar dissociado deslocando o equilíbrio na direção da formação de nitrito. As soluções aquosas a serem nitrosadas apresentaram pH entre 2-3 (soluções de NAC e CiSH e S-nitrosações feitas por via úmida), pode-se considerar que o equilíbrio 20 está deslocado na direção de formação de N_2O_3 , sendo esta espécie o agente nitrosante. Nas matrizes de PEG o equilíbrio 20 não ocorre devido à ausência de H_2O , sendo também o N_2O_3 o agente nitrosante.

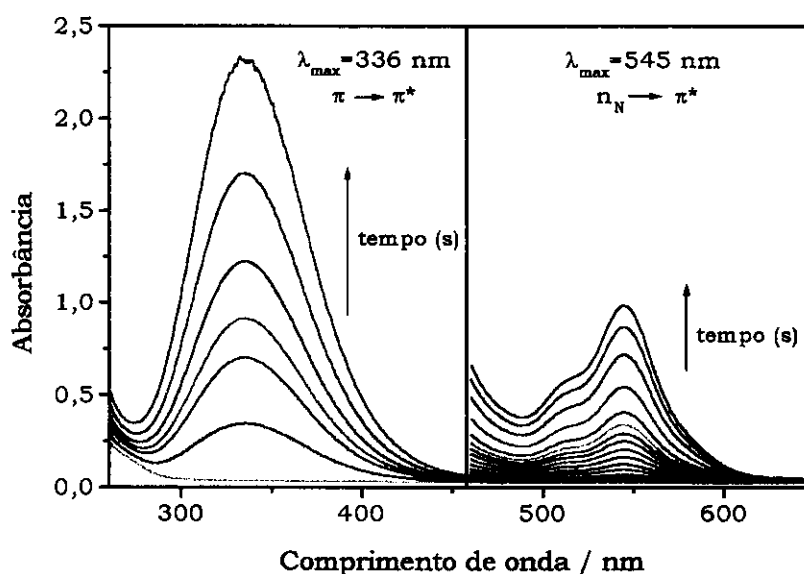


Figura 13. Variação espectral representativa obtida durante a síntese dos RSNOs. Espectros obtidos após cada pulso de borbulhamento da mistura gasosa $NO^{\bullet}/O_2$ de aproximadamente 2,5 segundos.

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema para a síntese dos RSNOs através do borbulhamento da mistura gasosa NO^*/O_2 . Este sistema permite o acompanhamento da formação dos RSNOs utilizando-se um espectrofotômetro UV/Vis. A figura 13 mostra a variação espectral representativa obtida durante a síntese dos RSNOs. Pode-se observar a formação das duas bandas características dos RSNOs em 336 e 545 nm.

Através do acompanhamento cinético da reação de S-nitrosação utilizando-se um espectrofotômetro UV/Vis, pode-se observar que a síntese atinge um máximo, que corresponde à condição estequiométrica da reação, como mostra a figura 14.

Para confirmarmos que o controle da reação é de fato estequiométrico, foram feitos experimentos de variação dos valores máximos de absorbância atingidos durante a síntese em função da concentração inicial do tiól. A figura 15 mostra que para os três tióis a variação do máximo de absorbância atingido em função da concentração do tiól é linear, comprovando que uma vez atingido o máximo de absorbância, atinge-se a condição estequiométrica da reação.

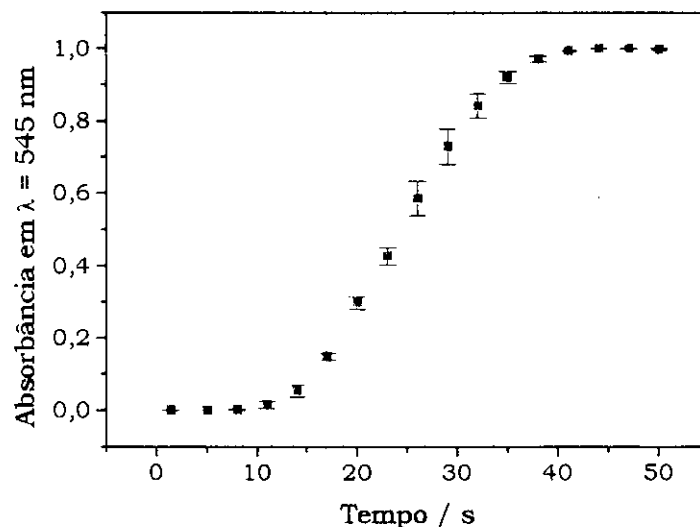


Figura 14. Curva cinética representativa obtida durante a síntese dos RSNOs. Os pontos foram obtidos após cada pulso de borbulhamento da mistura gasosa NO^*/O_2 de aproximadamente 3 segundos. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

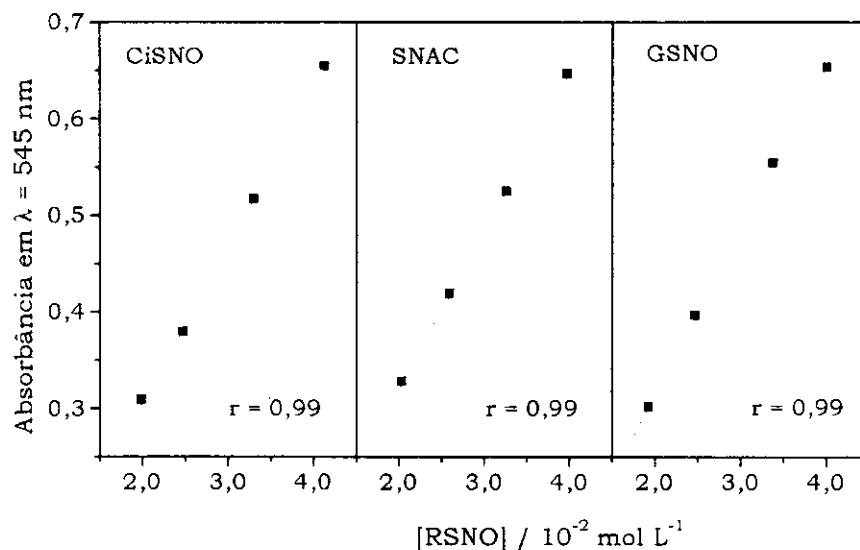


Figura 15. Variação dos valores máximos de absorvância atingidos durante a síntese por borbulhamento da mistura gasosa NO^*/O_2 , em função da variação da concentração inicial dos tióis. (A) CiSNO, (B) SNAC e (C) GSNO. O acompanhamento da variação de absorvância foi feito em $\lambda = 545 \text{ nm}$ em soluções aquosas com concentrações variando de aproximadamente $2 - 4 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25^\circ\text{C}$.

4.1.1 Efeito do excesso de agente nitrosante

As sínteses feitas utilizando-se o sistema de borbulhamento da mistura gasosa NO^*/O_2 mostraram que o ponto onde a reação de síntese é interrompida é um fator muito importante na decomposição dos RSNOs. Um pequeno excesso do agente nitrosante pode levar a uma aceleração da decomposição dos RSNOs como mostra a figura 16. Isto provavelmente está relacionado com a N-nitrosação dos grupos amino (Nguyen *et al.*, 1992; Rojas-Walker *et al.*, 1995; Tamir *et al.*, 1996) dos RSNOs, como mostram as reações do esquema 2. A reação de N-nitrosação tendo como produto o dímero RSSR e N_2O foi sugerida devido à detecção de N_2O após a decomposição acelerada da CiSNO em matriz de PEG 300, na presença de excesso de agente nitrosante. A figura 17 mostra a comparação entre a banda no IV em 2225 cm^{-1} obtida na decomposição

acelerada de CiSNO e N_2O borbulhado em matriz de PEG 300. Assim, esta banda foi atribuída à formação de N_2O .

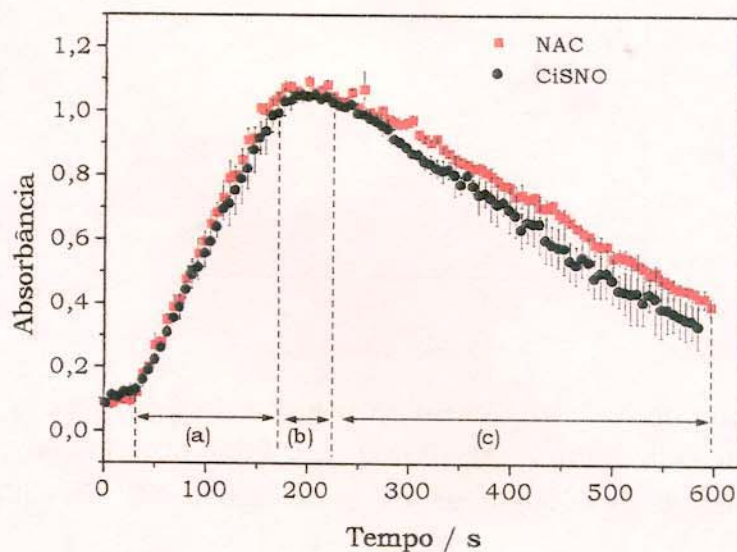
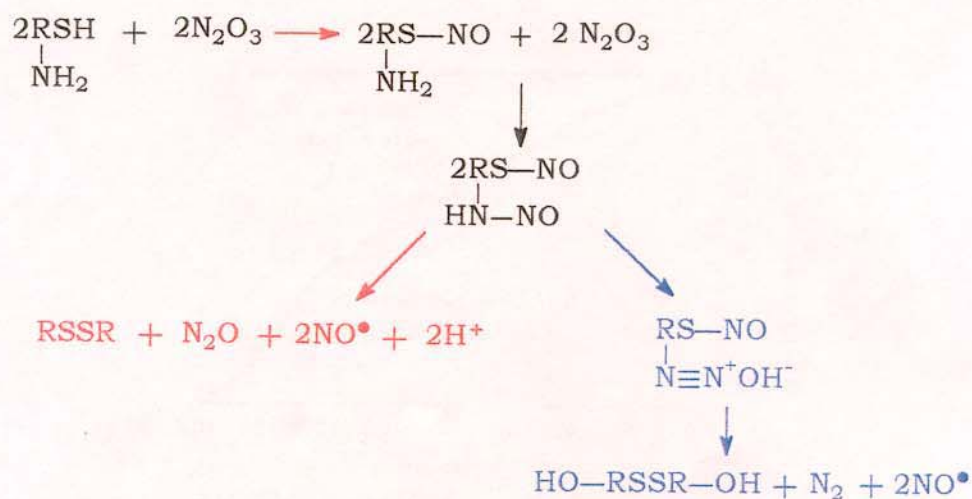


Figura 16. Curvas cinéticas obtidas durante a nitroação de soluções aquosas de SNAC (●) e CiSNO (■). (a) etapa associada ao crescimento da banda associada com a reação de S-nitroação, (b) etapa associada com o início da reação de N-nitroação e (c) etapa associada com a aceleração da quebra da ligação S-N induzida pela reação de desaminação.



Esquema 2. Reação de N-nitrosação de tióis em condição de excesso de agente nitrosante, levando, como consequência, a uma aceleração da decomposição dos S-nitrosotióis.

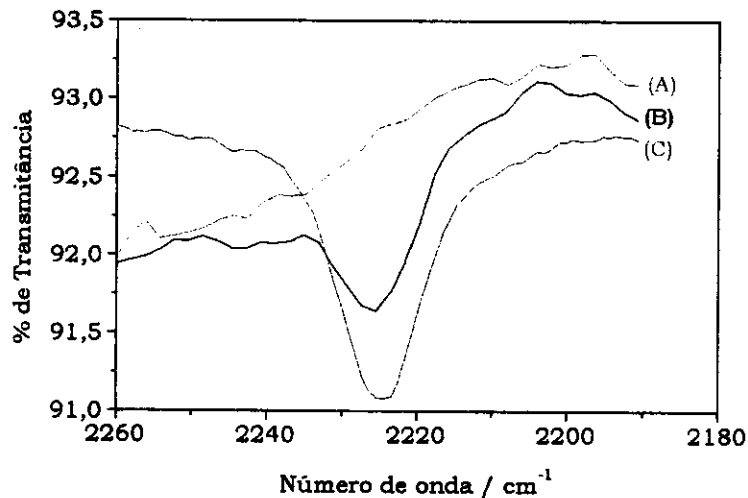


Figura 17. Detecção de N_2O feita em uma solução de CiSNO após sua síntese com excesso de agente nitrosante. (A) CiSNO em PEG 300 inicial, (B) CiSNO após decomposição acelerada devido à presença de excesso de NO^*/O_2 e (C) N_2O borbulhado em PEG 300.

Através da comparação feita na figura 18 entre as curvas cinéticas obtidas durante a decomposição na presença e na ausência de excesso de agente nitrosante, pode-se notar nitidamente a aceleração da decomposição devido ao excesso da mistura gasosa NO^*/O_2 .

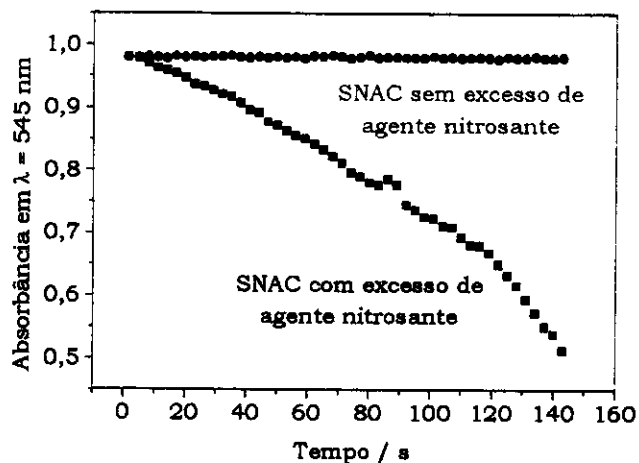


Figura 18. Comparação entre as curvas cinéticas obtidas na decomposição térmica da SNAC na presença e na ausência de excesso de agente nitrosante. Para esta comparação foram utilizadas soluções aquosas com $[\text{SNAC}] = 6,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com acompanhamento cinético em $\lambda = 545 \text{ nm}$. $T = 25^\circ\text{C}$, intervalo entre os pontos = 3 s.

4.1.2. Efeito do excesso de tiól

Por outro lado, a presença de um excesso de tiól pode causar uma grande redução na velocidade de decomposição dos RSNOs como mostra a figura 19. Esta diminuição pode estar relacionada à formação de agente nitrosante, através da reação do $\text{NO}^\bullet$ liberado na decomposição com o O_2 presente na solução. A formação do agente nitrosante pode levar à S-nitrosação direta dos tióis em excesso (eq. 24 equivalente às eqs. 18 - 23). Por outro lado, esta diminuição pode também estar associada à ocorrência de transnitrosação, que é a reação de transferência de NO de um nitrosotiól para um tiól, reduzindo a liberação de $\text{NO}^\bullet$ e a conseqüente diminuição da banda de acompanhamento (eq. 25) como foi observado para CiSNO e SNAC (Fig. 19).

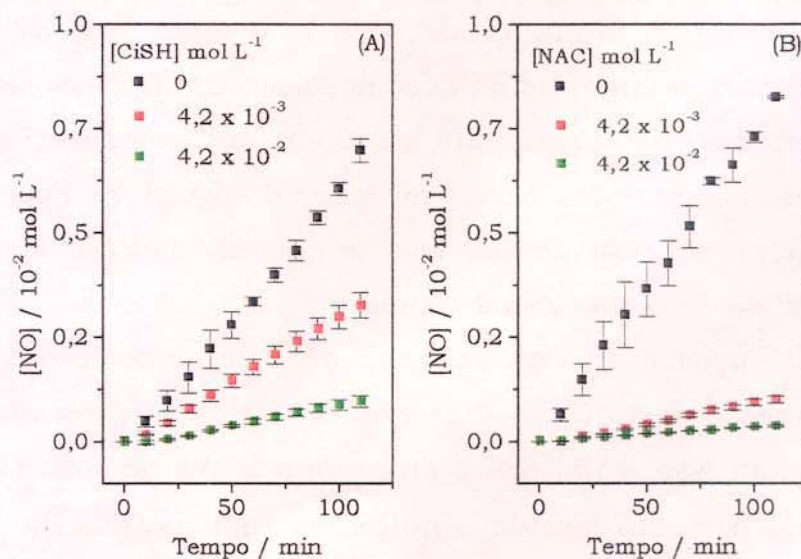
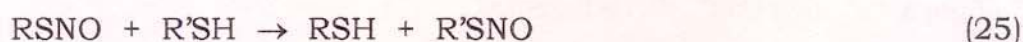
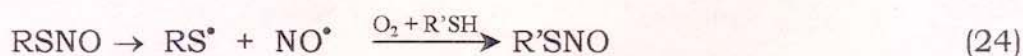


Figura 19. Curvas cinéticas obtidas na decomposição térmica dos RSNOs na presença de excesso de tiól em soluções de (A) CiSNO e (B) SNAC. As soluções dos RSNOs foram preparadas utilizando-se o sistema de borbulhamento, em condições estequiométricas, isto é, o borbulhamento foi interrompido ao atingir o máximo de absorbância em $\lambda =$

545 nm. Para avaliar o efeito do excesso de tiól, as soluções de RSH foram adicionadas às soluções de RSNO (com $[\text{RSNO}] = 6,1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) de forma a obter uma concentração final de RSH (em excesso) de $4,2 \times 10^{-3}$ e $4,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. As decomposições foram feitas em soluções aquosas, a $T = 25^\circ\text{C}$ e o acompanhamento da decomposição foi feito em $\lambda = 545 \text{ nm}$.

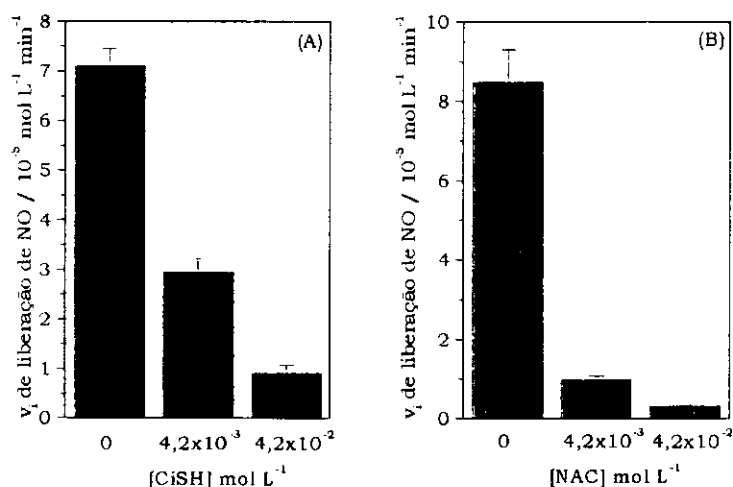


Figura 20. Gráfico de barras das velocidades iniciais obtidas através das curvas cinéticas da figura 19. para (A) CiSNO e (B) SNAC.

Estas reações de formação de RSNOs podem interferir de forma significativa nas curvas cinéticas de decomposição dos RSNOs. Os gráficos de barras apresentados na figura 20 mostram as comparações entre as velocidades iniciais obtidas das curvas cinéticas da figura 19. Pode-se observar que o aumento no excesso de tiól leva a uma diminuição significativa da velocidade inicial de decomposição dos tióis.

A figura 21 mostra uma curva cinética de decomposição da SNAC com um pequeno excesso de NAC resultante da interrupção prematura. Isto é, o borbulhamento foi cessado um pouco antes do máximo de absorbância em $\lambda = 545 \text{ nm}$, estando portanto fora da condição estequiométrica da reação de S-nitrosação. Nota-se que este pequeno excesso de NAC pode levar à obtenção de uma curva cinética onde a SNAC mostra-se praticamente estável por um período de quase 2 h. Esta observação é relevante se considerarmos que a grande parte dos artigos da literatura faz os acompanhamentos cinéticos

durante este período. Assim, independentemente do método de síntese utilizado (seja por via úmida ou borbulhamento), um pequeno excesso de tiól pode levar a uma curva cinética que não reflete apenas a decomposição do RSNO fazendo com que este pareça estável durante horas.

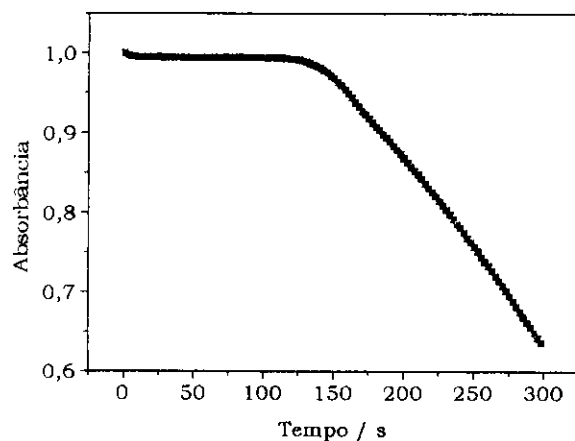
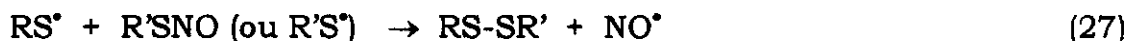


Figura 21. Curva cinética da decomposição da SNAC onde se observa um patamar devido a um pequeno excesso de NAC. Neste caso, o excesso de tiól se deve à interrupção do borbulhamento antes de atingir o valor máximo de absorbância em $\lambda = 545$ nm durante a síntese. Isto é, a síntese não atingiu a condição estequiométrica, permanecendo NAC não nitrosada na solução, o que permite a ocorrência de reações paralelas com a formação de SNAC.

4.2. Decomposição dos RSNOs

4.2.1. Caracterização dos produtos formados.

Os S-nitrosotióis podem se decompor tanto termicamente (Rheinbolt e Mott, 1932) como fotoquimicamente (Barret *et al.*, 1965; Sexton *et al.*, 1994; Pou *et al.*, 1994; Zhelyaskov *et al.*, 1998; Mutus *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 1999) liberando $\text{NO}^\bullet$ em ambos os casos, através da clivagem homolítica da ligação S-NO. O outro produto formado na decomposição dos RSNOs são os dímeros RS-SRs (Butler e Rhodes, 1997). Nesta etapa do trabalho foi verificada a instabilidade térmica dos S-nitrosotióis, com a liberação de $\text{NO}^\bullet$ através da clivagem homolítica da ligação S-NO e formação do dímero:



A liberação de $\text{NO}^\bullet$ e a formação do dímero estável RS-SR na reação de decomposição dos RSNOs já é conhecida (Butler e Rhodes, 1997), mesmo assim, nesta etapa do trabalho os produtos formados na decomposição térmica e fotoquímica dos RSNOs foram caracterizados. Pode-se assumir que os produtos formados na decomposição térmica são os mesmos formados na fotodecomposição, uma vez que no sistema não está presente nenhuma outra espécie reativa, que possa causar alguma diferença entre os produtos formados na decomposição térmica e fotoquímica. Na maior parte dos casos, a caracterização dos produtos formados foi feita em soluções irradiadas, com o intuito de acelerar a decomposição, obtendo-se então uma decomposição completa. O $\text{NO}^\bullet$ liberado nas reações foi caracterizado através do seu espectro roto-vibracional (Schor e Teixeira, 1994) (Fig. 22) e pela detecção de nitrito utilizando-se o método de Griess. A figura 22 mostra o espectro roto-vibracional do $\text{NO}^\bullet$, obtido utilizando-se uma cela de gás com janelas de CaF_2 .

