

# 1. Introdução

## 1.1 Introdução

Há cerca de 20 anos, o óxido nítrico (NO) era considerado somente um gás nocivo, extremamente tóxico e reativo, que existia livre na natureza por não mais do que alguns segundos. A descoberta de que o óxido nítrico é biossintetizado por uma classe de enzimas, as óxido nítrico sintetases (NOS) foi uma das mais promissoras no campo biomédico. A produção endógena de NO está relacionada a numerosos processos fisiológicos, desde a regulação da função cardiovascular até a participação em processos ligados à memória, incluindo respostas do sistema imune. Paradoxalmente, a participação de NO como promotor de severidade em diferentes doenças, incluindo estados de choque e câncer, tem sido observada. Desta forma, a investigação do papel do óxido nítrico na sinalização celular tornou-se, nas duas décadas passadas, uma das áreas que mais cresceram em biologia. Como exemplos da importância dessa área podemos citar a escolha do NO como molécula do ano em 1992 (Science), a criação em 1997 de um periódico dedicado exclusivamente a óxido nítrico (Nitric Oxide: Biology and Chemistry), o Prêmio Nobel dado a Furchgott, Ignarro e Murad, em 1998 e os mais de dez mil artigos por ano que vêm sendo publicados sobre o NO em periódicos indexados. A investigação corrente e futura irá expandir, sem dúvida, o arsenal terapêutico de médicos para controlar um número importante de doenças, através de intervenção na formação e no metabolismo de óxido nítrico. Expectativas como essas têm estimulado o interesse na pesquisa de óxido nítrico em direção a uma lista cada vez maior de potenciais aplicações médicas. (Moncada et al., 1988; Ignarro, 1989; Moncada et al., 1991; Ignarro, 2002).

Paralelamente, na última década, as porfirinas também têm sido exploradas com enfoque terapêutico pelo seu importante papel como sensibilizador em terapia fotodinâmica (PDT). Os seus derivados metálicos, como as ferro-porfirinas, desempenham amplo papel na química e na biologia. O grupo heme (complexo de ferro com a protoporfirina IX) integra uma vasta classe de proteínas, as hemoproteínas, cujos exemplos mais conhecidos são hemoglobina e mioglobina, responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio. As interações de porfirinas, em geral, e de ferro-porfirinas com diversos sistemas biológicos e biomiméticos, como micelas, biomembranas, albumina e ácidos nucleicos, têm sido estudadas através de diversas técnicas, incluindo absorção ótica, fluorescência, EPR (ressonância paramagnética eletrônica), NMR, difração de raios-X e muitas outras.

Importantes aspectos *in vivo* decorrem da ligação do óxido nítrico a centros metálicos, onde os átomos de ferro de hemes e de proteínas ferro-enxofre são os principais alvos para NO em condições fisiológicas (Cooper, 1999). No metabolismo do óxido nítrico as ferro-porfirinas estão presentes: um dos grupos prostéticos de enzimas que sintetizam óxido nítrico (NOS) é o heme; o início do processo de vasodilatação ocorre quando o NO ativa a enzima guanilato ciclase, que é também uma hemoproteína. Do ponto de vista biofísico e bioquímico, os processos de síntese, sinalização e destruição do óxido nítrico, todos envolvem hemoproteínas. Uma vez identificadas as ferro-porfirinas como alvos para óxido nítrico, cresceu significativamente o interesse nas propriedades cinéticas e estruturais de seus complexos nitrosilados. O conhecimento dos mecanismos destas reações, é chave para a possibilidade de sua utilização farmacêutica.

Sendo um radical livre bastante reativo, o gás NO não sobrevive por mais do que alguns segundos em atmosfera de oxigênio. Para intervenção em processos fisiopatológicos gerados por falta ou excesso de produção endógena de óxido nítrico é necessário o desenvolvimento de substâncias que liberem esse radical, ou que o degradem, de maneira controlada. Dentre várias classes de substâncias doadoras de óxido nítrico, os S-nitrosotióis têm sido bastante investigados. S-nitrosotióis endógenos, como os derivados de cisteína e glutathione, têm sido detectados em inúmeros processos fisiológicos.

O SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) é um dos S-nitrosotióis mais utilizados na pesquisa relacionada ao óxido nítrico. Escolhemos esse composto

para investigar as condições em que os S-nitrosotióis podem produzir a transferência de NO para ferro-porfirinas e os mecanismos associados a essa transferência.

## 1.2

### Objetivos

O objetivo básico deste trabalho é obter informações estruturais e cinéticas sobre o mecanismo que leva à nitrosilação das ferro-porfirinas solúveis FeTPPS<sub>4</sub> e FeTMPyP pela reação com S-nitrosotióis, em particular, com SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina). Deseja-se investigar a formação e a estabilidade dos complexos formados em ambiente aeróbico. Procura-se determinar a influência da interação com sistemas estruturados, como micelas, e com proteínas, como albumina, tanto na formação quanto na estabilidade dos complexos nitrosilados.

A investigação da cinética de formação dos complexos nitrosilados foi realizada através da técnica espectroscópica de absorção ótica na região do ultravioleta até o visível. Para a caracterização desses complexos, foram utilizadas as técnicas de absorção ótica e de ressonância paramagnética eletrônica.

Como a presença de oxigênio degrada os complexos nitrosilados das ferro-porfirinas, uma nova abordagem do nosso trabalho anterior (Vilhena e Louro, 2004) inclinou-se para a procura de um processo que evitasse o ataque dos compostos nitrosilados por oxigênio. Sob atmosfera aeróbica e em pH ácido e básico (pH 5.0 e 8.0), investigamos pela técnica de absorção ótica e EPR a influência de micelas iônicas na estabilidade das ferro-porfirinas nitrosiladas.

A técnica de EPR foi utilizada para caracterizar as espécies paramagnéticas formadas e obter informação sobre a influência de micelas catiônicas de CTAB e aniônicas de SDS sobre a estrutura dos complexos e preservação das ferro-porfirinas nitrosiladas quando expostas ao ar.

Em uma última fase de nossa investigação, tendo encontrado um mecanismo de nitrosilação por SNAP diferente do que ocorre utilizando gás NO, procuramos saber se ocorre nitrosilação por SNAP em mioglobinas. Investigamos também como a interação de ferro-porfirinas com albumina, proteína do soro sanguíneo

importante no armazenamento e transporte de inúmeras substâncias endógenas bem como fármacos, influencia o mecanismo de nitrosilação.

### 1.3

#### **Estrutura dos capítulos**

No Capítulo 2, apresentamos uma breve descrição das funções do óxido nítrico no organismo, além da química envolvendo doadores de NO e algumas aplicações médicas e farmacológicas. Fizemos uma breve descrição também das estruturas moleculares e funcionais dos sistemas biológicos como a membrana celular. Estudamos também as hemoproteínas como albumina, hemoglobina e mioglobina e seus grupamentos funcionais, as ferro-porfirinas.

No Capítulo 3, exploramos os fundamentos teóricos e experimentais das técnicas espectroscópicas utilizadas, como a absorção ótica e a ressonância paramagnética eletrônica.

No Capítulo 4, apresentamos os materiais e os procedimentos experimentais empregados durante todo o trabalho.

Os resultados experimentais são apresentados no Capítulo 5. Estes resultados são comparados e discutidos com base nos trabalhos desenvolvidos por outros grupos de pesquisa.

No Capítulo 6 apresentam-se as conclusões do trabalho.