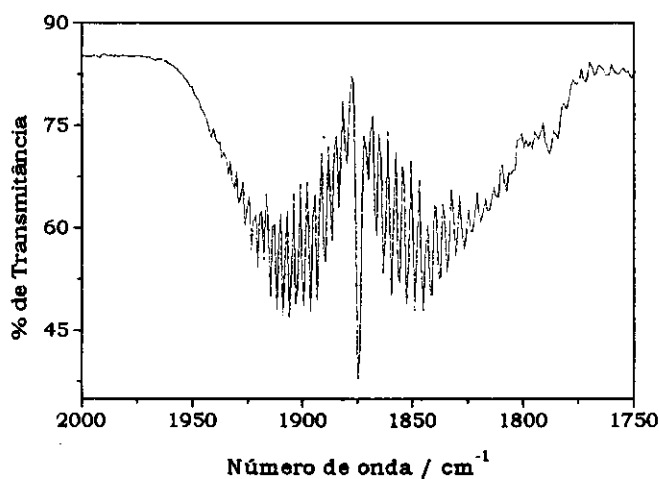
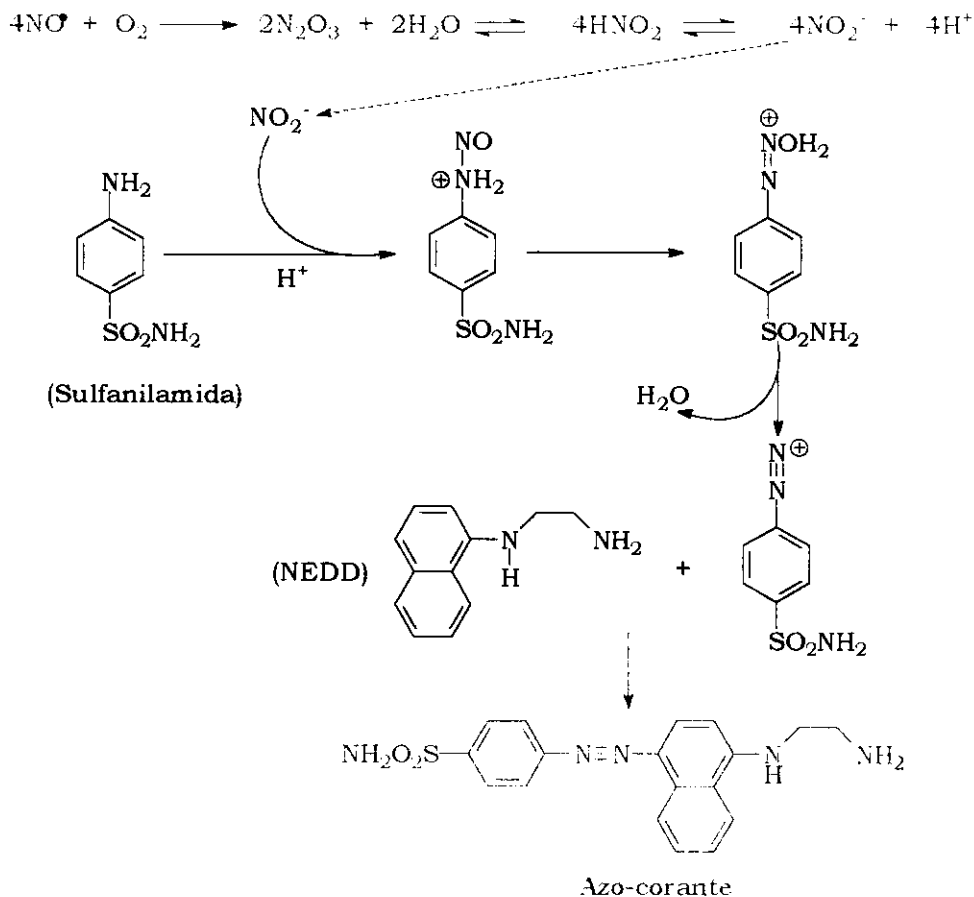


Figura 22. Espectro roto-vibracional do gás liberado na decomposição dos RSNOs. O espectro roto-vibracional do $\text{NO}^\bullet$ foi obtido coletando-se o gás liberado durante a irradiação com luz UV/Vis utilizando-se uma lâmpada de vapor de Hg de 100W, de uma solução de CiSNO 1% m/m em matriz de PEG 300. O tempo de irradiação foi de aproximadamente 1 h.

O espectro roto-vibracional do $\text{NO}^\bullet$ é bem característico desta molécula, sendo que o $\text{NO}^\bullet$ é uma das poucas moléculas diatômicas estáveis que apresenta o ramo Q, além dos ramos P e R do espectro (Schor e Teixeira, 1994). Assim, o espectro roto-vibracional do $\text{NO}^\bullet$ pode ser considerada uma evidência inequívoca da liberação de $\text{NO}^\bullet$ a partir da decomposição dos RSNOs.

O método de Griess é um método padrão para detecção de nitrito. Este método se baseia na detecção espectroscópica da reação da sulfanilamida com o NO_2^- , formando um intermediário que reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEDD) em meio ácido resultando em azo corante com $\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$. A detecção de $\text{NO}^\bullet$ pode ser feita através deste método, considerando-se que o $\text{NO}^\bullet$ liberado irá reagir com O_2 , formando NO_2^- , como mostra o esquema 3.



Esquema 3. Reações envolvidas no método de Griess para detecção de íons nitrito. (Cook *et al.*, 1996)

A figura 23 mostra a comparação entre o espectro inicial de uma solução de CiSNO $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de sulfanilamida e NEDD. Pode-se observar nesta figura, que mesmo com os reagentes para a detecção de nitrito, a banda com $\lambda_{\text{máx}} = 505 \text{ nm}$ está inicialmente ausente, comprovando que não há nitrito detectável. Nesta mesma figura está apresentado o espectro final, que consiste no espectro da mesma solução de CiSNO após 6 h no escuro. No detalhe, está apresentada a curva de calibração feita com várias concentrações de NaNO_2 e o reagente de Griess, cuja equação da reta é dada por: $\text{Abs} = 5,6 \times 10^{-3} + 7,75 \times 10^3 \times [\text{NaNO}_2]$. Segundo este método, após 6 h, cerca de 44% da CiSNO foi decomposta. Este cálculo foi feito a partir do espectro final que apresenta absorvância de 0,69, que pela equação da reta obtida na curva de calibração, corresponde a uma solução de $[\text{NaNO}_2] = 8,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Este experimento foi feito apenas para uma avaliação qualitativa da formação de NO_2^- a partir do NO^* liberado em soluções não desaeradas. Segundo a literatura (Cook *et al.*, 1996), esta detecção de NO_2^- pode também ser considerada como uma confirmação da liberação de NO^* a partir dos RSNOs.

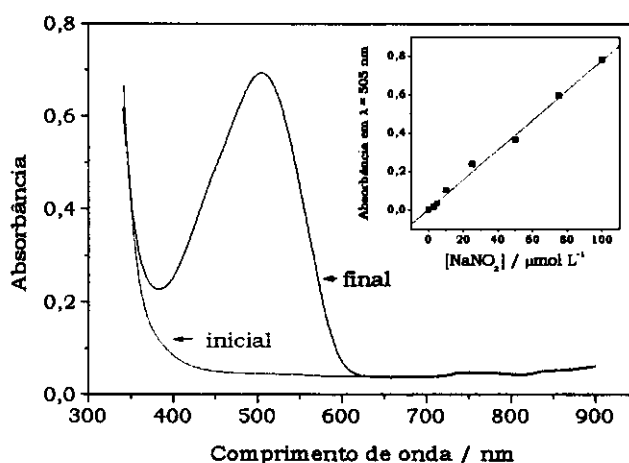


Figura 23. Caracterização dos produtos formados na decomposição dos RSNOs. Detecção de nitrito através da reação com sulfanilamida e cloridrato de NEDD. O espectro inicial mostra a ausência do pico em $\lambda = 505 \text{ nm}$ logo após a síntese da CiSNO. O espectro final foi obtido após 6 h de decomposição no escuro. Solução aquosa de $[\text{CiSNO}] = 2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 25^\circ \text{C}$.

Uma vez confirmada a liberação de $\text{NO}^\bullet$ a partir dos RSNOs, foi feito um experimento para confirmar a formação do dímero RS-SR. A figura 24 mostra o aparecimento de uma banda na região de 267 nm que foi atribuída à formação do dímero (RS-SR) por comparação com o dímero comercial da cisteína, que é a cistina.

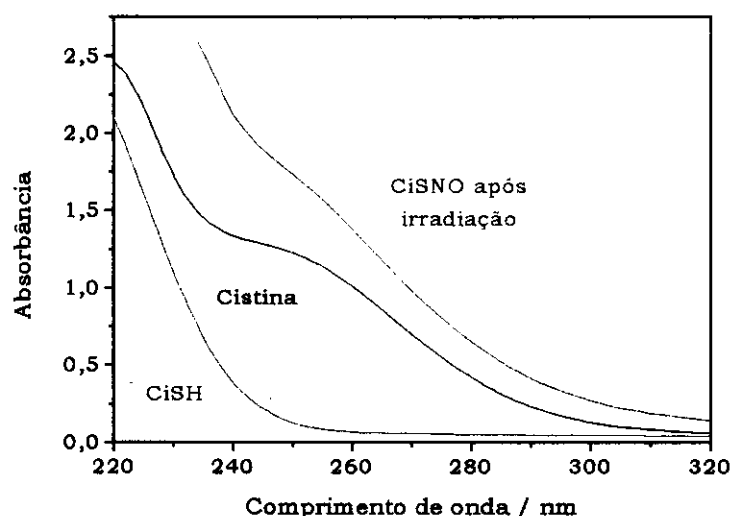
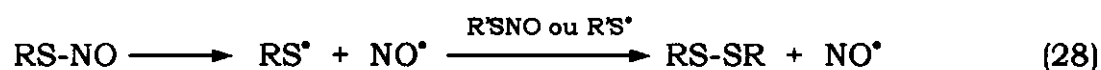


Figura 24. Caracterização dos produtos formados na fotodecomposição dos RSNOs. Comparação entre os espectros UV da CiSNO após 1 h de irradiação no UV, utilizando-se uma lâmpada de vapor de Hg de 100W, cisteína e cistina.

Assim, pode-se concluir que a decomposição dos RSNOs ocorre através da clivagem homotítica da ligação S-NO, com a liberação de $\text{NO}^\bullet$ seguida da formação de dímeros RS-SR (eqs. 26 e 27, resumidas na eq. 28).



4.2.2. Decomposição térmica dos RSNOs.

O acompanhamento da decomposição dos RSNOs pode ser feito tanto através da banda em 336 nm como da banda em 545 nm. A escolha do comprimento de onda de acompanhamento irá depender da concentração da

solução, uma vez que a absorvidade molar dos RSNOs em $\lambda = 336 \text{ nm}$ é em torno de $800\text{--}1044 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ em solução aquosa enquanto em $\lambda = 545 \text{ nm}$ é em torno de $14\text{--}20 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$.

Foram feitos experimentos acompanhando-se ambas as bandas, de acordo com a concentração de RSNO de interesse. A figura 25 mostra as curvas cinéticas de liberação de NO^* a partir da SNAC em duas concentrações diferentes ; $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (acompanhamento em 545 nm) e $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (acompanhamento em 336 nm). Observou-se que a velocidade de decomposição da solução concentrada é muito mais alta que a da solução diluída.

Uma vez observada esta grande diferença nas v_{is} de decomposição da SNAC em função da concentração, foram feitos experimentos com a variação da concentração inicial dos RSNOs para a confirmação deste comportamento. A figura 26 mostra a decomposição da CiSNO, SNAC e GSNO em três concentrações diferentes. Pode-se observar que a variação da concentração inicial do RSNO causa uma variação significativa nas curvas cinéticas de decomposição. A partir destas curvas cinéticas foram calculadas as velocidades iniciais para cada caso e os valores obtidos estão apresentados na tabela 2.

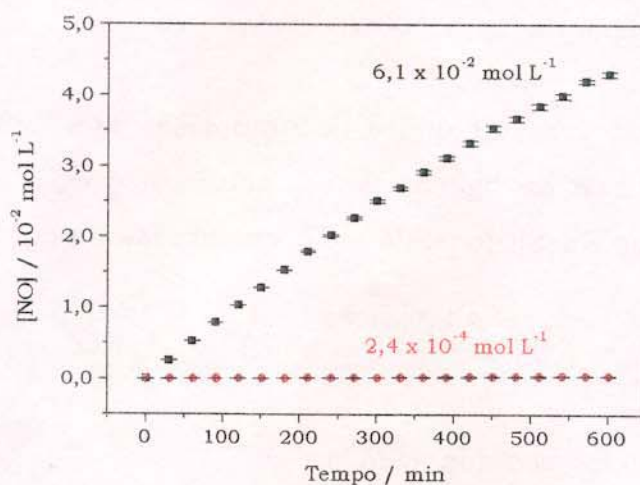


Figura 25. Curvas cinéticas de liberação de NO^* obtidas durante a decomposição térmica da SNAC com $T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $[\text{SNAC}] = 6 \times 10^{-2}$ e $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em solução tampão (PBS) $\text{pH} = 7,4$. Os acompanhamentos foram feitos em $\lambda = 336 \text{ nm}$ para a solução de $2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e em $\lambda = 545 \text{ nm}$ para a solução de $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

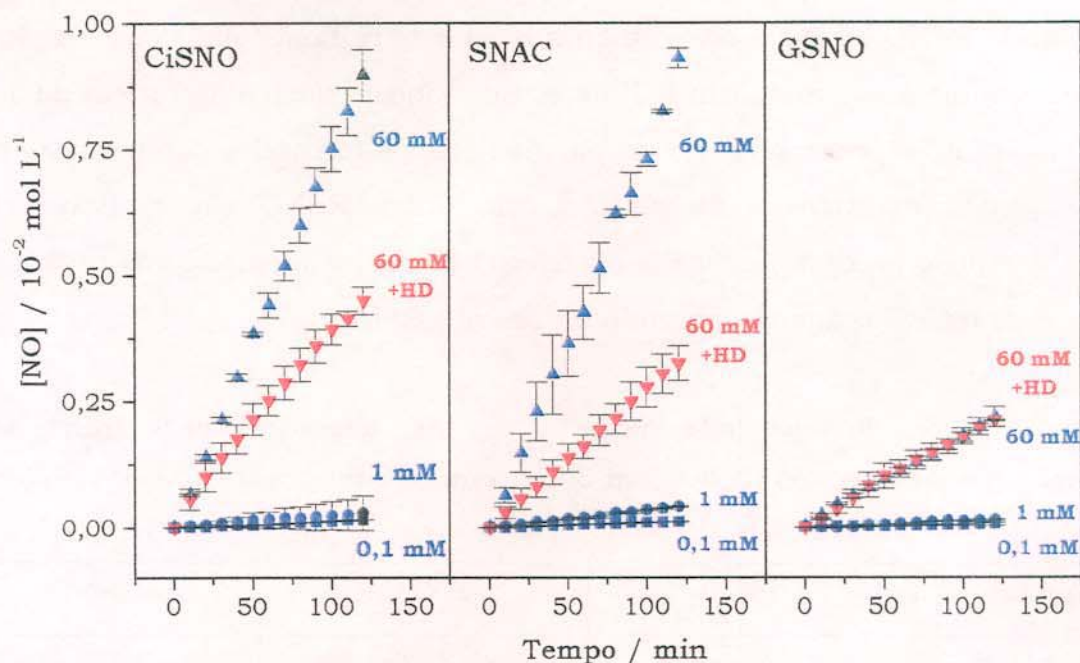


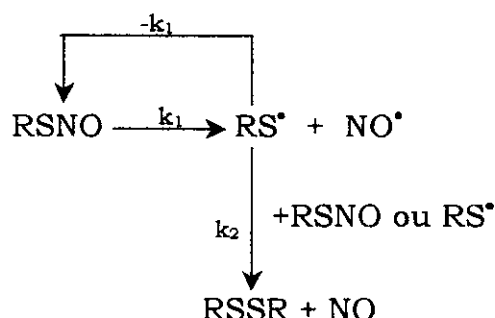
Figura 26. Curvas cinéticas obtidas na decomposição térmica da CiSNO, SNAC e GSNO com concentrações 1×10^{-4} , 1×10^{-3} e $6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e na presença de hexadienol (HD), captador de $\text{RS}^{\bullet}$ em solução de $[\text{RSNO}] = 6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 25^{\circ}\text{C}$. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

A tabela 2 mostra que os valores de velocidade inicial aumentam com o aumento da concentração. Por exemplo, no caso das concentrações de 1×10^{-4} e $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, um aumento de 10 vezes na concentração leva ao aumento de 1,6, 3,5 e 1,4 vezes nas v_{is} da CiSNO, SNAC e GSNO respectivamente. Por outro lado, com o aumento de 60 vezes na concentração inicial dos RSNOs (de 1×10^{-3} para $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), leva a um aumento nas v_{is} de 28, 24 e 13 vezes para a CiSNO, SNAC e GSNO, respectivamente. A variação das v_{is} com a variação da concentração inicial dos RSNOs, indica que podem estar ocorrendo outras reações paralelas que afetam muito a reação global (de Oliveira, 2002). Este comportamento pode ser explicado se for considerado o mecanismo apresentado no esquema 4. Neste mecanismo, a velocidade de decomposição pode ser reduzida se o radical tiila ($\text{RS}^{\bullet}$) colidir com o $\text{NO}^{\bullet}$ mais próximo

(recombinação geminada) ou com outro (recombinação aleatória) recombinando e formando RSNO ou pode ser aumentada se este radical colidir com um RSNO, formando o dímero e mais um $\text{NO}^\bullet$ livre. Em concentrações da ordem de $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ tanto a recombinação do par de radicais formados como a aceleração da decomposição através da colisão com outro RSNO são desfavorecidas. Assim, a reação predominante é a clivagem homolítica formando os radicais $\text{RS}^\bullet$ e $\text{NO}^\bullet$ onde os $\text{RS}^\bullet$ reagem formando o dímero RSSR.

Tabela 2. Valores de velocidade inicial (v_i) em $[\text{NO}]$ liberado ($\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) para a decomposição térmica dos RSNOs em 3 concentrações diferentes. Dados obtidos da figura 25.

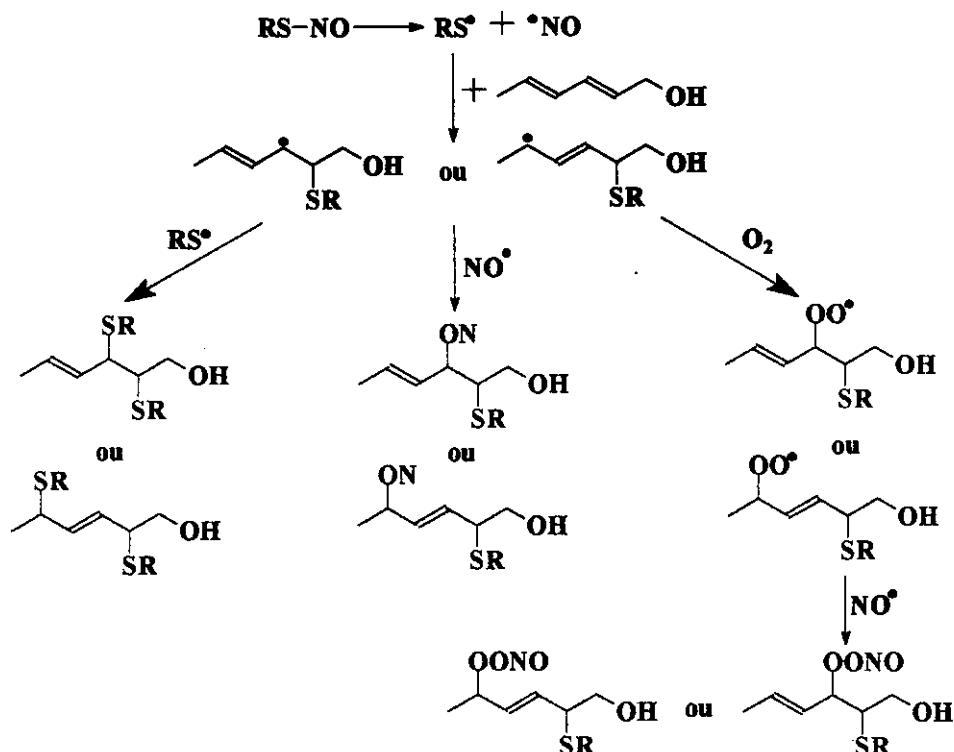
mol L^{-1}	CiSNO	SNAC	GSNO
$1,0 \times 10^{-4}$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^{-6}$	$9,8 \pm 0,3 \times 10^{-7}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{-6}$
$1,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	$3,5 \pm 0,03 \times 10^{-6}$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^{-6}$
$6,0 \times 10^{-2}$	$7,1 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$8,5 \pm 0,8 \times 10^{-5}$	$1,8 \pm 0,2 \times 10^{-5}$
$6,0 \times 10^{-2} + \text{HD}$	$3,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$	$2,7 \pm 0 \times 10^{-5}$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{-5}$



Esquema 4. Mecanismo sugerido para decomposição térmica dos RSNOs. Onde k_1 é a constante de velocidade de formação dos pares de radicais separados, k_1 é a constante de velocidade de recombinação do par de radicais formados e k_2 é a constante de velocidade de formação dos produtos.

Com o aumento da concentração, a reação dos radicais $RS^\bullet$ formados com outros RSNO através de colisão é favorecida, resultando na aceleração da decomposição dos RSNOs. Assim, o radical $RS^\bullet$ pode atuar como uma espécie catalizadora da liberação de $NO^\bullet$ a partir dos RSNOs.

A proposta de ocorrência da reação de auto-catálise induzida pelos radicais tiila ($RS^\bullet$) no mecanismo do esquema 4, foi reforçada através da realização da reação na presença do *trans,trans*-2,4-hexadien-1-ol (HD), que é um captador de radicais $RS^\bullet$, que apresenta duas ligações duplas alternadas (Wood *et al.* 1996). Em analogia a uma reação muito conhecida na literatura, a adição de tióis (Kice, 1973; Rubbo *et al.* 1995; Rubbo *et al.*, 1996; Kukula e Cerverý, 1999), sugerimos as reações apresentadas no esquema 5. Após a reação inicial do HD com o radical tiila, ocorre a formação de um intermediário radicalar que deve ser estabilizado (reação de terminação) através da reação com outro radical tiila, $NO^\bullet$ ou O_2 .



Esquema 5. Reações sugeridas para a captura de radicais tiila pelo 2,4-*trans,trans*-hexadien-1-ol.

Na figura 26 está mostrada a comparação entre as curvas cinéticas nas diferentes concentrações de RSNO (curvas em azul) e as curvas cinéticas obtidas para $[RSNO] = 6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de HD (curvas em vermelho). A partir destas curvas foram calculadas as velocidades iniciais que estão apresentadas na forma de gráfico de barras na figura 27 e na tabela 2. Comparando-se as velocidades iniciais para as soluções de $[RSNO] = 6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, nas soluções com e sem HD pode-se notar que a presença do captador de $RS^{\bullet}$ reduziu 2 e 3 vezes as v_{is} para a CiSNO e SNAC respectivamente.

No caso da GSNO não foi observada redução na v_i devido à presença do HD. Este comportamento indica que o processo de auto-catálise é menos importante no caso deste S-nitrosotiól. Os processos que envolvem difusão das espécies GSNO e $GS^{\bullet}$ devem ser desfavorecidos devido ao grande volume de Van der Waals desta espécie, que leva a uma redução na sua difusão.

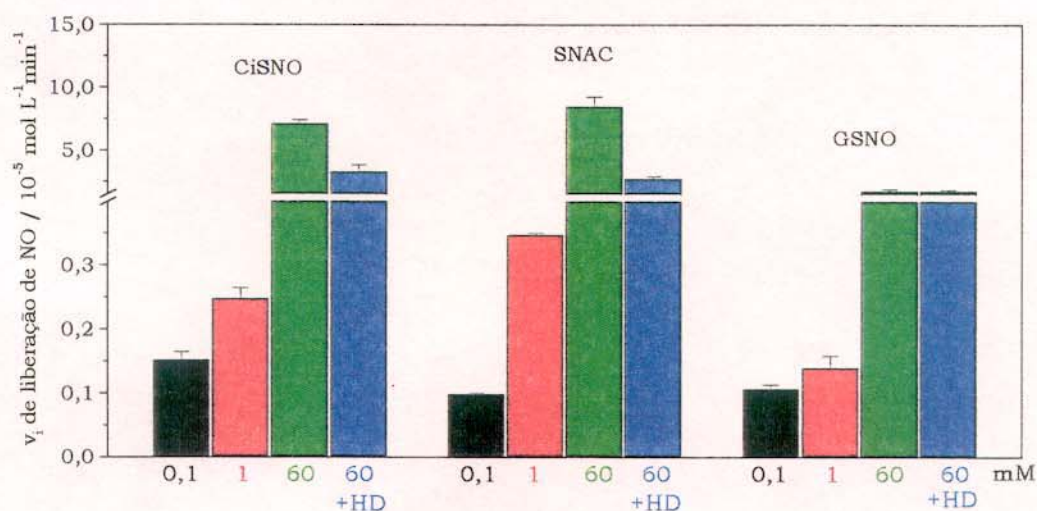


Figura 27. Gráfico de barras para os valores de velocidade inicial (v_i) em min^{-1} para a decomposição térmica dos RSNOs em 3 concentrações diferentes. Dados obtidos da figura 26 e tabela 2. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

Foi observado que na presença de HD ocorre uma redução mais significativa na decomposição dos RSNOs nas soluções de concentração da ordem de $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, onde a reação de auto-catálise deve ser mais efetiva. É importante ressaltar que com a adição do HD seria esperado que a curva

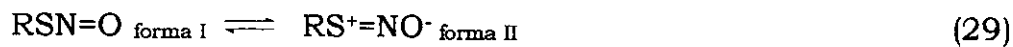
cinética na concentração de $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ fosse idêntica à curva na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Porém a diferença observada entre as curvas cinéticas pode ser atribuída à baixa solubilidade do HD em água. Estes resultados mostram que a reação de decomposição dos RSNOs envolve um mecanismo auto-catalítico, tornando o mecanismo mais complexo do que simplesmente a clivagem homolítica da ligação RS-NO descrita na literatura. Estes resultados mostram que é muito importante se considerar tanto a reação de recombinação do par de radicais $\text{RS}^\bullet$ e $\text{NO}^\bullet$, como a reação auto-catalítica dos radicais $\text{RS}^\bullet$ com o reagente (RSNO), uma vez que as duas reações afetam a cinética de decomposição dos RSNOs com liberação de $\text{NO}^\bullet$.

É interessante notar na figura 26 a diferença entre as curvas cinéticas para a decomposição da CiSNO e SNAC em relação à GSNO. Pode-se observar que na concentração de $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ a liberação de $\text{NO}^\bullet$ é muito acelerada para a CiSNO e para SNAC porém, o efeito da concentração é menos pronunciado para a GSNO. Este comportamento pode estar relacionado às diferenças nos volumes de Van der Waals (vVdW) destas moléculas (Network Science). A CiSNO e a SNAC são monopectídeos, moléculas com volumes pequenos em relação à GSNO que é um tripeptídeo. Assim, espera-se que os coeficientes de difusão da GSNO e do $\text{GS}^\bullet$ sejam menores do que as da CiSNO, da SNAC e dos respectivos radicais tiila. A reação de auto-catálise por sua vez, deve ser dependente da difusão e da frequência de encontros das espécies RSNO e $\text{RS}^\bullet$. Portanto, esta reação deverá ser menos efetiva para as espécies que tiverem menor coeficiente de difusão.

Comparando-se os valores das v_{is} obtidas nas soluções mais diluídas ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pode-se observar que existe uma diferença na velocidade de decomposição dos RSNOs. Esta diferença provavelmente está relacionada a uma diferença na estabilidade intrínseca entre os RSNOs. Para analisar esta diferença foi realizado um estudo teórico das estabilidades intrínsecas destes três RSNOs primários. Considerando-se o mecanismo proposto no esquema 4, pode-se concluir que para uma avaliação da estabilidade intrínseca dos três

RSNOs devemos utilizar a concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ onde os efeitos de recombinação radicalar e auto-catálise podem ser desprezados. Assim, comparando-se as velocidades iniciais concluímos que a estabilidade intrínseca dos RSNOs segue a ordem $\text{SNAC} \cong \text{GSNO} > \text{CiSNO}$.

Roy e colaboradores (1994) estudaram a estabilidade de 12 RSNOs e concluíram que a liberação de NO destes compostos é sensível aos substituintes nos carbonos α e β (Fig. 28), sendo dependente do equilíbrio estabelecido na equação 29.



O deslocamento deste equilíbrio favorecendo a produção de espécies na forma II irá estabilizar o RSNO, devido a um fortalecimento da ligação S-N. Estes autores sugerem também, que a presença do grupo acetamido pode causar uma estabilização da forma II devido à formação de um anel de seis membros. Este anel seria formado pelo oxigênio do grupo carbonílico com o enxofre que é deficiente em elétrons (na forma II), porém não foi feito nenhum cálculo teórico para a confirmação desta suposição.

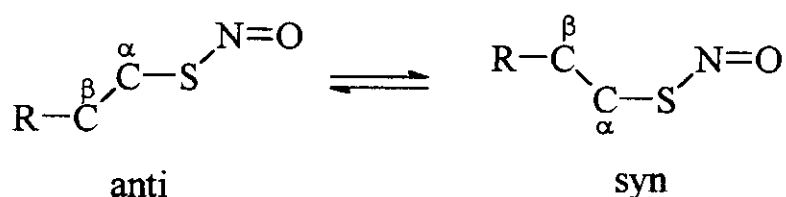


Figura 28. Isômeros anti e syn dos RSNOs.

Durante o desenvolvimento deste projeto foi feito um trabalho de colaboração com o Prof. Dr. Nelson H. Morgon da área de Cálculos Teóricos do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNICAMP. Neste trabalho o Prof. Morgon calculou as energias de dissociação da ligação S-N a partir de geometrias otimizadas da CiSNO e SNAC. Nos dois casos, o isômero

syn das moléculas foi a forma mais estável (Fig. 29), concordando com dados obtidos da literatura para o CH_3SNO (Arulsamy *et al.*, 1999 e Bartberger *et al.*, 2000). Como se pode observar na figura 29, as duas moléculas podem formar pontes de hidrogênio intramoleculares na conformação syn.

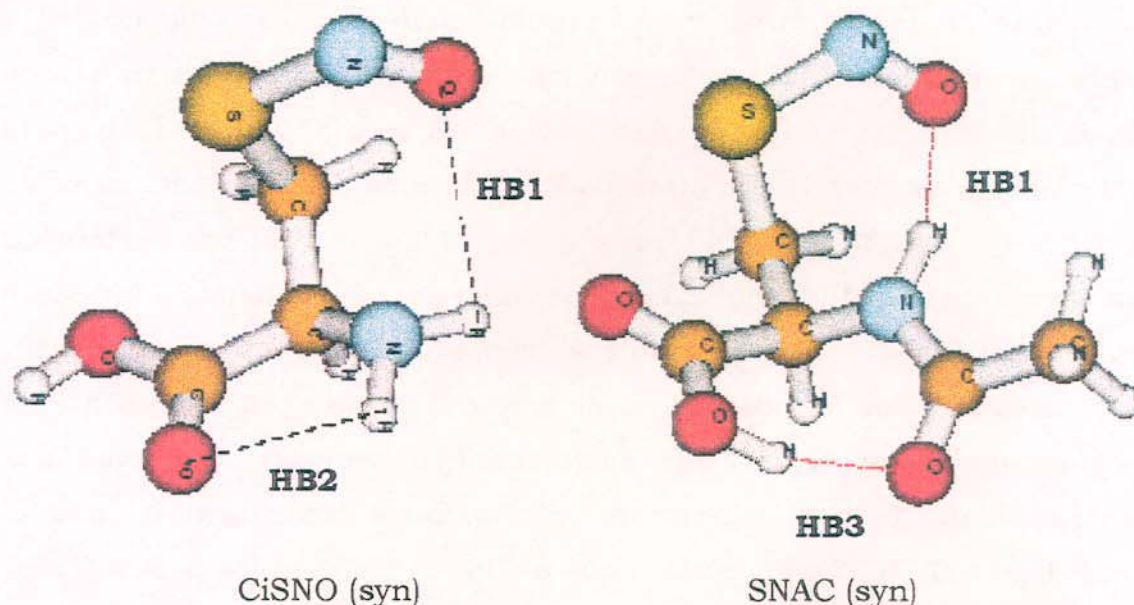


Figura 29. Geometrias otimizadas para a CiSNO e para a SNAC, na fase gasosa. HB são as pontes de hidrogênio intramoleculares formadas (de Oliveira, 2002).

A figura 29 mostra as seguintes pontes de hidrogênio:

HB1 entre o O do NO e o H do grupo amino com distância de 2,905 Å para CiSNO e 2,316 Å para a SNAC. HB2 entre o H do grupo amino e o O da carbonila do grupo carboxílico com distância de 2,333 Å. HB3 entre o H do grupo carboxílico e o O da carbonila do grupo acetato com distância de 1,826 Å.

O anel mais planar de cinco membros formado pela interação HB2 é importante por direcionar o H do grupo amino para formação de HB1. Pode-se esperar que com a formação de HB1 ocorra um aumento na densidade eletrônica da ligação S-N devido ao favorecimento da forma II do equilíbrio 29. Como consequência, deve ocorrer um aumento no caráter de ligação dupla da ligação S-N. A estrutura da SNAC é muito semelhante à da CiSNO, porém no caso da SNAC o H do grupo amino é substituído por um grupo acetato

(COCH₃). Na estrutura da SNAC também pode ocorrer a formação de HB1 e além desta interação pode ocorrer a formação um anel de sete membros. Este anel é formado pela interação entre o H do grupo carboxílico ligado ao carbono β com o oxigênio carbonílico do grupo acetato. A formação de HB3 causa um direcionamento do H do grupo amino aproximando-o do oxigênio do NO e fortalecendo a interação HB1. O fortalecimento desta interação se reflete na redução da distância de HB1 que passa de 2,905 Å da CiSNO para 2,316 Å da SNAC. O cálculo das energias de dissociação da ligação S-NO (129,91 kJ mol⁻¹ para a CiSNO e 152,88 kJ mol⁻¹ para a SNAC) mostraram uma diferença significativa entre estas duas moléculas. Esta diferença foi atribuída à formação de duas pontes (HB1 e HB3) que são fortes e cooperativas para o caso da SNAC. A partir destes cálculos foi possível concluir que o grupo acetato presente na SNAC causa um aumento em sua estabilidade intrínseca. Os resultados obtidos dos cálculos teóricos concordam com os dados experimentais onde foi constatado que a SNAC é mais estável que a CiSNO. Os cálculos para a GSNO não foram feitos, mas espera-se que devido à presença do grupo acetato, esta molécula apresente interações semelhantes às da SNAC. Isto justificaria a semelhança entre os valores de velocidade inicial obtidos para a SNAC ($9,8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e para a GSNO ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Assim, a partir dos cálculos teóricos pode-se concluir que a estabilidade intrínseca dos RSNOs segue a ordem $\text{SNAC} \cong \text{GSNO} > \text{CiSNO}$, concordando com os dados experimentais. Estes dados de comparação entre as estabilidades intrínsecas de RSNOs primários são muito importantes, uma vez que na literatura só é possível encontrar a comparação entre as estabilidades intrínsecas de RSNOs primários e terciários. Nas comparações feitas na literatura, é considerado que a diferença de estabilidade entre os RSNOs primários e terciários se deve ao impedimento estérico exercido pelos grupos substituintes, dificultando a formação do dímero RS-SR (Bainbrigger *et al.*, 1997; Bartberger *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2001).

4.2.3. Fotodecomposição dos RSNOs

No item 4.2.1 foi observado que os RSNOs sofrem fotodecomposição e este comportamento também já foi descrito na literatura (Barret, 1965; Hussain *et al.*, 1999; Mutus *et al.*, 1999; Zhelyaskov *et al.*, 1998; Sexton *et al.*, 1994; Pou *et al.*, 1994). A irradiação dos RSNOs é uma das formas de acelerar a liberação de NO^* a partir destes compostos. Dando continuidade aos estudos anteriores sobre a liberação fotoquímica de NO^* a partir da SNAC (Shishido e de Oliveira, 2000) foram feitos experimentos utilizando-se filtros óticos para verificarmos se as duas transições relacionadas com as bandas em 336 e 545 nm, características dos RSNOs, levam a fotoejeção de NO^* . A figura 30 mostra a liberação de NO^* durante a fotólise da SNAC utilizando-se filtros óticos com $300 < \lambda < 400$ nm e $\lambda < 480$ nm.

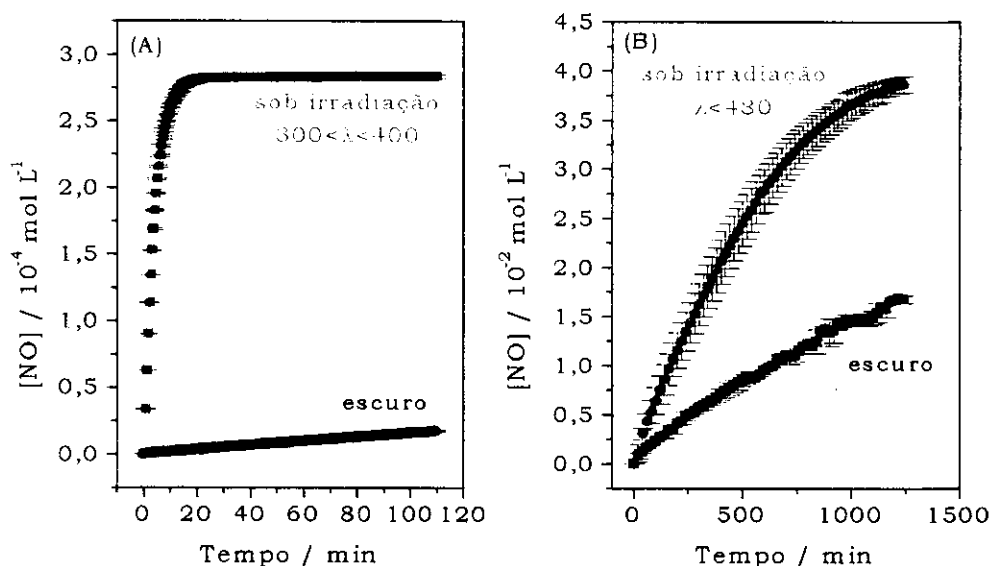


Figura 30. Fotossensibilidade da SNAC em soluções aquosas $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (A) e $6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (B). $[\text{NO}^*]$ liberado em função do tempo no escuro e em irradiações utilizando-se filtros óticos com $300 < \lambda < 400$ nm (A) e $\lambda < 480$ nm (B). Para a irradiação com $\lambda < 480$ nm foi utilizado filtro ótico e uma lâmpada de vapor de Hg de 125W e para $300 < \lambda < 400$ nm foi utilizado filtro ótico e uma lâmpada de vapor de Hg de 200W. O intervalo espectral para a decomposição no escuro e para a fotodecomposição com $\lambda < 480$ nm foi de 600 s e para $300 < \lambda < 400$ nm o intervalo foi de 30 s. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

As curvas cinéticas mostram que sob irradiação ocorre uma aceleração da liberação de $\text{NO}^\bullet$, quando comparada à decomposição térmica. Qualitativamente pode-se observar que as duas bandas características da SNAC (336 e 545 nm) são fotoativas, levando à aceleração da liberação de $\text{NO}^\bullet$, tanto com irradiações na região de 336 nm quanto na região de 545 nm. Este resultado mostra a possibilidade do uso da SNAC em fototerapia onde é necessária uma aceleração da liberação de $\text{NO}^\bullet$.

4.3. Efeito da matriz de PEG

4.3.1. Decomposição térmica dos RSNOs.

A figura 31 mostra as curvas cinéticas de liberação de $\text{NO}^\bullet$ obtidas durante a decomposição térmica da CiSNO , SNAC e GSNO em soluções aquosas e em matrizes de PEG. As velocidades iniciais calculadas a partir das curvas cinéticas estão apresentadas na figura 32.

A partir da figura 32 foi calculado que a matriz de PEG reduz em 11; 29 e 2 vezes a velocidade inicial de liberação térmica de $\text{NO}^\bullet$ a partir da CiSNO , SNAC e GSNO respectivamente. Esta redução na liberação de $\text{NO}^\bullet$ foi atribuída a um aumento na taxa de recombinação induzida pela matriz de PEG e pela redução da reação de auto-catálise envolvendo os radicais $\text{RS}^\bullet$. O afastamento do par de radicais ($\text{RS}^\bullet \cdot \text{NO}$) formados e a reação de auto-catálise, dependem da difusão das espécies $\text{RS}^\bullet$ e $\text{NO}^\bullet$ na solução, assim, é esperado que em uma matriz mais viscosa, como o PEG, a difusão seja reduzida. Além disso, a redução da difusão deve causar um aumento no tempo de residência do $\text{NO}^\bullet$, favorecendo a reação de recombinação. O efeito também se estende às reações entre dois radicais tiila ($\text{RS}^\bullet$) ou entre os radicais $\text{RS}^\bullet$ e as moléculas de RSNO, levando a um aumento na meia vida dos radicais $\text{RS}^\bullet$, aumentando assim, a probabilidade de recombinação destes com um $\text{NO}^\bullet$.

Comparando-se as diminuições nos valores de v_{is} em soluções aquosas e em matriz de PEG (Fig. 32), pode-se notar que a matriz de PEG causa uma maior diminuição da liberação de NO^* a partir da SNAC e da CiSNO do que a partir da GSNO. Isto provavelmente se deve ao fato da GSNO ser um tripeptídeo, apresentando um volume de van der Waals (VDWV)(Network Science), bem maior que o da CiSNO ou o da SNAC (Fig. 4, pg. 9).

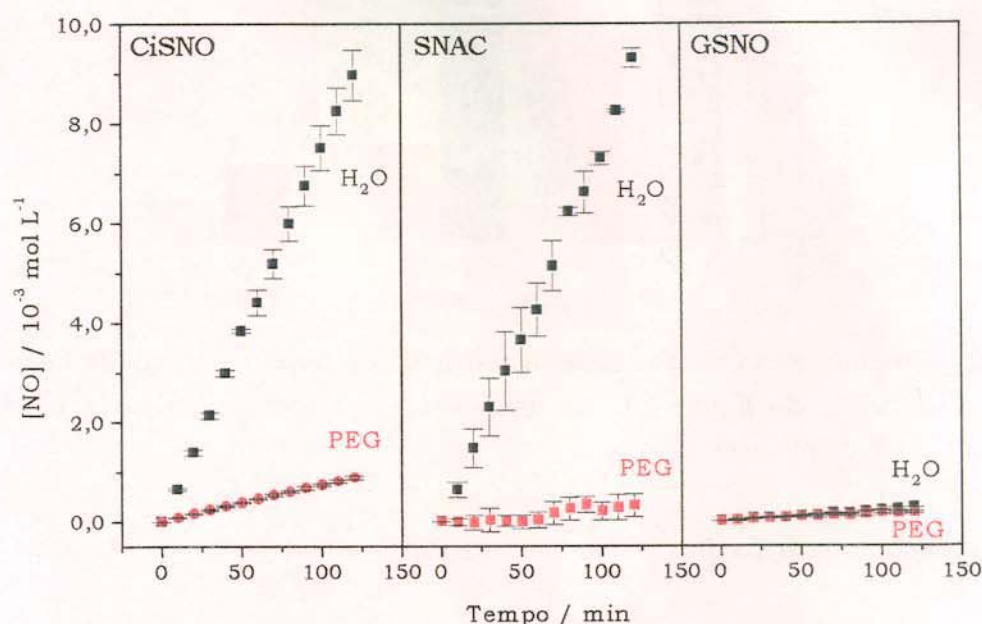


Figura 31. Curvas cinéticas obtidas durante a decomposição térmica da CiSNO, SNAC e GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG 400. Foram utilizadas soluções 0,3% m/m (da ordem de 10^{-2} mol L^{-1}), a $T = 25$ °C. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

Assim, a mobilidade do radical tiila da GSNO (GS^*) deve ser menor que as dos radicais tiila formados pela SNAC ou CiSNO. Isto pode ser observado nas velocidades iniciais (v_i) onde, a v_i de decomposição da GSNO em solução aquosa é cerca de 30 vezes menor que a da CiSNO e 37 vezes menor que a da SNAC. Então, pode-se esperar que a matriz de PEG reduza apenas um pouco a mobilidade dos radicais GS^* uma vez que esta mobilidade já é reduzida devido ao volume do radical formado. A partir destes resultados, pode-se concluir que

de fato a matriz de PEG (mais viscosa) causa uma redução na liberação de NO[•] a partir dos RSNOs e isto pode ser utilizado como uma forma de modular a estabilidade destes compostos.

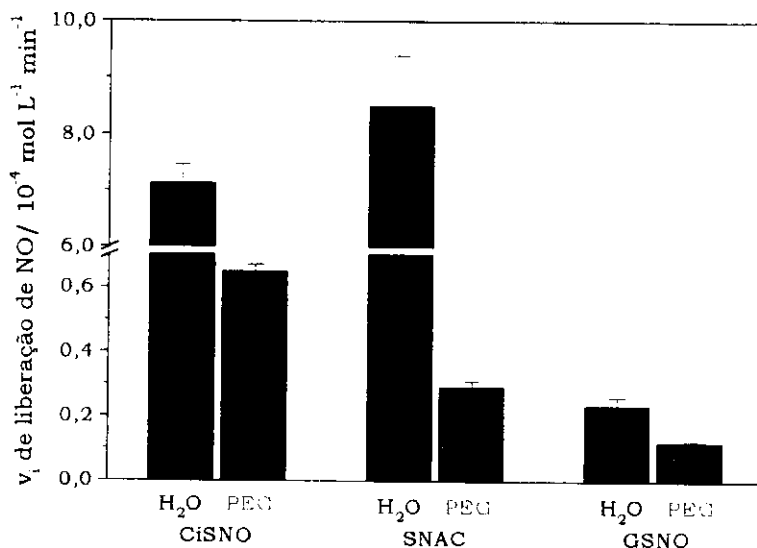


Figura 32. Velocidades iniciais obtidas a partir das curvas cinéticas de decomposição térmica dos RSNOs da figura 31. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

4.3.2. Fotodecomposição dos RSNOs e do NPS.

A figura 33 mostra uma comparação entre as curvas cinéticas obtidas no acompanhamento da fotodecomposição da CiSNO, SNAC e GSNO em soluções aquosas e em matriz de PEG 600. Neste caso, as irradiações foram feitas utilizando-se um filtro ótico, que permite a passagem de luz apenas em uma faixa de comprimento de onda entre 300 – 400 nm. Este filtro ótico foi utilizado com o intuito de possibilitar o cálculo do rendimento quântico da fotodecomposição dos RSNOs. O cálculo de rendimento quântico foi restrito apenas às irradiações com este filtro, uma vez que as irradiações devem ser feitas em comprimentos de onda onde o actinômetro químico utilizado e os RSNOs sejam fotoativos.

O rendimento quântico (Φ) foi obtido através da razão entre o número de moléculas que reagiram e o número de fótons absorvidos. Para o cálculo do

número de fótons que incidem na solução foi utilizado o actinômetro químico Aberchrome 540. Nesses casos, considerou-se que todos os fótons que atingem a solução estão sendo absorvidos pelo reagente.

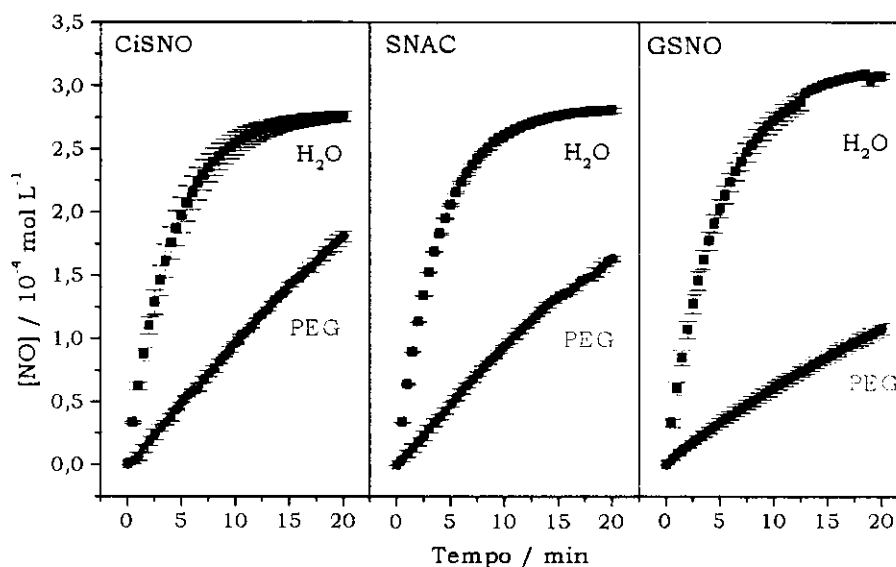


Figura 33. Curvas cinéticas de liberação de NO^* obtidas durante a fotodecomposição da CiSNO, SNAC e GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG 600. Foram utilizadas soluções 0,03% m/m (da ordem de $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), a $T = 25^\circ\text{C}$ e $300 < \lambda_{\text{irr}} < 400$, irradiadas com lâmpada de vapor de Hg de 200 W. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

O rendimento quântico para a fotoliberação de NO^* a partir dos RSNOs foi calculado através da razão entre o número de moléculas de RSNO fotolisadas por segundo e o número de fótons incididos na solução por segundo (eq. 30). O número de moléculas de RSNO fotolisadas foi calculado a partir das curvas cinéticas obtidas durante a fotodecomposição. Como já foi observado anteriormente, os RSNOs são termicamente instáveis assim, para se obter apenas o efeito da irradiação, foram feitos acompanhamentos cinéticos das reações de decomposição térmica que foram subtraídos das curvas cinéticas relativas à fotodecomposição.

$$\Phi_{\text{RSNO}} = \frac{\Delta \text{RSNO}}{I} \quad (30)$$

onde:

ΔRSNO = número de moléculas de RSNO fotolisadas por segundo

I = número de fótons incidentes por segundo, calculado a partir da eq. 13.

A figura 34 mostra os rendimentos quânticos (Φ) calculados para a fotodecomposição da CiSNO, SNAC e GSNO, obtidos a partir das curvas cinéticas mostradas na figura 33.

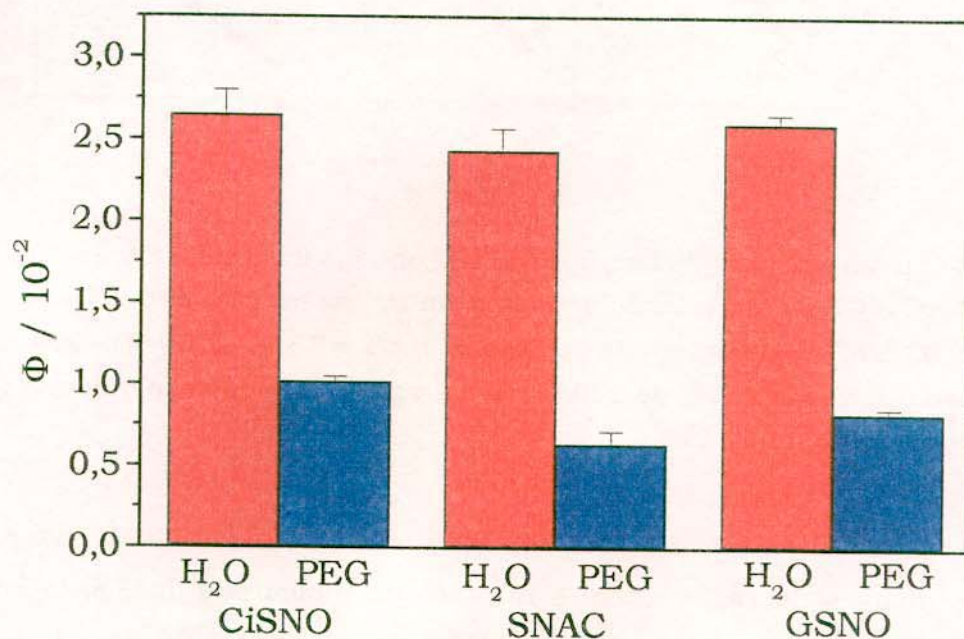
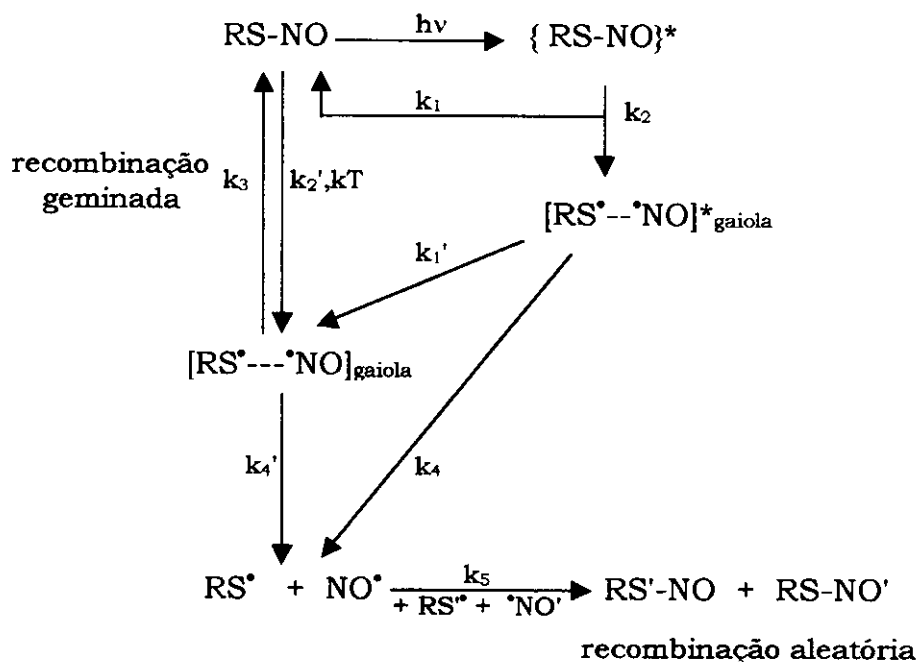


Figura 34. Rendimentos quânticos na fotodecomposição dos RSNOs em solução aquosa e em matriz de PEG 600, calculados a partir das curvas cinéticas apresentadas na figura 33. Irradiação com $300 < \lambda < 400$ nm. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

A partir das comparações feitas na figura 34, foi calculado que a matriz de PEG 600 reduz em 2,6; 3,7 e 3 vezes liberação fotoquímica de NO^* a partir da CiSNO, SNAC e GSNO respectivamente, quando estas soluções são

irradiadas com $300 < \lambda < 400$ nm com a lâmpada de vapor de Hg de 200 W. Esta redução confirma a interpretação baseada na redução das v_{is} descrita na figura 32.

Baseando-se nestes resultados e no modelo proposto por Noyes (1955), foi possível propor um mecanismo para a fotodecomposição dos RSNOs (esquema 6).



Esquema 6. Mecanismo de recombinação dos RSNOs baseado no modelo de Noyes (1955), onde k_1 e k_1' são as constantes de velocidade de desativação não radiativa; k_2 e k_2' as de formação do par radicalar no estado excitado e no fundamental, respectivamente; k_3 a de recombinação do par de radicais no estado fundamental; k_4 e k_4' as de escape dos radicais da gaiola e k_5 a de recombinação aleatória de radicais livres que escaparam da gaiola.

Segundo o esquema 6 a decomposição dos RSNOs irá depender das constantes k_4 e k_4' que estão relacionadas com a difusão dos pares de radicais que escapam da gaiola e de k_5 que está relacionada com a recombinação aleatória de radicais que escaparam da gaiola. Nos acompanhamentos cinéticos (lentos) feitos neste trabalho não é possível diferenciar os RSNOs formados na

recombinação geminada (independente de difusão) e na aleatória (dependente da difusão).

Uma forma conveniente de definir a eficiência da recombinação geminada (F) é defini-la como o inverso da eficiência da gaiola menos 1:

$$F = (1/\text{eficiência da gaiola}) - 1 \quad (31)$$

Segundo o modelo de Noyes (1955), F pode ser expressa quantitativamente como:

$$F = \left(\frac{R_0 - 2b}{2b} \right) + \left(\frac{R_0}{2b} \right) \left[\left(\frac{A_T + \alpha \cdot A_E}{\alpha} \right) \left(\frac{1}{\eta} \right) + \left(\frac{A_T \cdot A_E}{\alpha} \right) \left(\frac{1}{\eta} \right)^2 \right] \quad (32)$$

onde:

b = raio do radical

$1/\eta$ = fluidez do solvente

R_0 = separação inicial dos fragmentos

A_E = energia translacional dos fragmentos que se separam

A_T = massa e raio dos fragmentos respectivamente.

α = probabilidade, por colisão, de que os pares irão reagir.

A equação 32 implica na existência de uma relação linear de F com a fluidez ($1/\eta$), considerando-se que para solventes de viscosidade alta o termo quadrático ($(1/\eta)^2$) pode ser desprezado. Para solventes muito fluidos, onde o termo quadrático se torna importante, não é possível fazer esta consideração e nestes casos, não há uma relação linear de F com a fluidez. No caso da matriz de PEG que apresenta viscosidade alta, os valores de fluidez ($1/\eta$) variam de 3,8 a $1,1 \times 10^{-2} \text{ cP}^{-1}$ e os valores do termo quadrático $(1/\eta)^2$ variam de $1,4 \times 10^{-3}$ a $1,2 \times 10^{-4} \text{ cP}^{-1}$. Assim, pode-se observar que o termo quadrático é de 1 a 2 ordens de magnitude menor que o valor de fluidez, podendo-se então, ser

desprezado. Apesar do modelo proposto no esquema 6 estar baseado no modelo de Noyes, não podemos ajustar a equação 32 aos dados experimentais, pois não possuímos os valores dos parâmetros de separação inicial dos fragmentos, da energia translacional, da probabilidade de reação dos fragmentos e raio do radical.

Kodama (1962) estudou o efeito da viscosidade no rendimento quântico da decomposição do azometano. Este autor encontrou uma região onde F era linear com $1/\eta$ mas em valores altos de fluidez foi observada uma curvatura. O mesmo comportamento foi observado em estudos feitos por Szwarc e Asami (1962), Barlett e co-autores (1966). Pryor e Smith (1970) utilizaram a variação da viscosidade como um teste para determinação quantitativa e qualitativa da recombinação dos pares radicalares na gaiola. Foram utilizados alguns iniciadores (iniciadores azo, peresteres e peróxidos) em vários solventes (uma série de alcanos) que apresentam viscosidades diferentes. Estes autores fizeram uma análise qualitativa, onde foi observado que a constante de velocidade de decomposição de iniciadores que se decompõem através da quebra de apenas uma ligação, é dependente da viscosidade do solvente. Por outro lado, a constante de velocidade de iniciadores que se decompõem através da quebra simultânea de várias ligações é independente da viscosidade do solvente. Estes dados foram concordantes com outros dados da literatura. Além disso, estes autores também propuseram uma equação que permite uma análise semi-quantitativa, relacionando a constante de velocidade de decomposição dos iniciadores observada (k_{obs}) e a viscosidade do solvente, baseada na equação de Arrhenius.

$$1/k_{obs} = 1/k_1 + (k_{-1}/k_1 A_D)(\eta/A_v)^\alpha \quad (33)$$

onde:

k_{obs} = constante de velocidade observada

k_1 = constante de velocidade de formação do par radicalar na gaiola

k_{-1} = constante de velocidade de recombinação geminada dos pares de radicais

A_D e A_v = fatores pré-exponenciais relacionados com a energia necessária para ocorrer a difusão

$$\alpha = 0.5$$

Construindo-se o gráfico de $1/k_{obs}$ vs η/A_v estes autores obtiveram o valor de k_1 e utilizaram a equação 34 para determinar a fração da recombinação.

$$f_r = 1 - k_{obs}/k_1 \quad (34)$$

Os valores de f_r obtidos pelo método de viscosidade apresentaram valores apenas razoavelmente próximos dos descritos por outros métodos.

Traylor e co-autores (1993) estudaram o efeito da viscosidade, polaridade e impedimento estérico na fotoejeção de NO de complexos imidazol-ferro(II) porfirina-NO em soluções aquosas contendo 1-metilimidazol, em tolueno, em nujol e glicerina. As porfirinas utilizadas foram mesoheme, antraceno-7,7-ciclofano heme, adamantano-6,6-ciclofano heme e piridina-5,5-ciclofano heme. Neste trabalho foi utilizada a fotólise de pulso para o acompanhamento da recombinação geminada do NO (eq. 35).



onde B é a porfirina utilizada: mesoheme, antraceno-7,7-ciclofano heme, adamantano-6,6-ciclophano heme ou piridina-5,5-ciclofano heme. Estes autores observaram que solventes polares reduzem o rendimento quântico da reação de liberação de NO (Φ_{NO}), que o efeito estérico tem pouca influência no Φ_{NO} e que o aumento na viscosidade causa uma redução no Φ_{NO} . Na literatura é possível encontrar muitas reações onde a fração de pares de radicais que escapam da gaiola é uma função linear de $(1/\eta)^n$, com valores de n variando

entre 0,5 (Koenig, 1968) e 1,0 (Nikki, 1974). A teoria baseada no movimento Browniano prevê o valor de 0,5 (Leffer, 1993) enquanto o modelo de Noyes prevê $n = 1$. Os valores de n calculados pela literatura são muito escassos se comparados à ampla faixa de viscosidade que se pode obter experimentalmente. Assim, o melhor valor de n deve ser calculado em cada caso, não se podendo simplesmente utilizar dados da literatura. Além disso, aparentemente os efeitos específicos de solvatação devem ser levados em consideração (Leffer, 1993).

Neste trabalho, foram feitos acompanhamentos cinéticos da fotodecomposição da GSNO em matriz de PEG 200, 300 e 400. Estas matrizes apresentam viscosidades nominais de 4,9; 6,5 e 8,2 cP⁻¹ respectivamente, a aproximadamente 100 °C. Assim, através da utilização de PEGs de massas molares nominais diferentes é possível se ter matrizes com viscosidades nominais diferentes, mantendo-se o mesmo efeito de solvatação. A figura 35 mostra a fotodecomposição da GSNO em matrizes de PEG 200, 300 e 400, sob irradiação com luz UV/Vis. A partir das curvas cinéticas foi possível calcular as velocidades iniciais relacionadas com a fotoejeção do NO[•] a partir da GSNO. Nota-se nesta figura que a diferença entre as velocidades iniciais das curvas obtidas em PEG 200 ($v_i = (1,00 \pm 0,03) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$), PEG 300 ($v_i = (1,00 \pm 0,02) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e 400 ($v_i = (1,0 \pm 0,2) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) não é significativa. O aumento da massa molar leva a um aumento da viscosidade macroscópica, porém o efeito gaiola é influenciado pela viscosidade microscópica, assim, é possível que o aumento da massa molar possa não causar um aumento significativo na viscosidade microscópica. Além disso, é necessário se considerar que a GSNO é a molécula menos afetada pelas variações de viscosidade em função de seu grande volume de Van der Waals, como mostra a figura 31. Neste caso, a GSNO pode não ter sido a melhor sonda para a verificação do efeito da viscosidade nestas matrizes de PEG na fotodecomposição dos RSNOs.

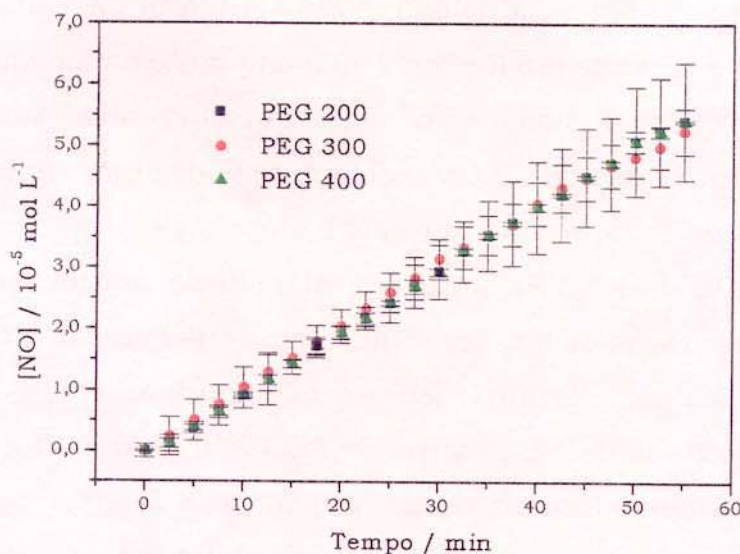


Figura 35. Curvas cinéticas de liberação de NO* durante a fotodecomposição da GSNO, irradiada com luz UV/Vis em matrizes de PEG com massas molares nominais diferentes (200, 300 e 400 g/mol). As absorbâncias foram normalizadas e as irradiações feitas, com uma lâmpada de vapor de Hg de 125 W. Concentração de GSNO = 0,03% m/m em todos os casos. Os experimentos foram feitos a 25° C. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

Uma outra forma de alterar a viscosidade mantendo o mesmo efeito de solvatação é utilizar uma mesma matriz alterando-se a temperatura, assim, foi realizado um experimento onde a viscosidade macroscópica foi variada a partir da variação da temperatura da matriz. Para muitos líquidos a dependência de η com a temperatura pode ser descrita pela equação 36.

$$\eta = A \cdot e^{B/T} \quad (36)$$

onde A e B são constantes positivas características do líquido, ou na forma da equação de Arrhenius

$$\eta = \eta_0 \cdot e^{-(E_a/RT)} \quad (37)$$

onde η_0 = viscosidade inicial, E_a é a energia necessária para que a molécula do reagente escape das moléculas vizinhas (do solvente), ou seja, a

energia que deve ser superada para ocorrer a difusão, R é a constante dos gases e T é a temperatura (Levine, 1983).

Para se avaliar a variação do rendimento quântico de fotodecomposição da GSNO com a variação da viscosidade, através da variação da temperatura, foi escolhido o PEG 600. Esta escolha se deveu à observação de que esta matriz apresenta uma variação mais significativa na viscosidade em uma faixa estreita de temperatura.

A viscosidade da matriz de PEG 600 variou de acordo com a equação 38, obtida experimentalmente a partir do ajuste da curva de $\eta \times T$ da figura 36.

$$\eta = 10,7 + 80,0 e^{-(T-20)/15,55} \quad (38)$$

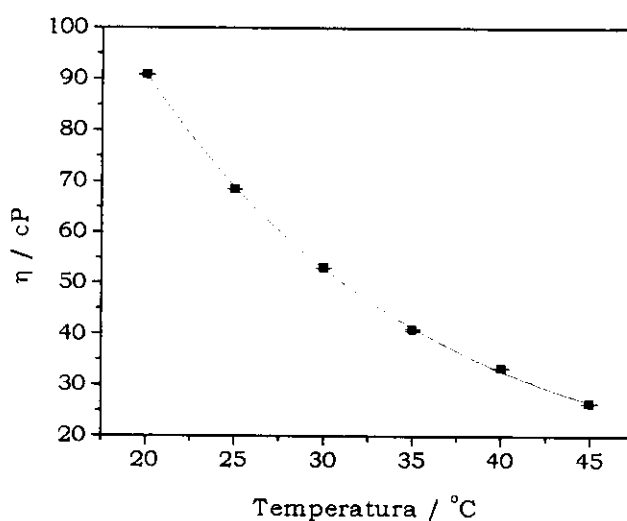


Figura 36. Variação da viscosidade cinemática (η) com a temperatura da matriz de PEG 600 com 0,04% m/m de GSNO. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

Para se descontar o efeito da decomposição térmica nas várias temperaturas utilizadas, os valores de $[\text{NO}^*]$ liberado obtidos durante a decomposição térmica na mesma escala de tempo foram subtraídos dos valores de $[\text{NO}^*]$ liberado obtidos durante a decomposição sob irradiação. Nestes

experimentos foi utilizada a irradiação no UV/Vis para se obter uma maior intensidade de irradiação. Os acompanhamentos foram feitos a 20, 30 e 40° C (Fig 37a). A partir das velocidades iniciais (v_i) de fotólise, obtidas a partir das curvas cinéticas da figura 37a, foi feito um gráfico de v_i vs fluidez ($1/\eta$) da matriz, que está apresentado na figura 37b.

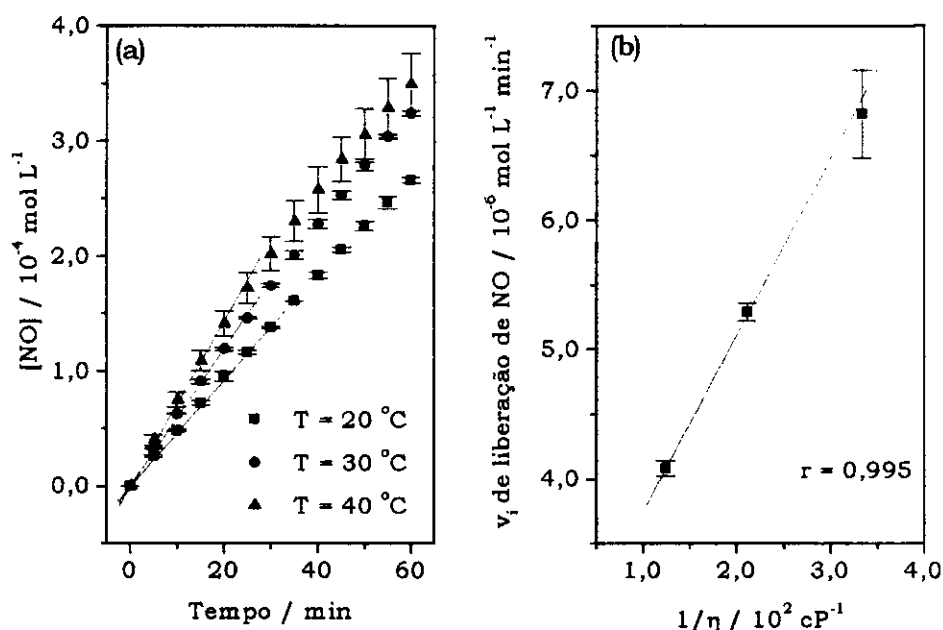


Figura 37. (a) Curvas cinéticas de variação de [NO*] liberado em função do tempo durante a fotodecomposição da GSNO em matriz de PEG 600 com temperaturas de 20, 30 e 40 °C e (b) Variação da velocidade inicial de liberação de NO* durante a fotodecomposição da GSNO em função da fluidez. As concentrações iniciais de GSNO foram de 0,03 % m/m (1,1x10⁻³ mol L⁻¹). Os valores de [NO*] liberado durante a decomposição térmica no escuro, nas mesmas temperaturas e nos mesmos períodos de tempo foram subtraídos dos valores de [NO*] liberado durante a irradiação. A irradiação foi feita utilizando-se uma lâmpada de vapor de Hg de 125 W, em toda a faixa espectral $\lambda = 300-600$ nm. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

A figura 37b mostra uma boa correlação linear entre as v_{is} e a fluidez, mostrando que para o sistema em questão $n = 1$, concordando com o modelo de Noyes. A redução da viscosidade com o aumento da temperatura leva a um

aumento na velocidade inicial de fotólise. Este comportamento está de acordo com o modelo de recombinação geminada proposto no esquema 6, uma vez que podemos assumir que a v_i na quebra homolítica da ligação S-NO é diretamente proporcional a F:

$$v_i \propto F \quad \text{ou} \quad v_i = c_g \cdot F \quad (39)$$

onde c_g é uma constante de proporcionalidade associada à gaiola do solvente.

Foram feitos também acompanhamentos da fotodecomposição do nitroprussitado de sódio (NPS) que é termicamente estável na matriz de PEG 600. As irradiações do NPS foram feitas com $\lambda > 480$ nm para que ocorresse apenas a liberação seletiva de NO^* (Shishido e de Oliveira, 2001).

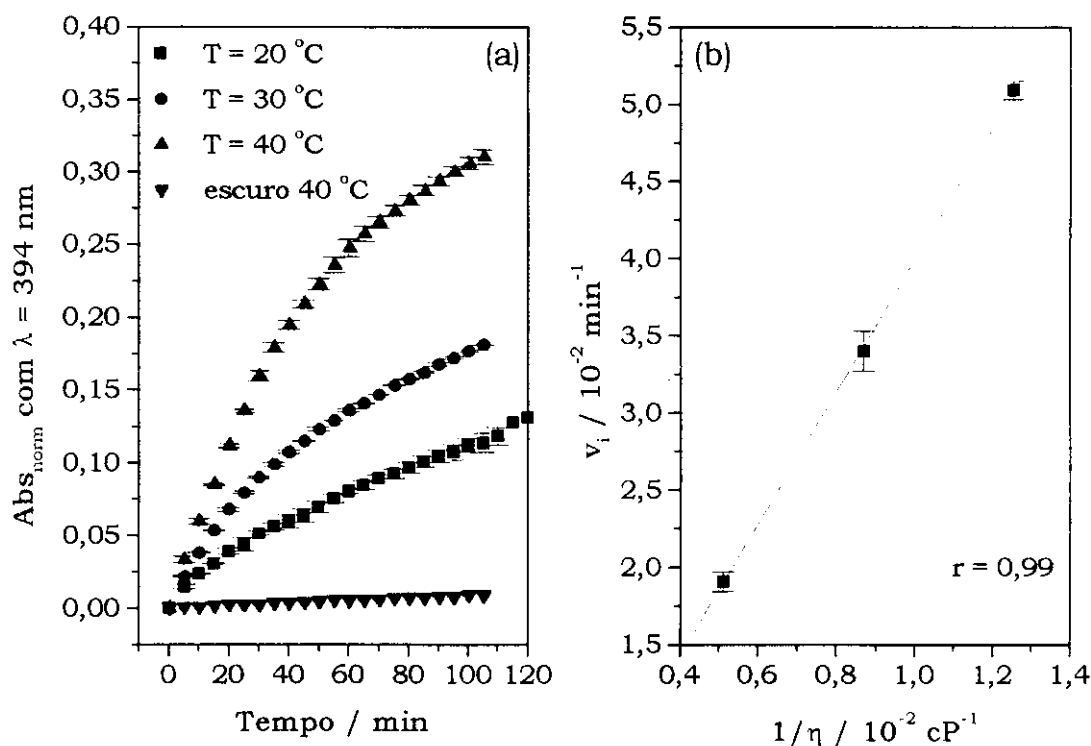


Figura 38. (a) Curvas cinéticas da fotodecomposição do NPS em matriz de PEG 600 com variação da temperatura e (b) Variação da velocidade inicial de fotogeração de NO^* em função da fluidez. As variações de absorbância foram monitoradas em 394 nm, que corresponde à absorção do produto $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$.

A figura 38a mostra as curvas cinéticas de fotodecomposição do NPS a 20, 30 e 40° C, incluindo uma curva controle, obtida no escuro a 40° C. Estas curvas se baseiam na formação do produto primário da fotodecomposição, o ânion $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$, que apresenta uma banda de absorção em 394 nm. As v_i s foram calculadas e o gráfico de v_i versus $1/\eta$ mostra que neste caso também existe uma correlação linear entre a decomposição do NPS e a fluidez do solvente (Fig. 38b). Neste caso também se obteve o valor de $n = 1$, concordando com o modelo de Noyes de recombinação geminada.

Para se verificar a dependência do rendimento quântico (Φ) de fotodecomposição da GSNO com a fluidez ($1/\eta$) do PEG 600, foram feitas irradiações utilizando-se um filtro de luz que restringe o λ de irradiação para a faixa de 300-400 nm.

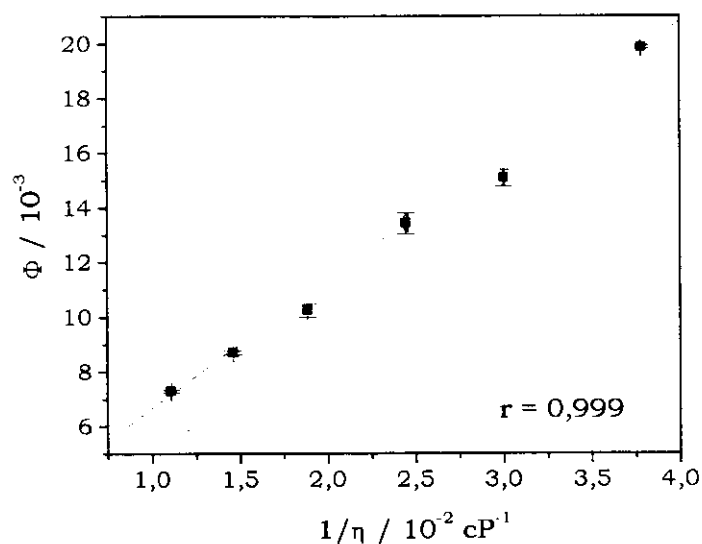
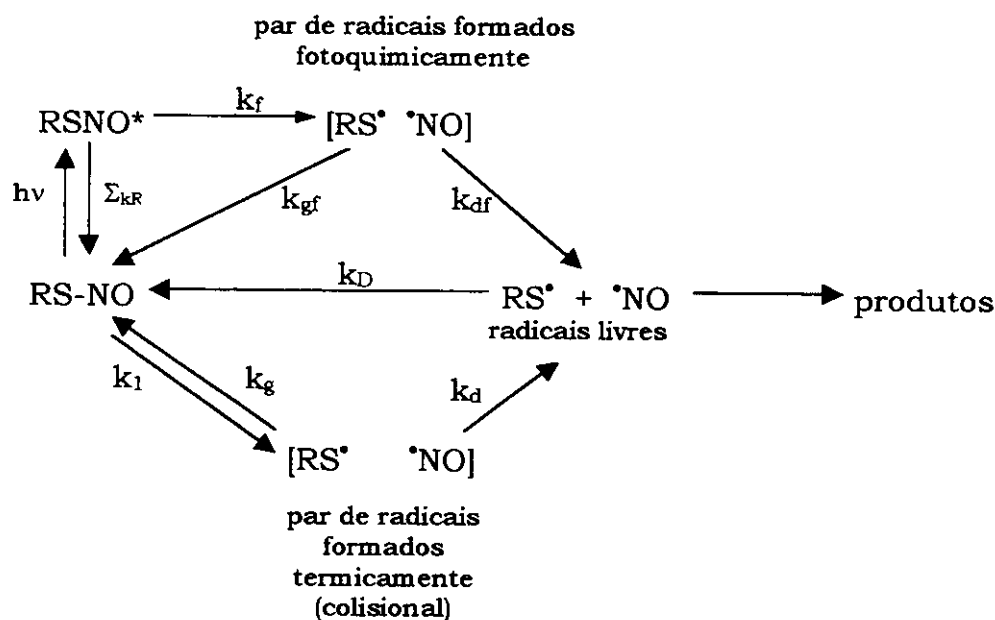


Figura 39. Variação do rendimento quântico (Φ) da fotodecomposição da GSNO em função da fluidez. A variação da fluidez foi obtida utilizando-se temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40 e 45° C. Foram utilizadas soluções de GSNO de 0,03% m/m (7×10^{-4} mol L^{-1}) em PEG 600 e irradiação em $300 < \lambda_{\text{irr}} < 400$ nm, com um lâmpada de vapor de Hg de 200 W. As barras de erro correspondem à estimativa do desvio padrão de duplicatas.

Neste caso, foi utilizado o actinômetro químico Aberchrome 540 para o cálculo da intensidade de luz (Heller e Langar, 1981). A fotodecomposição da

GSNO foi monitorada a 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 e 45,0° C. A figura 39 mostra que a variação de Φ com $1/\eta$ para a fotodecomposição da GSNO apresentou boa linearidade, para $n = 1$, concordando também com o modelo de Noyes. Assim, de forma análoga à equação 36 podemos assumir que Φ é também diretamente proporcional a F .

Com base no método de cálculo de eficiência da gaiola proposto por Covert e co-autores (1992), para compostos organometálicos pode-se representar o mecanismo de decomposição dos RSNOs, de acordo com o esquema 7 abaixo, que é análogo ao esquema 6.



Esquema 7. Mecanismo simplificado para a decomposição dos RSNOs. Onde os produtos são RSSR e 2NO. k_f e k_1 são as constantes de velocidade de formação dos pares de radicais presos na gaiola através de reação fotoquímica e térmica, respectivamente. k_{gf} e k_g são as constantes de velocidade para a recombinação do par de radicais presos na gaiola formados fotoquimicamente e termicamente, respectivamente. k_d e k_D são as constantes de velocidade para reações de afastamento dos pares e de recombinação aleatória, respectivamente. Estas últimas constantes dependem da difusão dos pares de radicais na solução.

Os fatores de eficiência das gaiolas no processo térmico (F_g) e fotoquímico (F_f) podem ser calculados através das equações:

$$F_g = k_g / (k_g + k_d) \quad \text{e} \quad F_f = k_{gf} / (k_{gf} + k_{df}) \quad (40)$$

Considerando-se apenas a porção fotoquímica do esquema pode-se obter a seguinte relação:

$$\Phi_{\text{obs}} = \Phi_{\text{par}} \left[\frac{k_{df}}{k_{gf} + k_{df}} \right] = \Phi_{\text{par}} [1 - F_f] \quad (41)$$

Rearranjando-se a equação 41, temos

$$\frac{1}{\Phi_{\text{obs}}} = \frac{1}{\Phi_{\text{par}}} \left[1 + \frac{k_{gf}}{k_{df}} \right] \quad (42)$$

Assumindo-se que o processo de difusão (afastamento do par de radicais formados) segue a relação de Stokes-Einstein-Smoluchowski, tem-se que $k_{df} \propto D \propto 1/\eta$. Ou seja

$$k_{df} = c \cdot \frac{1}{\eta} \quad (43)$$

onde c é a constante de proporcionalidade.

Substituindo-se a equação 43 na equação 42, tem-se:

$$\frac{1}{\Phi_{\text{obs}}} = \frac{1}{\Phi_{\text{par}}} \left[1 + \left(\frac{k_{gf}}{c} \right) \eta \right] \quad (44)$$

A partir da relação obtida na equação 44, nota-se que em um gráfico de $1/\Phi_{\text{obs}}$ em função de η o intercepto será igual a $1/\Phi_{\text{par}}$ e a inclinação será $(1/\Phi_{\text{par}})(k_{\text{gf}}/c)$.

A figura 40a mostra que o gráfico de $1/\Phi$ versus η . Fazendo-se uma regressão linear dos pontos obtidos, pode-se notar que esta variação apresentou boa linearidade, possibilitando o cálculo do valor de $\Phi_{\text{par}} = 0,08$ através do intercepto da reta e de $(1/\Phi_{\text{par}})(k_{\text{gf}}/c) = 1,4\eta$, através da inclinação da reta. Uma vez obtido o valor de Φ_{par} foi possível calcular a eficiência da gaiola no processo fotoquímico.

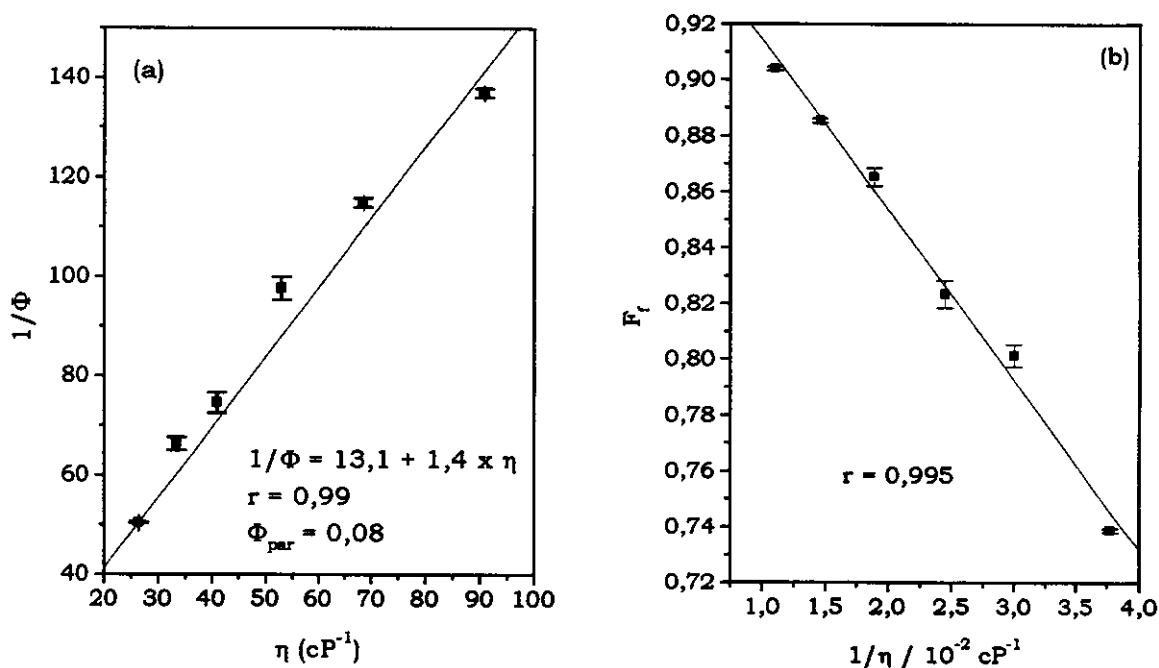


Figura 40. (a) Inverso do rendimento quântico de fotodecomposição da GSNO em função da viscosidade do solvente e (b) Variação da eficiência da gaiola em função da fluidez do solvente.

A partir da equação 40, onde $\Phi_{\text{obs}} = \Phi_{\text{par}} (1 - F_f)$, pode-se obter os valores de F_f . Os valores de F_f em função da fluidez do solvente estão mostrados no gráfico 40b. Observa-se que a F_f é reduzida linearmente com o aumento da fluidez, este comportamento concorda com o mecanismo de decomposição proposto no

esquema 7 e com a equação 32. Esta equação foi proposta por Noyes e prevê que a eficiência da gaiola (F_f) varia linearmente com a fluidez, sendo que para o nosso caso, o termo quadrático da equação 32 não é significativo, como já havíamos demonstrado.

A eficiência da gaiola F_f é uma medida quantitativa de como o solvente afeta o mecanismo de recombinação em reações radicalares. Junto com a viscosidade existem outros fatores que afetam F_f como o tamanho dos pares de radicais formados, bem como a sua geometria e massa. Noyes já havia previsto que o efeito gaiola deve aumentar com o aumento do tamanho do radical e com a redução da massa do radical. Com um tamanho maior, a difusão do radical deve ser reduzida, dificultando o afastamento do par de radicais formados, aumentando sua taxa de recombinação. A razão do aumento do efeito gaiola com a redução da massa deve-se ao fato de que um radical mais “leve” deve ter um momento menor e assim uma menor capacidade de “quebrar” a gaiola exercida pelo solvente.

Para a reação radicalar ocorrer é necessária uma certa orientação mútua para que um radical reaja com outro. Assim, qualquer processo que mude a orientação mútua dos radicais ou que evite o realinhamento deles irá reduzir F_f . As colisões dos radicais com as moléculas do solvente são muito freqüentes e tendem a mudar a orientação dos radicais. Assim, a recombinação geminada só ocorre após várias colisões entre os radicais. Após estas colisões, se os radicais não estiverem alinhados de forma apropriada, os mesmos irão se difundir antes que ocorra algum realinhamento acidental (Braden *et al.*, 2001).

Branden e colaboradores (2001) fizeram uma investigação do efeito da polaridade do solvente para compostos organometálicos ($\text{Cp}'\text{Mo}(\text{CO})_3$, onde $\text{Cp}' = \eta^5\text{-C}_5\text{H}_4\text{CH}_3$). Estes autores observaram que mesmo com a formação de pares de radicais polares, a polaridade do solvente não afeta ou afeta muito pouco o processo de recombinação geminada. Os autores concluíram que a orientação devido a uma interação eletrostática entre o radical formado e o solvente não é significativamente mais rápida do que a orientação devido às colisões com as moléculas do solvente.

É importante ressaltar que no nosso caso, os acompanhamentos cinéticos mostram o resultado das recombinações geminadas e não-geminadas sem distinção, devido ao monitoramento ter sido feito em intervalos de tempo longos, isto é com resolução temporal baixa.

Para verificar a cinética de recombinação na escala de tempo de μs foram feitos acompanhamentos cinéticos da reação de liberação de $\text{NO}^\bullet$ utilizando-se a técnica de fotólise de pulso. As medidas de fotólise de pulso foram feitas em colaboração com o Prof. Dr. Frank H. Quina e o doutorando Paulo F. Moreira do Instituto de Química da USP de São Paulo. Nesses experimentos, foi utilizado um detetor com constante de tempo baixa para que os resultados obtidos pudessem ser comparados com os de Wood e colaboradores (1996).

A figura 41 mostra as curvas cinéticas das medidas de fotólise de pulso da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG 600.

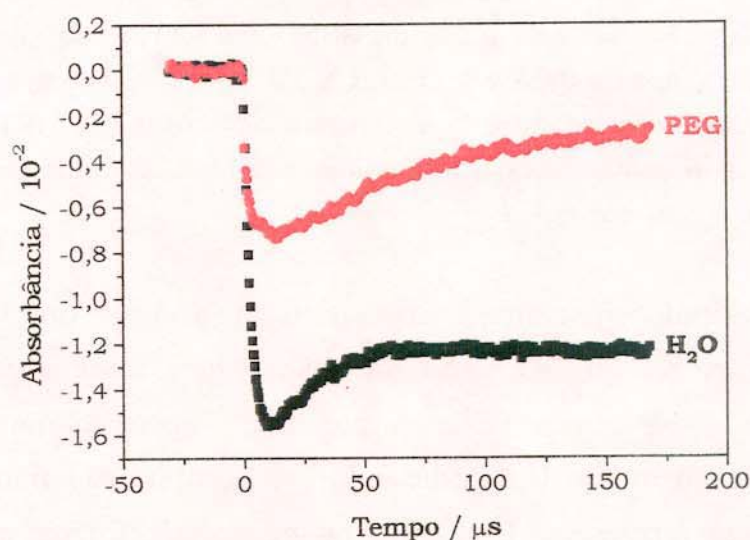


Figura 41. Medidas de fotólise de pulso da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG 600. Concentrações de 0,03% m/m ($\sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), à temperatura ambiente, com $\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$, utilizando um laser Quantel YG 660 Nd/YAG. Duração do pulso = 8 ns, intervalo entre as medidas = 0,4 μs e tempo total da medida = 168 μs . Comprimento de onda de acompanhamento = 336 nm

A queda inicial da densidade óptica em 336 nm deveria corresponder à diminuição da população de GSNO no estado fundamental. Porém, o fato de

existirem vários pontos entre o estado inicial e o mínimo de absorbância, indica a ocorrência de algum outro processo. Este comportamento também se repetiu em um outro experimento, onde foi feito um acompanhamento dos primeiros 20 μs (Fig. 42).

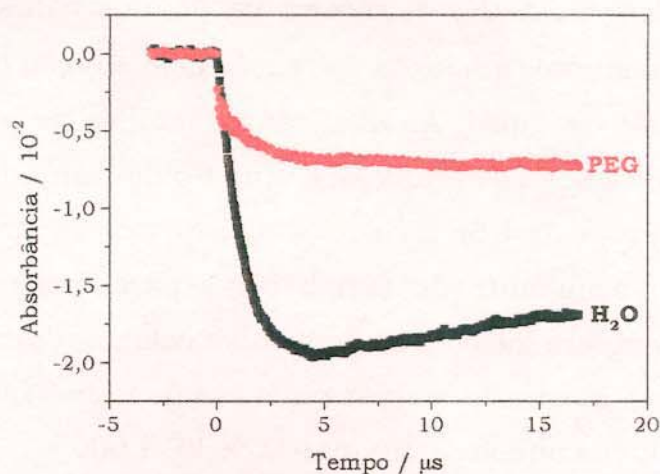


Figura 42. Medidas de fotólise de pulso da GSNO em solução aquosa e em matriz de PEG 600. Concentrações de 0,03% m/m ($\sim 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), à temperatura ambiente, com $\lambda_{\text{irr}} = 355 \text{ nm}$, utilizando um laser Quantel YG 660 Nd/YAG. Intervalo entre medidas = 0,4 μs e tempo total da medida = 20 μs . Comprimento de onda de acompanhamento = 336 nm

Estes resultados permitem apenas uma análise qualitativa. Pode-se observar na figura 41 que a queda na absorbância após o pulso de laser é maior em H_2O do que em PEG. A partir de aproximadamente 13 μs a absorbância começa a aumentar, indicando a recombinação não geminada dos pares de radicais formados. Este retorno ocorre de forma mais brusca na solução aquosa, atingindo-se um patamar após 50 μs . Na matriz de PEG o valor de absorbância aumenta continuamente e o patamar não foi observado após 200 μs .

Pode-se também, fazer uma comparação da extensão da reação de recombinação. Para este cálculo o valor mínimo de absorbância observado em cada caso, foi considerado 100% da reação de formação de pares de radicais que escaparam da gaiola. Assim, o valor de absorbância “recuperado” durante a

recombinação (após atingido o valor mínimo), corresponde à porcentagem de formação de GSNO através da recombinação. No tempo de aproximadamente 75 μ s pode-se calcular com base na figura 41 que 22% dos pares de radicais se recombinaram após o pulso de laser em solução aquosa, enquanto em matriz de PEG este valor foi de 44%. É importante ressaltar que nestes experimentos foi utilizado um detetor de constante de tempo baixa, assim, tanto a redução como o aumento da densidade ótica devem estar relacionados com processos relativamente lentos (da ordem de vários μ s), dependentes da difusão dos pares de radicais formados.

Estes resultados podem ser interpretados como uma seqüência de reações. No tempo zero ($t = 0$ μ s) o pulso de laser é disparado, excitando as moléculas de GSNO, resultando em uma redução da população de GSNO no estado fundamental. Esta população sofrerá quebra homolítica da ligação S-N formando os pares de radicais $GS^{\bullet}$ e $NO^{\bullet}$. Uma vez formados estes pares, dependendo da eficiência da gaiola, uma parte deles irá se recombinar e a outra escapará da gaiola. A quebra homolítica da ligação S-N irá causar uma redução no valor de absorbância, enquanto a recombinação geminada irá causar a recuperação do valor de absorbância. Porém, não foi possível observar esta seqüência de fotólise e recombinação geminada (que deve ocorrer na escala de tempo de 10^{-9} s) neste experimento, uma vez que utilizamos um detetor com a constante de tempo baixa. A redução progressiva (e não imediata) de absorbância até cerca de 10 μ s pode ser atribuída à reação dos radicais tiila ($GS^{\bullet}$) formados fotoquimicamente, que escaparam da gaiola do solvente, com GSNOs intactos, formando o dímero GS-SG e $NO^{\bullet}$, causando uma redução “lenta” dos valores de absorbância. Após alguns μ s, a concentração de $GS^{\bullet}$ é reduzida devido à sua reação com os GSNOs intactos enquanto a concentração de $NO^{\bullet}$ se torna mais alta devido à liberação deste radical através desta mesma reação. Assim, em um determinado instante (ponto de mínimo de absorbância) ocorre um aumento na probabilidade de encontro entre $GS^{\bullet}$ e $NO^{\bullet}$ tornando esta reação mais importante, causando então um aumento nos valores de

absorbância. Portanto, o aumento dos valores de absorbância subsequente à sua redução pode ser atribuído à reação de recombinação não geminada. Esta interpretação é reforçada pelos valores de mínimo de absorbância atingidos na matriz de PEG e em solução aquosa. A reação dos radicais $GS^{\bullet}$ com moléculas de GSNO intactas é dependente da difusão. Sendo assim, a difusão destes radicais é reduzida com o aumento da viscosidade, fazendo com que esta reação apresente menor extensão na matriz de PEG do que em solução aquosa. Com o aumento da probabilidade de encontro de $GS^{\bullet}$ com $NO^{\bullet}$ a reação de recombinação torna-se mais importante, ocorrendo um aumento nos valores de absorbância após cerca de 13 μs em solução aquosa e em matriz de PEG. Como a difusão dos radicais em solução aquosa é maior do que em matriz de PEG, a reação de recombinação em solução aquosa é mais rápida (2 vezes mais do que em PEG) e cessa rapidamente após ~60 μs . A extensão da reação de recombinação na solução aquosa é baixa (~22%) e isto pode ser atribuído a uma menor quantidade de radicais $GS^{\bullet}$ presentes na solução. Estes radicais tem a sua quantidade reduzida, devido à sua reação com os GSNOs intactos nos primeiros 13 μs após o pulso. Além disso, ocorre uma redução dos radicais $NO^{\bullet}$ com o tempo, devido a sua difusão para fora da solução na forma gasosa.

Na matriz de PEG todas estas reações dependentes de difusão, são mais lentas, devido à sua viscosidade ser mais alta. Assim, espera-se que uma maior porcentagem de radicais $GS^{\bullet}$ formados permaneçam ativos na solução, uma vez que a reação com os GSNOs intactos ou com outro $GS^{\bullet}$ é reduzida nesta matriz. A reação de recombinação em PEG é 2 vezes mais lenta do que em solução aquosa, refletindo a redução da difusão das espécies nesta matriz. Uma maior extensão da reação de recombinação também é um reflexo da viscosidade aumentada, principalmente em relação ao radical $GS^{\bullet}$, pois ocorre uma redução da probabilidade de encontro desta espécie com outro $GS^{\bullet}$ ou com GSNO. Além disso, o tempo de residência do $NO^{\bullet}$ nesta matriz deve ser mais alto pois sua difusão para fora da solução também é reduzida.

Estes resultados concordam com o mecanismo de decomposição dos RSNOs proposto nesta etapa do trabalho, podendo-se então, atribuir o aumento de estabilidade dos RSNOs causado pela matriz de PEG, a um aumento na taxa de recombinação dos pares de radicais formados.

4.4. Efeito da matriz de copolímero em bloco PEO-PPO-PEO.

4.4.1. Interpretação do mecanismo de micelização e gelificação de copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO

As liberações térmica e fotoquímica de NO^{*} a partir dos RSNOs foram também estudadas em matrizes de hidrogel do copolímero em bloco poli(etileno glicol)-poli(propileno glicol)-poli(etileno glicol) (Pluronic F-127 (BASF) ou Poloxamer P 407 (ICI)), designado abreviadamente como F-127. O hidrogel aquoso formado apresenta gelificação reversa, isto é, a formação do hidrogel ocorre com o aumento da temperatura. Esta característica permite que soluções aquosas deste copolímero na faixa de concentração de 20-30 % m/m sejam líquidas a temperaturas baixas, sendo que a temperaturas mais altas, como a do corpo humano (~36 °C), ocorra a formação de um hidrogel. Devido à diferença de polaridade dos blocos de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) pode-se dissolver tanto compostos polares como apolares nestas matrizes. A liberação controlada de medicamentos utilizando-se géis de F-127 já vem sendo estudada por vários pesquisadores, devido à combinação das vantagens do hidrogel com a fácil administração de um líquido (Juhasz *et al.*, 1989).

A figura 43 mostra uma representação esquemática da formação de micelas e do hidrogel com o aumento de concentração e/ou temperatura. Em concentrações muito baixas ou temperaturas baixas as macromoléculas estão dissolvidas na solução. Com o aumento da temperatura e/ou concentração, inicia-se o processo de micelização com a segregação dos segmentos polares (OE) que se voltam para o líquido e dos apolares (OP), que se voltam para o interior das micelas. Em concentrações suficientemente altas (acima de 20%

m/m para o F-127), com o aumento da temperatura, as micelas passam a assumir um arranjo de empacotamento cúbico formando o hidrogel semi-sólido.

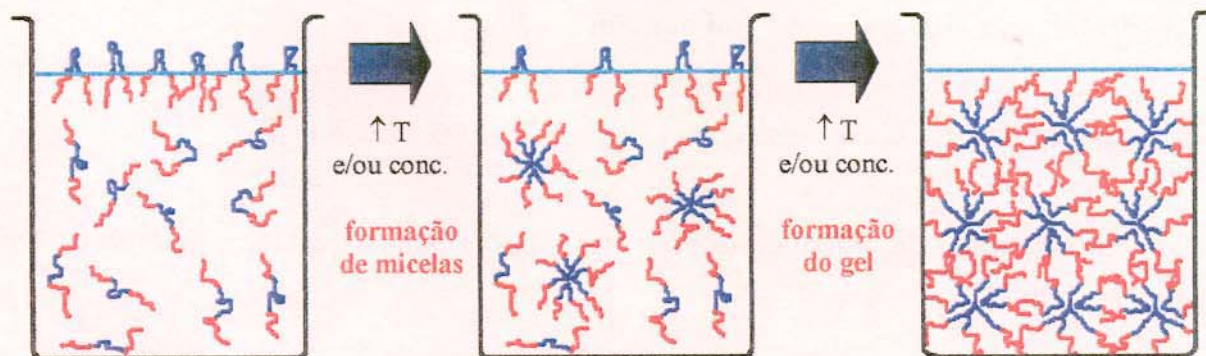


Figura 43. Representação esquemática da micelização e gelificação causada pelo aumento da temperatura e/ou concentração. Os segmentos vermelhos representam as unidades de repetição OE e os azuis representam as unidades OP.

Como mostra a figura 43, o processo de gelificação é precedido pela formação de micelas, que é dependente da temperatura e da concentração do copolímero em solução. Assim, surge a necessidade de um entendimento do processo de micelização deste copolímero. A temperaturas e/ou concentrações baixas as macromoléculas de F-127 dissolvidas na água se encontram na forma de novos individuais (unímeros). Com o aumento da temperatura e/ou da concentração são formadas micelas termodinamicamente estáveis (Alexandridis e Haton, 1995). Esta transição (unímeros → micelas) (Fig. 44) é acompanhada por um consumo de energia, que pode ser facilmente observado como um pico endotérmico intenso em medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) (Wanka *et al.*, 1994).

A formação de micelas ocorre devido à diferença de solubilidade das unidades OE (hidrofílicas) e unidades OP (hidrofóbicas), o que confere a este copolímero características de surfatantes não iônicos, como a propriedade de auto-associação. A grande solubilidade das unidades OE em água é atribuída a um “encaixe perfeito” da estrutura $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ na água. Kjellander e Florin (1981) sugeriram que a conformação do polímero pode ser ajustada de forma

que os segmentos OE preencham os vazios da rede estruturada da água causando uma perturbação mínima nesta rede, em contraste com outros poliéteres. No caso dos segmentos OP, sua estrutura não permite este encaixe perfeito, devido a um impedimento estérico causado pelo grupo metila adicionla (Alexandridis *et al.*, 1994). Assim, enquanto o poli(óxido de etileno) apresenta alta solubilidade em água, o poli(óxido de propileno) é praticamente insolúvel em água à temperatura ambiente (Kjelander e Florin, 1981).

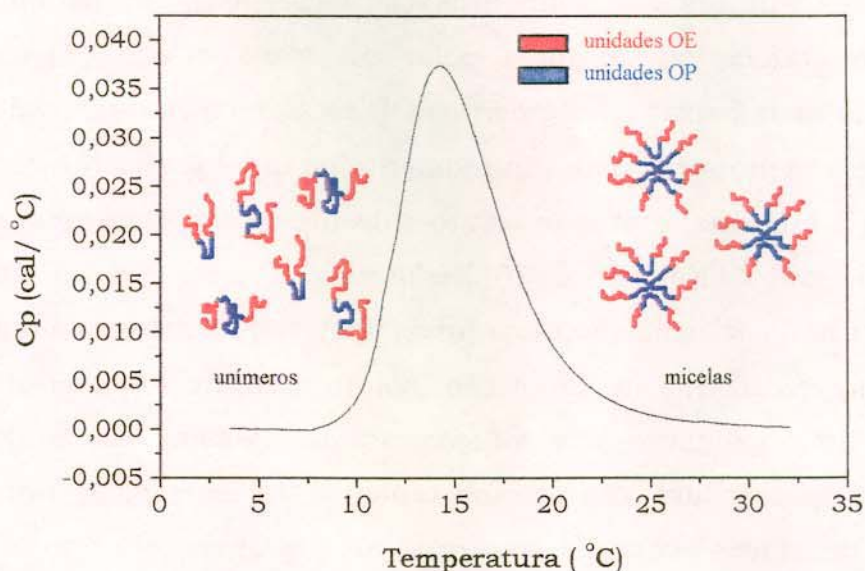


Figura 44. Representação esquemática da transição unímero → micelas (micelização) acompanhada pelo pico endotérmico observado no DSC de alta sensibilidade (HSDSC). Velocidade de varredura de 15 °C por h para uma solução com concentração de 20,5 % m/m de F-127.

As micelas destes copolímeros (PEO-PPO-PEO) são formadas por um interior hidrofóbico, composto de unidades OP e uma coroa hidrofílica, composta por unidades OE. A formação de micelas com o aumento de temperatura ocorre devido a uma redução da solubilidade das unidades OP e o contínuo aumento da temperatura leva a uma redução da solubilidade das unidades OE, levando à formação de mesofases e no caso de alguns copolímeros (PEO-PPO-PEO), à separação de fases (Pandit *et al.*, 2000).

O pico endotérmico observado por DSC é atribuído à energia necessária para a desidratação das unidades OP, que se tornariam cada vez menos solúveis em água, sendo segregadas e por fim formando as micelas (Wanka *et al.*, 1994). O aumento na temperatura também leva a uma redução da solubilidade das unidades OE, do copolímero. Neste caso, a hipótese mais aceita foi desenvolvida por Karlstrom (1985) e reforçada por medidas de RMNC¹³ e cálculos de mecânica quântica (Malmsten e Lindman, 1992). Segundo estes autores, os segmentos OE $-(CH_2-CH_2O)-$ podem assumir a conformação *gauche* que é mais polar ou *trans* que é mais apolar. Em temperaturas mais baixas os segmentos OE estão na forma *gauche* (mais polar) que apresenta menor energia e um momento de dipolo relativamente grande, o que resultaria em uma interação soluto-solvente maior, tornando o copolímero mais solúvel (Bailey e Koleske, 1976; Kjellander e Florin, 1981). Com o aumento da temperatura a conformação *trans* (mais apolar) que apresenta maior energia, é favorecida, reduzindo a interação soluto-solvente, colaborando para a segregação do copolímero em solução aquosa. Assim, as soluções destes copolímeros apresentam um comportamento termotrópico, isto é, sofrem transições de fases com a variação de temperatura, mantendo-se a concentração constante (Wanka, *et al.* 1994).

4.4.2. Caracterização do processo de gelificação.

Neste trabalho foram utilizadas soluções de F127 de concentrações 10 e 20,5% m/m, que estão portanto acima da concentração micelar crítica (cmc) que se encontra na faixa de 0,7-0,03% m/m (Alexandridis *et al.*, 1994) nas temperaturas de 25 - 35 °C, utilizadas neste trabalho. Foi constatado pela primeira vez que o processo de gelificação pode ser acompanhado utilizando-se um espectrofotômetro UV/Vis (Fig. 45). Nestes experimentos foi observado um aumento brusco da linha base durante o aquecimento das soluções, que foi atribuído à formação do hidrogel. A figura 45 mostra o acompanhamento do processo de gelificação de soluções de F-127 20,5% m/m puro (círculos

vermelhos) em comparação com soluções de F-127 20,5% m/m, contendo 15,1 mmol g⁻¹ de hidrogel de GSH, 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de NAC, 13,8 mmol de hidrogel de GSNO e 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de SNAC.

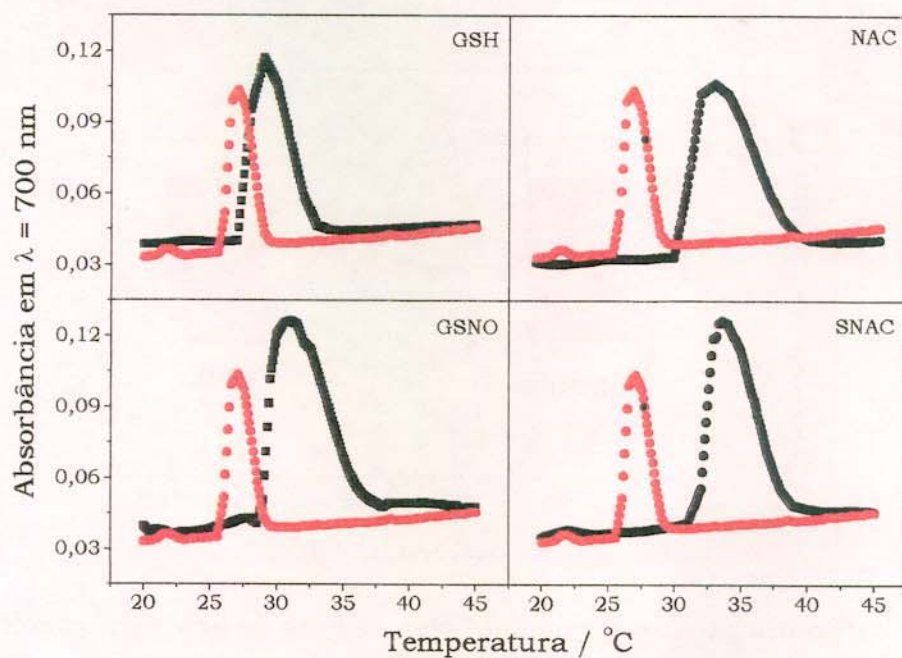


Figura 45. Variações transientes de absorbância em 700 nm, durante o processo de gelificação de soluções de F-127. As curvas com círculos vermelhos são da solução de F-127 20,5% m/m pura, mostradas como referência; as demais correspondem a soluções contendo contendo 15,1 mmol g⁻¹ de hidrogel de GSH, 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de NAC, 13,8 mmol de hidrogel de GSNO e 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de SNAC, com F-127 20,5% m/m.

A figura 45 mostra que o hidrogel de F-127 puro sofre uma variação transiente da absorção da linha base em 700 nm entre 25 e 30 °C enquanto que nas soluções contendo GSH, GSNO, NAC e SNAC esta variação ocorre entre 27-34 °C, 28-38 °C, 30-40 °C e 31-40 °C respectivamente. Estas variações transientes de absorção foram atribuídas ao processo de gelificação. A formação do hidrogel em todos os casos foi confirmada invertendo-se a cubeta e observando-se a temperatura onde não ocorre mais o escoamento da solução.

Em um outro experimento, pequenas esferas de aço (de 1,0 g em média e 0,6 cm de diâmetro) foram colocadas na superfície das soluções gelificadas de

F-127, nas cubetas, ficando sustentadas pelo hidrogel. Com o resfriamento das soluções para temperaturas abaixo dos valores onde se iniciam as variações transientes de absorbância da figura 46, as esferas foram ao fundo das cubetas.

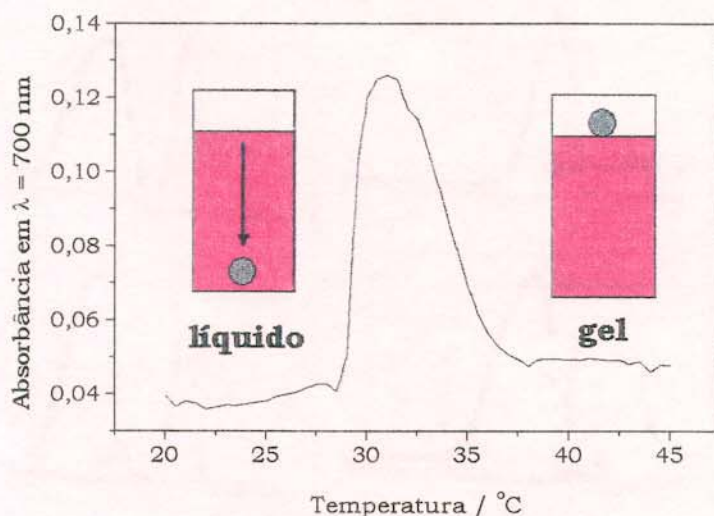


Figura 46. Representação do experimento com esferas de aço para a confirmação da gelificação acompanhada pelo espectrofotômetro.

Para a interpretação desta variação transiente da linha base é necessário observar o diagrama de fases do copolímero F-127.

Seguindo-se a seta de aumento de temperatura no diagrama de fases da figura 47, observa-se que em concentração próxima a 20% m/m, a solução é isotrópica e homogênea em temperaturas baixas. Com o aumento da temperatura, a solução micelar cruza a linha de equilíbrio solução-gel, a partir da qual há uma organização das micelas numa estrutura cúbica. A solução torna-se bifásica com a transição de fase micelar $\rightarrow$ fase cúbica. Embora estas duas fases sejam isotrópicas, a sua coexistência (micelas e estruturas cúbicas) causa a formação de micro-ambientes heterogêneos causando um espalhamento de luz, que pode ser observado como um aumento brusco da linha base. Após o processo de formação de duas fases, a solução torna-se homogênea novamente, formada inteiramente por micelas em uma estrutura cúbica e observa-se o retorno da linha base para valores próximos aos valores

de absorvância originais. É importante ressaltar que este processo só é detectado pois a transição de fase é conduzida em um estado fora do equilíbrio (Shishido *et al.*, 2003).

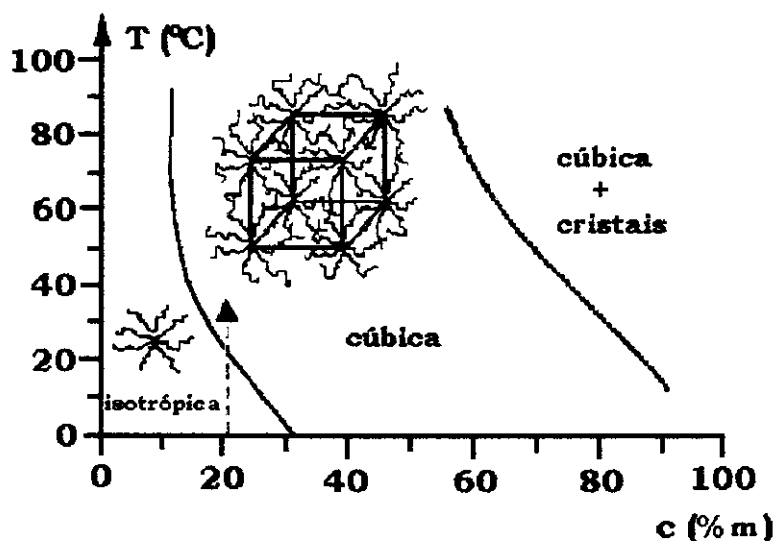


Figura 47. Representação do diagrama de fases do F-127 com base no trabalho de Wanka e colaboradores (1994).

A transição de fase de uma solução micelar para uma fase cúbica deve ser acompanhada também por um pequeno pico endotérmico, logo após ao pico endotérmico de micelização, devido ao processo de desidratação. Porém, esta transição é considerada quase atérmica, uma vez que a energia envolvida neste tipo transição (transição de mesofases) é em geral duas ordens de magnitude menor que a energia envolvida na micelização. Além disso, a formação da estrutura cúbica envolve uma energia menor do que as outras transições de mesofases, como da fase cúbica para hexagonal ou da hexagonal para lamelar observada em outros copolímeros. Isso se deve ao fato de que com a formação da estrutura cúbica não ocorre alteração na densidade das micelas e nem mudanças na sua geometria, sendo que estas alterações necessitam de um maior consumo de energia do que a formação da estrutura cúbica (Wanka *et al.*, 1994). Considerando-se a baixa energia envolvida no processo de gelificação tentamos utilizar o calorímetro diferencial de varredura de alta sensibilidade

(HSDSC) para a caracterização do processo de gelificação. O HSDSC é capaz de detectar processos da ordem de μW enquanto o DSC convencional detecta processos da ordem de mW . Através desta técnica observamos picos intensos e os comparamos com as medidas obtidas pelo espectrofotômetro (Fig. 48).

A figura 48 mostra a comparação entre as medidas obtidas por HSDSC e por espectrofotometria. Pode-se observar nesta figura que nas medidas de HSDSC o pico endotérmico ocorre no intervalo de temperatura de $10 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, enquanto o processo de gelificação observado pelo espectrofotômetro ocorre no intervalo de temperatura de $25 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta diferença no intervalo de temperatura indica que as duas técnicas estão acompanhando processos diferentes.

Este comportamento foi esclarecido através da comparação entre o acompanhamento das transições observadas espectrofotometricamente e calorimetricamente em uma solução aquosa de F-127 na concentração de $10\% \text{ m/m}$. O gráfico (F) da figura 48 mostra que através da técnica calorimétrica (HSDSC) foi possível detectar um pico semelhante ao observado nas soluções concentradas. Porém, foi observado visualmente (através da inversão da cubeta) que em soluções com esta concentração não ocorre o processo de gelificação com o aumento da temperatura. Este comportamento foi confirmado pela ausência pico transiente de absorção (curva (F) da Fig. 48). Isso indica que o pico observado por HSDSC deve ser atribuído a outro processo que não o de gelificação. Além disso, foram feitos os cálculos das variações de entalpia (ΔH), a partir da área dos picos obtidos por HSDSC. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 3. Os valores de ΔH obtidos mostraram que os processos acompanhados através de HSDSC apresentaram valores muito altos, compatíveis com os valores de ΔH de micelização da literatura, que estão no intervalo de $160 - 444\text{ kJ mol}^{-1}$, dependendo da concentração e da origem do copolímero utilizado. Assim, foi concluído que os picos endotérmicos observados por HSDSC correspondem ao processo de micelização e não de gelificação.

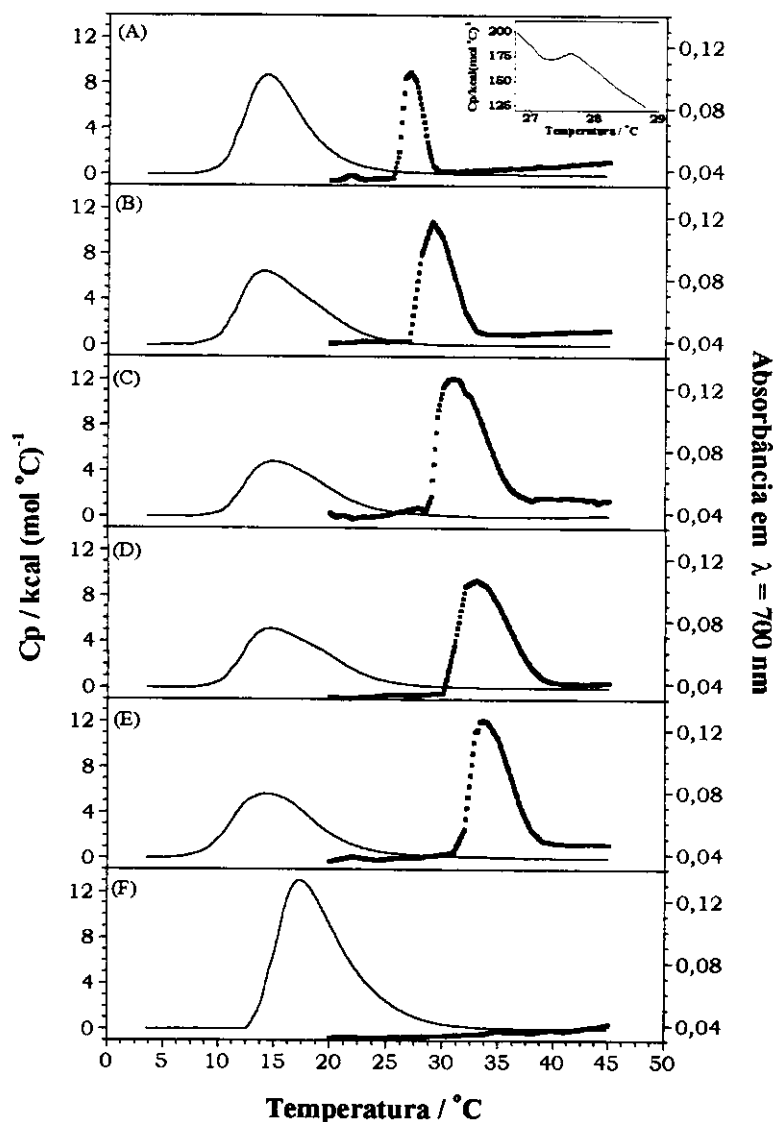


Figura 48. Comparação entre as variações transientes de absorvância em $\lambda = 700 \text{ nm}$, obtidas espectrofotometricamente e termogramas obtidos por HSDSC, durante o processo de gelificação de soluções de F-127. Foram utilizadas soluções aquosas de F-127 em concentração de 20,5% m/m, sem co-solutos (A) e contendo 15,1 mmol g⁻¹ de hidrogel de GSH (B), 13,8 mmol de hidrogel de GSNO (C), 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de NAC (D), 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel de SNAC (E) e 10,0 % m/m sem co-solutos (F). No detalhe a transição da região de duas fases para a fase cúbica.

Observando-se mais atentamente o pico endotérmico intenso, obtido por HSDSC da solução de F-127 20,5% m/m puro, nota-se um pequeno pico endotérmico, mostrado em ampliação no detalhe da figura 48 (A). Este pequeno

pico foi atribuído ao processo de gelificação. Devido à dificuldade em se definir a linha base, necessária para o cálculo da área do pico, a variação de entalpia foi apenas estimada em $\Delta H \sim 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Embora este valor esteja abaixo do valor encontrado na literatura de $1,2 - 1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Wanka *et al.* 1990; Wanka *et al.*, 1994) (provavelmente devido ao erro na determinação da linha base) sua magnitude é compatível com a variação molar de entalpia esperada para o processo de gelificação em questão.

Tabela 3. Valores de temperatura crítica de micelização (cmt), variação de entalpia de micelização ($\Delta_{\text{mic}}H$)^(a) e valores de temperatura de gelificação (T_{gel})^(b) para soluções de F-127 10 e 20,5 % m/m, sem co-solutos e contendo 15,1 mmol de GSH; 13,8 mmol de GSNO; 28,4 mmol de NAC e 28,4 mmol de SNAC, por grama de hidrogel.

Composição da solução (m/m)	cmt ^(a) /°C	$\Delta_{\text{mic}}H$ (kJ mol ⁻¹) ^(a)	T_{gel} ^(b) /°C
F-127 10,0 %	13	408	-
F-127 20,5 %	10	262	26
F-127 20,5% / GSH	10	225	27
F-127 20,5% / GSNO	10	180	29
F-127 20,5% / NAC	10	194	30
F-127 20,5% / SNAC	9	182	32

^(a) Valores obtidos a partir de medidas de HSDSC.

^(b) Valores calculados a partir da variação de absorção transiente associado como o processo de gelificação.

^(c) cmt e T_{gel} obtidos no início do processo (“onset”) das curvas da figura 48.

^(d) O erro estimado para as medidas de entalpia foi < 1%.

^(e) ΔH estimado para o pico de gelificação em detalhe na figura 48 (A) = 0,5 kJ/mol.

A partir da figura 48 foram calculados os valores de T_{gel} para a gelificação das soluções de F-127 puro e contendo RSH e RSNO. Os valores obtidos mostraram que a presença de “co-solutos” (RSNO e RSH) causa um aumento na T_{gel} . O efeito de co-solutos no processo de micelização e gelificação de copolímeros já foi descrito na literatura e sabe-se que a presença de sais e outros co-solutos como glicerina, etanol, drogas hidrofóbicas, surfatantes

aniônicos e não iônicos, afeta o comportamento do diagrama de fases dos copolímeros.

Íons que aumentam a “estruturação da água” e induzem a auto-associação (ou a segregação) do copolímero, são considerados sais “salting out”, como por exemplo o NaCl. Por outro lado, íons que reduzem a “estruturação da água”, reduzem a auto-associação do copolímero são considerados sais “salting in”, como por exemplo o NaSCN (Mansur *et al.*, 1997). Esta denominação de “salting in” para íons chamados também de “quebradores de estrutura” e “salting out” para íons chamados também de “formadores de estrutura”, foi baseada na teoria que considera que a presença de íons pode afetar a estrutura da água tornando-a mais ou menos polar, alterando sua capacidade de solubilização. Esta teoria não foi comprovada, porém as denominações “salting in ou out” são muito utilizadas, referindo-se ao efeito que estes sais causam no processo de micelização, gelificação e separação de fases dos copolímeros em bloco em água.

Outros pesquisadores consideram que o efeito de co-solutos no comportamento dos copolímeros em bloco, se deve à sua localização na solução (Malmsten e Lindman, 1992; Ivanova *et al.*, 2001). Por exemplo, ânions polarizáveis como o SCN^- ou co-solutos polares tem uma leve tendência a se acumular na interface da micela, aumentando a solubilidade do copolímero, causando um aumento na temperatura de gelificação. Por outro lado, íons como Na^+ e SO_4^- ficam afastados da interface da micela, uma vez que esta interface apresenta constante dielétrica baixa e não é capaz de neutralizar as cargas destes íons a ponto de evitar a repulsão entre eles. Este afastamento pode ser traduzido como um aumento na tensão interfacial entre o copolímero e a água, reduzindo sua solubilidade, e induzindo uma redução da temperatura de gelificação (Malmsten e Lindman, 1992). Então, como os RSHs e RSNOs são moléculas grandes, polares e solúveis em água, em analogia ao ânion SCN^- , pode-se esperar que estes compostos tenham também uma tendência a se acumular na região da interface da micela, que é mais polar, rica em unidades OE (coroa), aumentando sua solubilidade e causando um aumento na T_{gel} .

4.4.3. Efeito da matriz de copolímero em bloco (F-127) na decomposição térmica e fotoquímica dos RSNOs.

Uma vez caracterizado o hidrogel de F-127 e tendo-se uma visão microscópica de sua estrutura, foram feitos acompanhamentos cinéticos para se observar como esta matriz afeta a liberação de NO a partir da SNAC e da GSNO. A figura 49 mostra as curvas cinéticas obtidas na decomposição térmica e fotoquímica e as velocidades iniciais obtidas a partir destas curvas, para a SNAC e a GSNO em solução aquosa e em hidrogel de F-127.

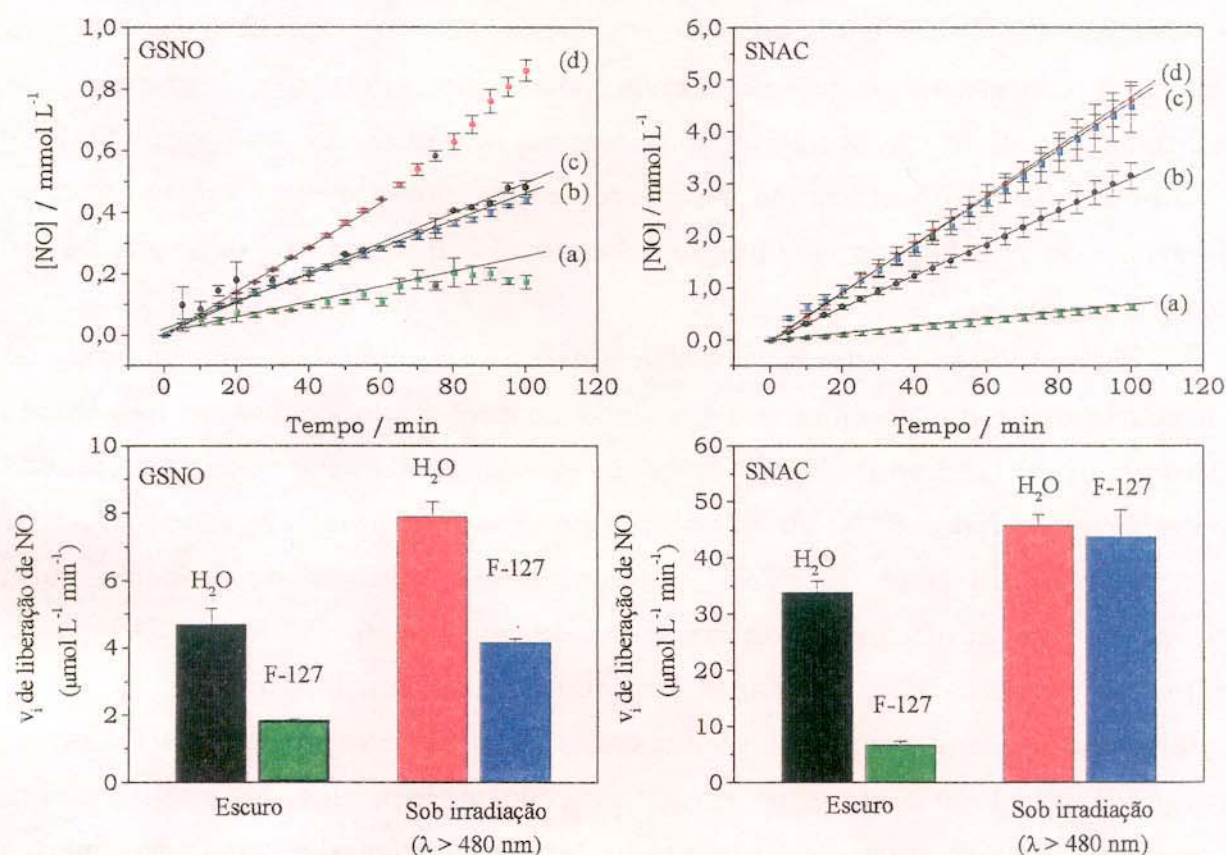


Figura 49. Curvas cinéticas obtidas na decomposição térmica e fotoquímica de GSNO e SNAC. (a) hidrogéis de F-127 no escuro, (b) em soluções aquosas no escuro, (c) hidrogéis de F-127 sob irradiação com $\lambda > 480$ nm e (d) soluções aquosas sob irradiação com $\lambda > 480$ nm. As velocidades iniciais correspondentes foram calculadas a partir das curvas cinéticas obtidas para SNAC e GSNO. As concentrações de GSNO e de SNAC são de 13,8 e 28,4 mmol g⁻¹ de hidrogel, respectivamente. A concentração de F-127 é de 20,5% m/m e a temperatura é de 37 °C.

O cálculo das velocidades iniciais mostrou que para a GSNO em hidrogel de F-127 houve uma redução de 2 vezes na decomposição térmica e 1,5 vezes na decomposição fotoquímica, em relação à solução aquosa. No caso da SNAC, o hidrogel de F-127 levou a uma redução de 5 vezes na decomposição térmica e na fotodecomposição não houve redução na liberação de $\text{NO}^\bullet$, em relação à solução aquosa. Esta redução na velocidade de liberação de $\text{NO}^\bullet$ a partir dos RSNOs foi atribuída novamente ao efeito gaiola imposto pelo solvente, neste caso, causado pelo microambiente das micelas. A decomposição dos RSNOs deve ser reduzida por qualquer processo que leve a um aumento da recombinação geminada do par de radicais formados, antes que os radicais escapem da gaiola do solvente.

Considerando-se que o hidrogel é composto de micelas ordenadas na estrutura cúbica, é esperado que na região próxima às micelas o micro ambiente e a microviscosidade sejam mais parecidos com os da matriz de PEG, uma vez que a coroa da micela é basicamente formada por unidades OE. Espera-se também, que na região mais afastada das micelas, o micro ambiente e a microviscosidade sejam mais parecidos com os da solução aquosa. Este micro-ambiente na região externa das micelas se caracteriza pelo que pode ser representado como canais de água (Fig. 50) (Gilbert *et al.*, 1986). No caso da SNAC sob irradiação, não foi observada a redução da liberação de $\text{NO}^\bullet$ no hidrogel. Talvez neste caso em particular, o par de radicais formados podem estar se formando com um excesso de energia, que é transformada em energia cinética e assim, pode escapar da gaiola do solvente sem que ocorra uma taxa de recombinação grande. Durante a fotólise a energia necessária para que ocorra a clivagem homolítica é absorvida e o excesso de energia é transformado em energia cinética. Este excesso de energia cinética seria responsável por um maior afastamento do par de radicais formados dificultando assim, sua recombinação. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que na decomposição térmica da SNAC no hidrogel foi observada uma redução na liberação de $\text{NO}^\bullet$. No caso da liberação térmica não há esse excesso de energia.

Assumindo-se que os RSNOs possuem tendência em se acumular na coroa das micelas, que são ricas em unidades OE, pode-se considerar em analogia ao item 4.3, que este microambiente deve favorecer a recombinação geminada devido à redução da difusão do par de radicais formados na coroa da micela para os canais de água. Esta representação em regiões distintas, com microambientes semelhantes aos da água e aos da matriz de PEG foi confirmada através de um experimento onde foi comparada a decomposição térmica da GSNO, em uma solução contendo 20,5% m/m de F-127 não gelificada e na forma de hidrogel, na mesma temperatura.

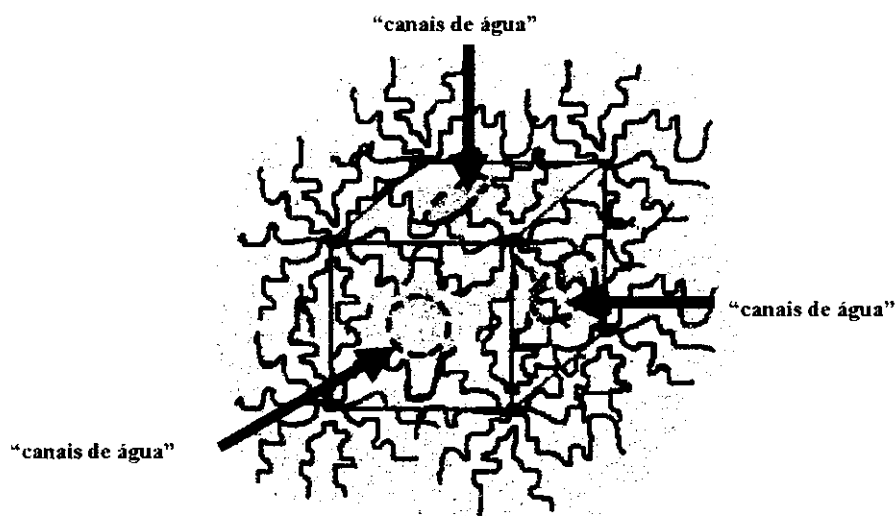


Figura 50. Representação esquemática da estrutura cúbica de micelas, mostrando regiões mais ricas em unidades OE (coroa da micela, segmentos vermelhos e as unidades OP representadas em azul) e regiões mais distantes da micela, onde a microviscosidade deve ser semelhante ao da água ("canais de água"). Os pontos em rosa representam as moléculas de RSNOs.

Utilizando-se o efeito de deslocamento da temperatura de gelificação devido à presença de sais, foi feito um experimento a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde a solução de F-127 em concentração de 20,5% m/m é líquida. A decomposição térmica da GSNO nesta solução foi comparada com uma solução de F-127 na mesma concentração, contendo além da GSNO, $0,6\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl (co-soluto tipicamente "salting out"). A presença deste sal induz a gelificação, a $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Assim, foi possível observar o efeito do processo de gelificação na decomposição

da GSNO. A figura 51 mostra a comparação entre as curvas cinéticas e as correspondentes velocidade iniciais de decomposição da GSNO em uma solução líquida (não gelificada) de F-127, uma solução gelificada de F-127 uma solução aquosa. As concentrações de GSNO e de F-127 e a temperatura são as mesmas nos três casos, sendo que a única diferença entre as soluções de F-127 é a presença ou não de NaCl.

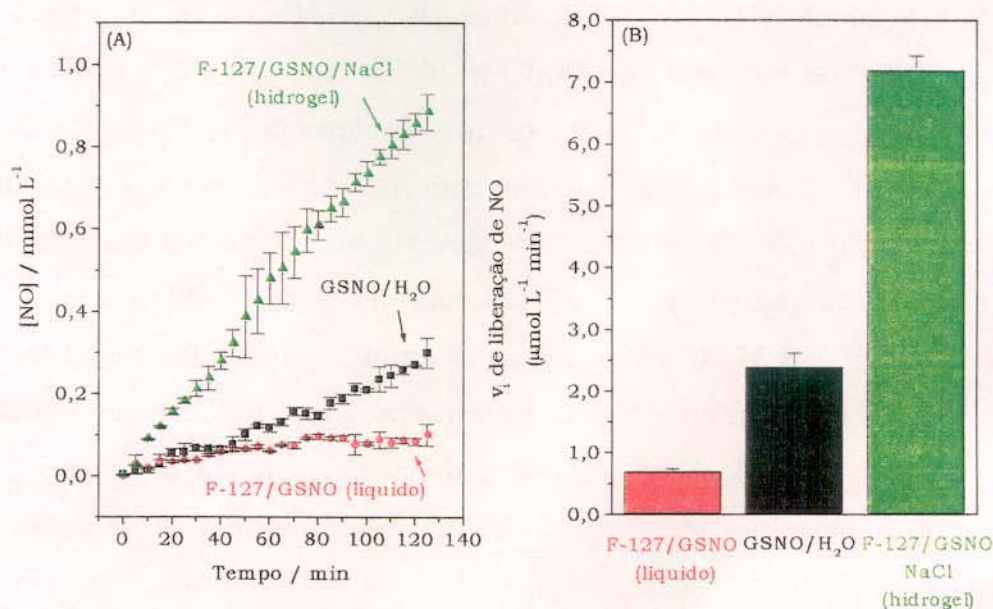


Figura 51. (A) Curvas cinéticas de liberação de NO* obtidas durante a decomposição térmica da GSNO em uma solução líquida (não gelificada) de F-127, uma solução gelificada de F-127 e uma solução aquosa. (B) Velocidades iniciais calculadas a partir das curvas cinéticas. A concentração de GSNO inicial é de 13,8 mmol g⁻¹ de hidrogel e a de F-127 é de 20,5% m/m. T = 20 °C.

A comparação das velocidades iniciais mostra que a matriz de F-127 líquida reduz a liberação térmica de NO* em cerca de 10 vezes em relação ao hidrogel. Este comportamento indica que com a estruturação das micelas está ocorrendo a formação dos canais de água. Com isso, as moléculas de RSNO que estão no microambiente mais semelhante às soluções aquosas estão sujeitas a um menor efeito gaiola do que as moléculas próximas às micelas, que apresentam microambientes mais parecidos com a matriz de PEG. Assim, espera-se que no hidrogel ocorra a soma da liberação de NO* mais lenta para as

moléculas de GSNO localizadas na coroa da micela e uma liberação mais rápida nos “canais de água”. Este comportamento resulta em uma redução na liberação de NO[•] na fase de hidrogel, se comparado com a água, como mostrado na figura 50, onde foi observado que o hidrogel reduz a liberação térmica de NO[•] da GSNO 2 vezes em comparação com a solução aquosa.

Um outro aspecto que pode ser observado nestas medidas, é a diferença entre a liberação de NO[•] a partir do hidrogel sem NaCl a 37 °C ($v_i = 2,3 \pm 0,1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$) e do hidrogel com NaCl a 20 °C ($v_i = 7,2 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$). Nota-se que a presença de NaCl causa uma aceleração na liberação de NO[•] de aproximadamente 3 vezes. Este comportamento é o inverso do esperado, uma vez que com a redução da temperatura deveria ocorrer a redução da liberação de NO[•]. No caso da solução aquosa foi observado que a T=20 °C a $v_i = 2,4 \pm 0,2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ e à T = 37 °C a $v_i = 4,7 \pm 0,5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$. Ou seja, ocorre uma redução de aproximadamente 2 vezes na liberação de NO[•] devido à redução da temperatura. No caso do hidrogel, além da aceleração da liberação de NO[•] o valor de v_i no hidrogel na presença de NaCl é de cerca de 3 vezes maior que em solução aquosa. Este comportamento pode estar relacionado com a rigidez da matriz. Quanto mais rígido o hidrogel, menos solvatadas estarão as unidades OE na coroa da micela, resultando em uma maior interação entre as unidades OE de diferentes micelas. O aumento na rigidez do gel pode levar a uma maior segregação, causando um aumento dos microambientes semelhantes à água, isto é, um aumento no volume dos “canais de água”. Se este aumento da segregação ocorre, a solução contida nos canais de água torna-se mais concentrada em GSNO do que as soluções aquosas ou de hidrogel sem NaCl. O aumento na concentração de GSNO pode levar a um aumento na sua decomposição devido a um favorecimento da reação de auto-catálise que ocorre em soluções concentradas (como já visto no item.4.2.2.).

Além do aumento do produto da recombinação geminada, em matrizes com maior viscosidade, ocorre um aumento do produto da recombinação não geminada, ambos produzindo RSNO. Esta recombinação não geminada

depende do encontro dos pares de radicais após escaparem da gaiola inicial do solvente. Assim, a recombinação não geminada irá depender da difusão das espécies na solução.

As reações de desativação do radical tiila ($RS^\bullet$) dependem do seu encontro ou com outro radical tiila, ou com um RSNO intacto ou com $NO^\bullet$ (eqs. 45-46).



No encontro do $RS^\bullet$ com outro $RS^\bullet$ ou RSNO (eqs. 45 e 47), ocorre a formação do dímero estável RS-SR, com a liberação de um $NO^\bullet$ adicional no caso da reação com o RSNO (eq. 46). No terceiro caso, (o encontro com o $NO^\bullet$) ocorrerá a formação de um RSNO, produto da recombinação não geminada. Devido à diferença de tamanho dos radicais, pode-se esperar que o $RS^\bullet$ se difunda mais lentamente que o $NO^\bullet$. Assim, em matrizes mais viscosas o encontro de um $RS^\bullet$ com outro $RS^\bullet$ ou com RSNO será menos provável, o que causa um aumento da meia vida deste radical na solução, aumentando-se então, a probabilidade de recombinação não geminada através do encontro do $RS^\bullet$ com o $NO^\bullet$. O $NO^\bullet$ por outro lado, pode ser desativado através da reação com O_2 , produzindo $NO_2^\bullet$ ou pode escapar da solução na forma de gás. Porém, devido à sua característica relativamente lipofílica (Clarke e Gaul, 1993) o $NO^\bullet$ terá uma pequena tendência a se acumular no interior hidrofóbico da micela. Este efeito pode levar a um aumento no tempo de residência do $NO^\bullet$ na solução, aumentando sua probabilidade de recombinação não geminada com $RS^\bullet$. Este aumento na meia vida e/ou tempo de residência do $NO^\bullet$ e do radical tiila também podem ser um dos fatores que causam a redução da decomposição de RSNOs em matrizes de F-127 líquidas.

5- Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- É possível S-nitrosar tióis através do borbulhamento direto de uma mistura gasosa de NO^*/O_2 em soluções contendo os tióis, de forma controlada e estequiométrica. Esta reação de S-nitrosação pode ser feita diretamente nas matrizes como o PEG, permitindo que RSNOs instáveis como a SNAC e a CiSNO sejam incorporadas nestas matrizes. Além disso, concluiu-se que tanto o excesso do agente nitrosante, como o excesso de tióis afetam de forma significativa a liberação de NO^* dos RSNOs.
- A liberação de NO^* a partir dos RSNOs depende de sua concentração inicial, devido à ocorrência de uma reação autocatalítica envolvendo os radicais tiila (RS^*).
- Os RSNOs podem ser incorporados em hidrogéis de copolímero em bloco (F-127), sendo que o processo de gelificação dos hidrogéis pode ser acompanhado espectrofotometricamente.
- As matrizes de PEG e hidrogéis causam uma estabilização dos RSNOs, indicando um potencial de uso destes sistemas na área farmacêutica.
- A análise da dependência do rendimento quântico (Φ) e das velocidades iniciais (v_{is}) com a fluidez ($1/\eta$) do solvente indica que a liberação fotoquímica do NO^* dos doadores pode ser explicada pelo modelo de recombinação radicalar proposta por Noyes.

6 - Referências

- Alexandridis, P.; Horkwarth, J.F.; Hatton, T.A.. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: Thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* (1994) 27, 2414-2425.
- Alexandridis, P. e Hatton, T.A.. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: Thermodynamics, structure, dynamics and modeling. *Col. Surf. A – Physicochem. Eng. Aspects*. (1995) 96, 1-46.
- Alexandridis, P. Amphiphilic copolymers and their applications. *Curr. Opinion Colloid Inter. Sci.*(1996) 1, 490-501.
- Arevalo, I.; Ward, B. e Matlashewski, G.. Detection of iNOS gene expression in cutaneous leishmaniasis biopsy tissue. *Mol. Biochem. Parasitology*. (2002) 121, 145-147.
- Arulsamy, N.; Bohle, D.S.; Butt, J.A.; Irvine, G.J.; Jordan, P.A. e Sagan, E.. Interrelationships between conformational dynamics and the redox chemistry of S-nitrosothiols. *J. Am. Chem. Soc.* (1999) 121, 7115-7123.
- Bailey, F.E. e Koleske, J.Y. em “Poly(ethylene oxide)” , Academic Press, New York, 1976, cap. 4, pp. 29-43.
- Bainbrigge, N.; Butler, A.R. e Gorbitz, C.H.. The thermal stability of S-nitrosothiols: Experimental studies and *ab initio* calculations on model compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* (1997) 351-353.
- Baretz, B.; Turro, N.J.. Photochemistry of diastereomeric 2,4-diphenylpentan-3-ones and related ketones in super-cage environments provided by micelles, porous-glass, and porous silica – Temperature and magnetic-field effects. *J. Am. Chem. Soc.* (1983) 105, 1309-1316.
- Barlett, P.D.; Herkes, F.E. e Friedman, J.. *Int. J. Chem. Kinet.* (1969) 1, 193 (citado em Koenig e Fischer, 1973).
- Barret, J.; Debenham, D.F. e Glauser, J.. The electronic spectrum and photolysis of S-nitrosotoluene- α -thiol. *Chem. Commun.* (1965) 12, 248-249.
- Barrichello, J.M.; Morishita, M.; Takayama, K. e Nagai, T.. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int. J. Pharm.* (1999) 184, 189-198.

- Barros, B.F.; Toledo Jr., J.C.; Franco, D.W.; Tfouni, E. e Krieger, M.H.. A new inorganic vasodilator, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃: Hypotensive effect of endothelium-dependent and -independent vasodilators in different hypertensive animals models. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* (2002) 7, 50-56.
- Bartberger, M.D.; Houk, K.N.; Powell, S.C.; Mannion, J.D.; Lo, K.Y.; Stamler, J.S e Toone, E.J.. Theory, spectroscopy and crystallographic analysis of S-nitrosothiols: Conformational distribution dictates spectroscopic behavior. *J. Am. Chem. Soc.* (2000) 122, 5889-5890.
- Bates, J.N.; Baker, M.T.; Guerra Jr. R. e GHarrison, D.G.. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue – Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem. Pharmacol.* (1991) 42, S157 – S165.
- Beckman J.S. em “Nitric oxide – Principles and actions”, Lancaster J.Jr. ed., Academic Press, 1996, San Diego – Califórnia, cap. 1, pp. 1-7.
- Beezer, A.E.; Loh, W.; Mitchell, J.C.; Royall, P.G.; Smith, E.O.; Tute, M.S.; Armstrong, J.K.; Chowdhry, B.Z.; Leharne, S.A.; Eagland, D. e Crowther, N.J.. An investigation of dilute aqueous sollution behavior of poly(oxyethylene)+poly(oxypropylene)+poly(oxyethylene) block copolymers. *Langmuir* (1994) 10, 4001-4005.
- Biswas, R.; Bhattacharyya, S. e Bagchi, B.. vibrational energy relaxation, nonpolar solvation dynamics and instantaneous normal modes: Role of binary interaction in the ultrafast response of a dense liquid. *J. Chem. Phys.* (1998) 108, 4963-4971.
- Blonder, J.M.; Baird, L.; Fulfs, J.C. e Rosenthal, G.J.. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *Pharm. Let.* (1999) 65, PL 261-266.
- Braden, A.D.; Parrack, E.E, e Tyler, D.R.. Solvent cage effects. I. Effect of radical mass and size on radical cage pair recombination efficiency. II Is geminate recombination of polar radicals sensitive to solvent polarity? *Coord. Chem. Rev.* (2001) 211, 279-294.
- Brucato, P.F. e Pizzo, S.V.. catabolism of streptokinase and polyethylene glycol-streptokinase – evidence for transport and intact forms through the biliary system in the mouse. *Blood* (1990) 76, 73-79.
- Brunet, L.R.. Nitric oxide in parasitic infections. *Int. Immunopharmacol.* (2001) 1, 1457-1467.

- Butler, A.R. e Rhodes, P.. Review – Chemistry, analysis, and biological roles for S-nitrosothiols. *Anal. Biochem.* (1997) 249, 1-9.
- Chen, Z.; Zhang, J. e Stamler, J.S.. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002) 99, 8306-8311.
- Choi, H.-G.; Oh, Y.-K. e Kim, C.K.. In situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability. *Int. J. Pharm.* (1998) 165, 23-32.
- Choi, H.-G.; Jung, J.-H.; Ryu, J.M.; Yoon, S.J.; Oh, Y.K. e Kim, C.K.. Development of in situ-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository. *Int. J. Pharm.* (1998) 165, 33-44.
- Clarke, M.J. e Gaul, J.B.. Chemistry relevant to the biological effects of nitric oxide and metallonitrosyls. *Structure Bonding.* (1993) 81, 147-181.
- Clarke, M.J.. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* (2003) 236, 209-233.
- Cook, J.A.; Kim, S.Y.; Teague, D.; Krishna, M.C.; Pacelli, R.; Mitchell, J.B.; Vodovotz, Y.; Nims, R.W.; Christodoulou, D.; Mikes, A.M.; Grisham, M.B. e Wink, D. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal. Biochem.* (1996) 238, 150-158.
- Covert, K.J.; Askew, E.F.; Grunlemeier, J.; Koenig, T e Tyler, D.R.. Cage effects in organometallic radical chemistry. Fractional cage-recombination efficiency for photochemical caged-pair intermediates of $OCp'_2M_2(CO)_6$ (M=Mo and W; $Cp'=\eta^5-C_5H_4CH_3$). *J. Am. Chem. Soc.* (1992) 114, 10446-10448.
- Cox, B.G. em “Modern Liquid Phase Kinetics” Oxford University Press, New York, 1996, cap. 4, pp 42.
- Davidson, R.L.. em “Handbook of Water-Soluble Gums and Resins”, 1st ed., McGraw-Hill, New York, 1980, pp 18-22.
- Davidson, R.N.; Yardley, V.; Croft, S.L.; Konecny, P. e Benjamin, N.. A topical nitric oxide-generating therapy for cutaneous leishmaniasis. *Trans. Royal Soc. Tropical Med. Hygiene.* (2000) 94, 319-322.
- Davis, K.; Martin, E.; Turko, I.V. e Murad, F.. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (2001) 41, 203-236.

- Demeter, A.; Berces, T. e Biczok, L.. Comprehensive model of the photophysics of N-phenylnaphthalimides: The role of solvent and rotational relaxation. *J. Phys. Chem.* (2001) 100, 2001-2011.
- (a) de Oliveira, M.G., Rohwedder, J.J.R., Shishido, S.M. e Seabra A.B.. “Sistema de nitrosação baseado no borbulhamento de uma mistura gasosa de óxido nítrico e ar, para a nitrosação de tióis e outros substratos.” – PI 0100577-4. (com Menção Honrosa no Prêmio Governador do Estado – 2001)
- (b) de Oliveira, M.G., Shishido, S.M., Seabra, A.B.. “Formulações de S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico incorporados em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol e metodologia para incorporação de S-nitrosotióis em matrizes de poli(etileno glicol), poli(etileno glicol)/água e poli(etileno glicol)/etileno glicol.” – PI 0004238-2. (com Menção Honrosa no Prêmio Governador do Estado – 2001)
- de Oliveira, M.G. e Shishido, S.M.. Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: Nitric oxide release versus cyanide toxicity. *Prog. React. Kinetic Mec.* (2001) 26, 239-261.
- de Oliveira, M.G.; Shishido, S.M.; Seabra, B.A. e Morgon, N.H.. Thermal stability of primary S-nitrosothiols: The roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J. Phys. Chem. A.* (2002) 106, 8963-8970.
- Drago, R.S. e Panlik, F.E.. The reaction of nitrogen (II) oxide with diethylenamine. *J. Am. Chem Soc.* (1960) 82, 96.
- Eiserich, J.P.; Patel, R.P. e O'Donnell, V.B.. Pathophysiology of nitric oxide and related species: Free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects Med.* (1998) 19, 221-357.
- Elsaesser, T. e Kaiser, W.. Vibrational and vibronic relaxation of large polyatomic-molecules in liquids. *Annu. Rev. Phy. Chem.* (1991) 42, 83-87.
- Ford, P.C. e Lorkovic, I.M.. Mechanistic aspects of the reactions of nitric oxide with transition-metal complexes. *Chem. Rev.* (2002) 102, 993-1017.
- Francischetti, E.A.; Fagundes, V.G.A. e França, M.F.. Endotélio vascular. Um importante sistema cibernético vaso-modulador cuja disfunção participa do processo hipertensivo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* (1995) 64, 55-68.

- Franck, J. e Rabinowitch, E.. *Trans. Faraday Soc.* (1954) 30, 120-131 (citado em Leffer, 1993).
- Fricker, S.P. Ruthenium, nitric oxide and disease – A novel inorganic chemistry approach to drug desing. *Platinum Metals Rev.* (1995) 39, 150-159.
- Friederich, J.A. e Butterworth IV, J.F.. Sodium nitroprusside: Twenty years and counting. *Anesth Analg.* (1995) 81, 152-162.
- Fujimori, K. e Nakajima, T.. Chemical and biochemical aspects of thionitrite. *Rev. Heteroatom Chem.* (2000) 22, 181-195.
- Furchgott, R.F. e Zawadski, J.V.. The obligatory role of endothelial-cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetilcholine. *Nature* (1980) 288, 373-376.
- Gaston, B.. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim. Biophys. Acta* (1999) 141, 323-333.
- Gershogoren, E.; Banin, U. e Ruhman, S.. Caging and geminate recombination following photolysis of triiodide in solution. *J. Phys. Chem. A.* (1998) 102, 9-16.
- Gilbert, J.C.; Hadgraf, J.; Bye, A. e Brookes, L.G.. Drug release from pluronic F-127 gels. *Int. J. Pharm.* (1986) 32, 223-228.
- Gissen, A.S. N-Acetyl cysteine. VRP Nutritional News (April, May, June – 1994). <http://www.vrp.com/nacety.htm>.
- Gow, A.J., Buerk, D.G. e Ischiropoulos, H.. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J. Biol. Chem.* (1997) 272, 2841-2845.
- Greenwald, R.B.. PEG drugs: an overview. *J. Controlled Release.* (2001) 74, 159-171.
- Guzmán, M.; García, F.F.; Molpeceres, J. e Aberturas, M.R.. Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration. *Int. J. Pharm.* (1992) 80, 119-127.
- Harris, J.M.; Martin, N.E. e Modi, M.. Pegylation – A novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* (2001) 40, 539-551.
- Harris, J.M. em “Poly(ethylene glycol) Chemistry – Biotechnical and Biomedical Applications” Academic Press, Boston, 1992.
- Hart, T.W.. Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione.. *Tetrahedron Lett.* (1985) 26, 2013-2016.

- Hayton, T.e.; Legzdins, P. e Sharp, W.B.. Coordination and organometallic chemistry of metal-NO complexes. *Chem. Rev.* (2002) 102, 935-991.
- Heller, H.G. e Langar, J.R.. Photochromic heterocyclic fulgides. 3. The use of (ϵ - α - (2,5-dimethyl-3-furylethylidene) (isopropylidene) succinic anhydride as a simple convenient chemical actinometer. *J. Chem. Soc. Perkin 2.* (1981) 2, 341-343.
- Henry, R.L. e Schmolka, I.R.. Burn wound coverings and the use of poloxamer preparations. *Crit. Rev. Biocompatibility.* (1989) 5, 207-220.
- Hensley, K.; Tabatabaie, T.; Stewaart, C.A.; Pye, Q. e Floyd, R.A.. Nitric oxide and derived species as toxic agents in chronic neurodegenerative disorders. *Chem. Res. Toxicol.* (1997) 10, 527-532.
- Huang, X. e Brazel, C.S.. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *J. Controlled Release.* (2001) 73, 121-136.
- Hussain, A.S.; Cispino, N.H.; MCLAughlin, B.E.; Brien, J.F.; Marks, G.S e Nakatsu, K.. Glyceryl trinitrate-induced vasodilation is inhibited by ultraviolet irradiation despite enhanced nitric oxide generation: Evidence for formation of a nitric oxide conjugate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1999) 289, 895-900.
- Ignarro, L.J.; Byrns, R.E. e Wood, K.S.. em "Vasodilation: Vascular smooth muscle peptides, autonomic nerves and endothelium" Raven Press, New York, 1988, pp. 427-436.
- Ignarro, L. J.; Lipton, H.; Edwards, J. C.; Baricos, E. H.; Hymarn, A. L.; Kadowitz, P. J. e Gruetter, C.A.. Mechanism of vascular smooth-muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric-oxide - Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1991) 218, 739-749.
- Ignarro, L.J.; Napoli, C. e Loscalzo, J.. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide - An overview. *Cir. Res.* (2002) 90, 21-28.
- ISI: <http://isi0.isiknowlwdge.com/portal.cgi>.
- Ivanova, R.; Alexandridis, P. e Lindman, B.. Interaction of poloxamer block copolymers with cosolvents and surfactants. *Colloids Surf. A.* (2001) 183-185, 41-53.

- Jackson, J.K.; Springate, C.M.K.; Hunter, W.L. e Burt, H.M.. Neutrophil activation by plasma opsonized polymeric microspheres inhibitory effect of Pluronic F-127. *Biomaterials*. (2000) 21, 1483-1491.
- Janero, D.R.. Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: Contemporary approaches to therapeutic NO modulation. *Free Radical Biol. Med.* (2000) 28, 1495-1506.
- Jolly, W.L. em "The inorganic chemistry of nitrogen". New York, W.A. Benjamin Inc., 1964, pp. 73-77.
- Johnston, L.O.J.; de Mayo, P.; Wong, S.K.. Surface photochemistry - Decomposition of azobis(isobutyronitrile) on dry silica-gel. *J. Org. Chem.* (1984) 49, 20-26.
- Juhasz, J.; Lenaerts, V.; Raymond P.; Ong H.. Diffusion of Rat Atrial Natriuretic Factor in Thermoreversible Poloxamer Hidrogels. *Biomaterials* (1989) 10, 265-268.
- Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V.; Melik-Nubarov, N.V.; Fodeseev, N.A.; Doridnich, T.Yu.; Alakhov, V. Yu.; Chekhonin, V.P. e Nazlova, I.R.. *Exp. Ther.* (1981) 218, 739-749.
- Kabanov, A.V.. A new class of drug carriers - Micelles of polyoxyethylene-polyoxypropylene-polyoxyethylene block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *J. Controlled Release*. (1992) 22, 141-157.
- Kaczmarek, H.; Lindén, L.A. e Rabek, J.F.. Reactions of hydroxyl (HO[•]) and hydroperoxyl (HO₂[•]) radical generated chemically and photochemically wiht poly(ethylene oxide). *J. Pol. Sci. A*. (1995) 33, 879-890.
- Karlström, G. A new model for upper and lower critical solution temperatures in poly(ethylene oxide) solutions. *J. Phys. Chem.* (1985) 89, 4962-4263.
- Katayama, Y.. Nitric Oxide: Mysterious Messenger. Dojindo Newsletter nº 1 (1995), <http://www.dojindo.co.jp/letter/199501/review.htm>, 1-24.
- Kice, J.L. em "Free Radicals" Kochi, J.K. ed. John Wiley and Sons, New York, 1973, cap. 24, pp 273.
- Kim, H. e Fassihi, R.. Application of a binary polymer system in drug release rate modulation. Characterization of release mechanism. *J. Pharm. Sci.* (1997) 86, 316-328.

- Kjelander, R.; Florin, E.. Water-structure and changes in thermal-stability of the system poly(ethylen oxide)-water. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* (1981) 77, 2053-2057.
- Kodama, S.. Studies of the cage effect of solvent. 1. Photolysis of azomethane in normal-hexane. *Bull. Chem. Soc. Japan.* (1962) 35, 652-657.
- Kodama, S.. Studies of the cage effect of solvent. 2. Photolysis of azomethane in various solvents. *Bull. Chem. Soc. Japan.* (1962) 35, 658-662.
- Koenig, T. e Deinzer, M.. *J. Am. Chem. Soc.* (1968) 90, 7014 (citado em Koenig e Fischer, 1973).
- Koenig, T.; Fischer, H. em "Free Radicals", Kochi, J.K. (ed.) John Wiley and Sons, 1973, New York, cap. 4, pp. 157-189.
- Koppenol, W.H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* (1998) 25, 385-391.
- Kukula, P. e Cervený, L.. Hydrogenation of (2E,4E)-hexadienol. *J. Mol. Catalysis A: Chemical* (1999) 148, 245-251.
- Lancaster, J.Jr., em "Nitric Oxide – Principles and actions" London, Academic Press, 1996, pp. XV, 3-7.
- Langford, C.H. e Shaw, L.E.. Solvent effects as probes of the dynamical factors controlling sub-nanosecond photoprocesses: The case of W(CO)(5)pyridine. *Coord. Chem. Rev.* (1997) 159, 221-233.
- Leffer, J.E.; Zupancic, J.J.. Decomposition of zaocumene on silica surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* (1980) 102, 259-267.
- Leffer, J.E. em "An Introduction to Free Radicals" John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993, cap. 4, pp. 56-76.
- Levine, I.N. em "Physical Chemistry" 2ª ed. McGraw-Hill Book Company, New York, 1983, pp 457-458.
- Lima, J.F.; Montonaga, S.N. e Murakami Iha, N.Y.. Geminate recombination in the ligand field photochemistry of pentacyanoferrate (II) complexes with 1,2-diaminoethane and 1,3-diaminopropane. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* (1994) 84, 177-182.
- Lima, J.F. e Murakami Iha, N.Y.. Wavelength dependence and solvent effect on the ligand field photochemistry: The ring closure process in the excited [Fe(CN)₅(tn)]³⁻ complex. *Can. J. Chem.* (1996) 74, 476-480.

- Lima, J.F.; Nakano, A.K. e Murakami Iha, N.Y.. solvent cage effects on the ligand field photochemistry of the cyanoferrate (II) complexes. *Inorg. Chem.* (1999) 38, 403-403.
- López-Jaramillo, P.; Ruano, C.; Rivera, J.; Terán, E.; Salazar-Irigoyen, R.; Esplugues, J.V; Moncada, S.. Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxide donor. *Lancet.* (1998) 351, 1176-1177.
- Lu, J.M; J.M.; Wittbrodt, J.M.; Wang, K.; Wen, Z.; Schlegel, H.b.; Wang, P.G. e Cheng, J.P. NO affinities of S-nitrosothiols: A direct experimental and computational investigation of RS-NO bond dissociation energies. *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123, 2903-2904.
- Male, J.L.; Lindfors, B.E.; Covert, K.J. e Tuler, D.R. The effect of radical size and mass on the cage recombination efficiency of photochemically generated radical cage pairs. *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120, 13176-13186.
- Malinski, T.; Taha, Z. e Grunfeld, S.. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1993) 193, 1076-1082.
- Malmsten, M. e Lindman, B.. Self-Assembly in Aqueous Block Copolymer Solutions. *Macromolecules* (1992) 25, 5440-5445.
- Manual do densímetro - Anton Paar, modelo DMA 58, pp. 87-88.
- Mansur, C.R.E.; Oliveira, C.M.F.; González, G. e Lucas, E.F.. Phase behavior of aqueous systems containing block copolymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide). *J. Applied Polym. Sci.* (1997) 66, 1767-1772.
- Marín, J. e Martínez, R.A.. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol. Ther.* (1997) 25, 111-134.
- Mateo, A.O. e Artiñano, A.A.. Nitric oxide reactivity and mechanism involved in its biological effects. *Pharmacol. Res.* (2000) 42, 421-427.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J. e Higgs, E. A.. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* (1989) 38, 1709-1715.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J. e Higgs, E.A.. Nitric-oxide – Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* (1991) 43, 109-142.
- Molyneux, J.R. em “Water-soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior”, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1983, cap. 2, pp19-45.

- Mossalayi, M.D.; Arock, M.; Mazier, D.; Vincendeau, P.; Vouldoukis, I.. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitology Today*. (1999) 15, 342-345.
- Murhammer, D.W. e Goochee, C.F.. Structural features of nonionic polyglycol polymer-molecules responsible for the protective effect in sparged animal cell bioreactions. *Biotechnol. Prog.* (1990) 6, 142-148.
- Mutus, B.; Redmond, R.W e Akhter, S.. Evidence for peroxynitrite formation during S-nitroglutathione photolysis in air saturated solutions. *FEBS Let.* (1999) 449, 79-82.
- Network Science. [http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature 14.html](http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature%2014.html)
- Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C.L.; Penman, B.W.; Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R.. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (1992) 89, 3030-3034.
- Nikki, K.; Nakagawa, N.. Solvent shift induced by hexafluorobenzene in NMR-spectra. *Chem. Lett.* (1974) 7, 699-700.
- Noyes, R.M.. Kinetics of competitive processes when reactive fragments are produced in pairs. *J. Am. Chem. Soc.*(1955) 77, 2042-2045.
- Oae, S. e Shinahama, K.. Organic thionitrites and related substances - A Review. *Org. Prep. Proced. Int* (1983) 15, 165-198.
- Okano, T.. em "Biorelated Polymers and Gels - Controlled Release and Application in biomedical engineering", Accademic Press, Boston, cap. 6 e 7, pp. 193-248.
- Paavola, A.; Kilpeläinen, I.; Yliruusi, J. e Rosenberg, P.. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *Int. J. Pharm.* (2000) 199, 85-93.
- Palmer, R.M.J.; Ferrig, A.G. e Moncada, S.. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* (1987) 327, 524-526.
- Pandit, N.; Trygstad, T.; Croy, S.; Bohorquez, M.; Koch, C.. Effect of Salts on the Micellization, Clouding, and Solubilization Behavior of Pluronic F-127 Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*. (2000) 222, 213-220.
- Pou, S.; Anderson, D.E.; Surichmorn, W.; Keaton, L.L. e Tod, M.L.. Biological studies of a nitroso compound that release nitric oxide upon illumination. *Mol. Pharmacol.* (1994) 46, 709-715.

- Pryor, W.A. e Smith, K. The viscosity dependence of bond homolysis. A qualitative and semiquantitative test for cage return. *J. Am. Chem. Soc.* (1970) 92, 5403-5412.
- Qiu, B.; Stefanos, S.; Ma, J.; Laloo, A.; Perry, B.A.; Leibowitz, M.J.; Sinko, P.; Stein, S.. A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery. *Biomaterial.* (2003) 24, 11-18.
- Rabinowitch, E.; Wood, W. C.. *Trans. Faraday Soc.* (1936) 32, 1381 (citado em Leffer, 1993).
- Rabinowitch, E.; Wood, W. C.. *Trans, Faraday Soc.* (1937) 33, 1225 (citado em Leffer, 1993).
- Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J. e Moncada, S.. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.* (1987) 92, 181-187.
- Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S.. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* (1987) 2, 1057-1058.
- Rheinbolt, H. e Mott, F.. *J. Prakt. Chem.* (1932) 133, 328-332. (citado em Butler e Rhodes 1997).
- Ricardo, K.F.S.; Shishido, S.M.; de Oliveira, M.G. e Krieger, M.H.. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetyl-L-cysteine (SNAC) in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide* (2002) 7, 57-66.
- Rojas-Walker, T.; Tamir, S.; Ji, H.; Wishnok, J.S e Tannenbaum, S.R.. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Che. Res. Toxicol* (1996) 8, 473-477.
- Roy, B.; d'Hardemare, A.M. e Fontecave, M.. New thionitrites: Synthesis, stability, and nitric oxide generation. *J. Org. Chem.* (1994) 59, 7019-7026.
- Rubbo, H.; Parthasarathy, S.; Barnes, S.; Kirk, M; Kalyanaraman, B. e Freeman, B. Nitric Oxide Inhibition of Lipoxygenase-Dependent Liposome and Low-Density Lipoprotein Oxidation: Termination of Radical Chain Propagation Reactions and Formation of Nitrogen-Containing Oxidized Lipid Derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* (1995) 324, 15-25.

- Rubbo, H.; Darley-Usmar, V.; Freeman, B.A. Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury. *Chem. Res. Toxicol.* (1996) 9, 809-820.
- Sánchez-Soto, P.J.; Ginés J.M.; Rabasco, A.M.; Justo, A. e Rodrigues, J.L.P.. Thermal study of dazepam – poly(ethylene glycol) 6000 solid dispersions. *Thermochim. Acta.* (1990) 158, 225-234.
- Schmolka, I.R.. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for the treatment of burns. *J. Biomed. Res.* (1972) 6, 571-582.
- Schmolka, I.R.. Gel cosmetics. *Cosmet. Toiletries* (1984) S99S, 69-71.
- Schor, H.H.R. e Teixeira, E.L.. The fundamental rotational-vibrational band of CO and NO. *J. Chem. Education* (1994) 71, 771-774.
- Schwartz, B.J., King, J.C., Zhang, J.Z., Harris, C.B.. Direct femtosecond measurements of single collision dominated geminate recombination times of small molecules in liquids. *Chem. Phys. Letters.* (1993) 203, 503.
- Sexton, D.J.; Muruganandam, A.; McKenney, D.J. e Mutus, B.. Visible light photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione: Potential photochemotherapeutic applications. *Photochem. Photobiol.* (1994) 59, 463-467.
- Shaffer, J.E.; Han, B.J.; Cluerm, W.H. e Lee, F.W.. Lack of tolerance to a 24-hour infusion of S-nitrosot-N-acetylpenicillamine (SNAP) in conscious rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1992) 260, 286-293.
- Shishido, S.M. e de Oliveira, M.G.. Polyethylene glycol matrix reduces the rate of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine. *Photochem. Photobiol.* (2000) 71, 273-280.
- Shishido, S.M.; Seabra, A.B.; Loh, W. e de Oliveira, M.G.. Thermal and photochemical nitric oxide release from S-nitrosothiols incorporated in pluronic F-127 gel: Potential uses for local and controlled nitric oxide release. artigo submetido ao periódico *Biomaterials* em 2003.
- Snyder, S.H.. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science* (1992) 257, 494-496.
- (a) Stamler, J.S.; Simon, D.I.; Osborne, J.A.; Mullins, M.E.; Jaraki, O.; Michel, T.; Singel, D.J. e Loscalzo, J.. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992) 89, 444-448.
- (b) Stamler, J.S.; Singel, D.J. e Loscalzo, J.. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* (1992) 258, 1898-1902.

- Stewart, V.C. e Heales, S.J.R.. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: Implications for neurodegeneration. *Free Radical Biol. Med.* (2003) 34, 287-303.
- Suh, W.; Han, S.O.; Yu, L.; Kim, S.W.. An angiogenic, endothelial -cell-targeted polymeric gene carrier. *Mol. Therapy*. (2002) 6, 664-672.
- Szacilowski, K. e Stasicka, Z., S-nitrosothiols: Materials, reactivity and mechanisms. *Prog. Reac. Kinet. Mech.* (2000) 26, 1-58.
- Szwarc, M. e Asami, R.. Kinetics of dissociation of organic dimeric-di-anions into monomeric radical-ions. *J. Am. Chem. Soc.* (1962) 64, 2269-2273.
- Tamir, S.; Burney, S. e Tannenbaum, S.T.. DNA damage by nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* (1996) 9, 821-827.
- Tfouni, E.; Krieger, M.; McGarvey, B.R. e Franco, D.W.. Structure, chemical and photochemical reactivity and biological activity of some ruthenium amine nitrosyl complexes. *Coord. Chem. Rev.* (2003) 236, 57-69.
- Torsnoni, A.S.; Barros, B.F.; Toledo Jr., J.C.; Haun, M.; Krieger, M.H.; Tfouni, E. e Franco, D.W.. Hypotensive properties and acute toxicity of *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃, a new nitric oxide donor. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* (2002) 6, 247-254.
- Traylor, T.G.; Magde, D.; Marsters, J.; Jongeward, K.; Wu, G.Z. e Walda, K. Geminate processes in the reaction of nitric oxide with 1-methylimidazole-iron (II) porphyrin complexes. Steric, solvent polarity, and viscosity effects. *J. Am. Chem. Soc.* (1993) 115, 4808-4813.
- Tsikas, D.; Sandmann, J.; Ikic, M.; Fauler, J.; Stichtenoth, D.O. e Frölich, J.C.. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography and the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. *J. Chromatography B.* (1998) 708, 55-60.
- Turro, N.J.; Lei, X.; Cheng, C. C.; Corbin, D.R.; Abrams, L.. Photolysis of dibenzyl ketones in the presence of pentasil zeolites - Examples of size shape selectivity and molecular diffusional traffic control. *J. Am. Chem. Soc.* (1985) 107, 5824-5826.
- Veronese, F.M.. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials.* (2001) 22, 405-417.

- Wang, P.G.; Xian, M.; tang, X.; Wu, X.; Wen, Z.; Cai, T. e Janczuk, A.. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. *Chem. Rev.* (2002) 102, 1091-1134.
- Wang, P.L. e Johnson, T.P.. Sustained-release interleukin-2 following intramuscular inhection in rats. *Int. J. Pharm.* (1995) 113, 73-81.
- Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W.. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules* (1994) 27, 4145-4159.
- Wanka, G.; Hoffmann, H.; Ulbricht, W.. The aggregation behavior of poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) - poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Colloids Surf. Sci.* (1990) 268, 101-117.
- West Shore Endoscopy Center. http://www.endowsec.com/pated/polyethylene_glycol.htm.
- Wilkinson, G.; Gillard, R.D. e McCleverty, J.A.. em "Comprehensive coordination chemistry - The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds". Great Britain, Pergamon Press, 1987, pp. 102.
- Williams, D.L.H.. Literature highlights - 38* Nitric oxide release from S-nitrosothiols (RSNO)- the role of cooper ions. *Transition Met. Chem.* (1996) 21, 189-191.
- Williams, R.J.P.. Nitric oxide in biology: Its role as a ligand. *Chem. Soc. Rev.* (1996) 21, 189-191.
- Wink, D.A.; Nims, R.W.; Darbyshire, J.F.; Chirstodoulou, D.; Hanbauer, I.; Cox, G.W.; Laval, F.; Laval, J.; Cook, J.A.; Krishna, M.C.; DeGraff, W.G. e Mitchell, J.B.. Reactions kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol.* (1994) 7, 519-525.
- Winnik, F.M.; Breton, M.P. e Riske, W.. US Patent (1992) 5,139,574 e Winnik, F.M.; Davidson, A.R.; Lin, J.W.P e Croucher, M.D.. US Patent (1992) 5,145,518.
- Wood, P.D.; Mutus, B. e Redmond, R.W.. The mechanism of photochemical release of nitric oxide from S-nitrosoglutathione. *Photochem. Photobiol.* (1996) 64, 518-524.

- Yokoyama, M.. Block copolymers as drug carriers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* (1992) 9, 213-248.
- Yorder, L.M.; Cole, A.G.; Walker II, L.A. e Sension, R.J.. Time-resolved spectroscopic studies of B₁₂ coenzymes: Influence of solvent on the photolysis of adenosylcobalamin. *J. Phys. Chem.* (2001) 105, 12180-12188.
- Zeina, B.; Banfield, C. e Al-Assad, S.. Topical glyceryl trinitrate: a possible treatment for cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* (1997) 22, 244-245.
- Zhelyaskov, V.R.; Gee, K.R. e Godwin, D.W.. Control of NO concentration in solution of nitrosothiol compounds by light. *Photochem. Photobiol.* (1998) 67, 282-288.