



Fernando de Souza Dias dos Santos Vilhena

**Mecanismos de Nitrosilação de Ferro-porfirinas por SNAP:
Cinética de Reação e Estabilidade em Ambiente Aeróbico**

Tese de Doutorado

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro
Abril de 2006



Fernando de Souza Dias dos Santos Vilhena

**Mecanismos de Nitrosilação de Ferro-porfirinas por SNAP:
Cinética de Reação e Estabilidade em Ambiente Aeróbico**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro

Orientadora
Departamento de Física – PUC-Rio

Profa. Celia Beatriz Anteneodo de Porto

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Iouri Borissevitch

Departamento de Física e Matemática – USP – Ribeirão Preto

Prof. Marcel Tabak

Instituto de Química de São Carlos- USP

Prof. Odivaldo Cambraia Alves

Instituto de Química - UFF

Prof. José Eugênio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação
Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2006

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

Fernando de Souza Dias dos Santos Vilhena

Graduou-se em Física na UERJ em 1999. Concluiu o mestrado em Física pela PUC-Rio em 2002. Recebeu o prêmio de Bolsa Nota 10 da FAPERJ para Doutorado. Atua na área de Física, com ênfase em Biofísica e Propriedades Ópticas e Espectroscópicas da Matéria Condensada.

Ficha Catalográfica

Vilhena, Fernando de Souza Dias dos Santos

Mecanismos de nitrosilação de ferro-porfirinas por SNAP: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbico / Fernando de Souza Dias dos Santos Vilhena ; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – Rio de Janeiro : PUC, Departamento de Física, 2006.

161 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física.

Inclui referências bibliográficas.

1. Física – Teses. 2. Física biofísica. 3. Espectroscopia ferro-porfirinas. 4. Óxido nítrico. 5. Micelas. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III Título.

CDD:530

À minha mãe Berta, ao Felipe e ao meu falecido pai João.

Agradecimentos

A Deus por tudo.

À minha orientadora, Prof^a Sônia Renaux Wanderley Louro, por ter me aceito como aluno desde o mestrado. Sua competência e dedicação pelo projeto, sempre me motivaram e inspiraram ainda mais.

Aos professores do Depto. de Física, Marco Cremona, Rodrigo Prioli, Fernando Lázaro e Paulo. Ao pessoal administrativo e aos técnicos: Giza, Majô, Raquel, Márcia, Wellington, João, Julinho e Zanelli. Aos colegas de curso: Lourdes, Elmer, Luiz, Rafael, Carlos Sanchez e tantos outros que de forma indireta colaboraram neste trabalho.

À FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) e ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

E à Natália pelo amor, carinho e paciência.

Resumo

Vilhena, Fernando de Souza Dias dos Santos; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Mecanismos de nitrosilação de ferro-porfirinas por SNAP: cinética de reação e estabilidade em ambiente aeróbico.** Rio de Janeiro, 2006, 161 p. Tese de Doutorado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Vários complexos metálicos têm sido identificados como alvos para a ligação de óxido nítrico. Para que estes complexos possam ser usados com eficiência e segurança em aplicações medicinais, tem-se como meta compreender suas propriedades cinéticas e estruturais em modelos cada vez mais realísticos. Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de absorção ótica e de ressonância paramagnética eletrônica para estudar a nitrosilação de duas porfirinas férricas solúveis em água, FeTMPyP, porfirina catiônica, e FeTPPS₄, porfirina aniônica, pelo doador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). Foram obtidas as taxas de formação dos complexos nitrosilados em função da concentração de SNAP. Foram encontradas as constantes cinéticas de segunda ordem para ambas porfirinas. A semelhança entre essas constantes, $k_{\text{TMPyP}} = 0.84 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_{\text{TPPS}_4} = 0.97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, sugeriram que o mecanismo da reação é independente da natureza dos meso substituintes das porfirinas. Demonstrou-se que a nitrosilação por SNAP é diferente daquela obtida por reação com NO e propôs-se um mecanismo para a reação. A reação foi investigada na presença de oxigênio. Ao contrário do que acontece com gás NO, SNAP foi capaz de produzir ferro-porfirinas nitrosiladas em ambiente aeróbico. A influência da interação com micelas iônicas na estabilidade dos complexos foi avaliada em atmosfera aeróbica. A associação das ferro-porfirinas com albumina sérica bovina e sua influência na nitrosilação por SNAP foi estudada. Os resultados demonstraram forte influência de fatores eletrostáticos na ligação da ferro-porfirina com a BSA. A interação com BSA exerceu forte influência sobre as taxas de nitrosilação. Os complexos de NO com as duas ferro-porfirinas foram caracterizados por espectroscopia de EPR.

Palavras-chave

Biofísica, espectroscopia ótica, EPR, ferro-porfirinas, óxido nítrico, micelas.

Abstract

Vilhena, Fernando de Souza Dias dos Santos, Luiz da Silva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Mechanisms of nitrosylation of iron porphyrins by SNAP: kinetics of the reaction and stability under aerobic environment.** Rio de Janeiro, 2006, 161 p. Tese de Doutorado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Several metallic complexes have been identified as targets for the binding of nitric oxide. In order that these complexes can be efficiently and safely used in medical applications, it is important to understand their kinetic and structural properties in realistic models. In this work, the optical absorption and electron paramagnetic resonance techniques were used to study the nitrosylation of two water soluble ferric porphyrins, FeTMPyP, cationic, and FeTPPS₄, anionic, by the NO donor S-nitrous-N-acetylpenicillamine (SNAP). For both porphyrins, nitrosylation rates as a function of SNAP concentration were obtained, and the second order rate constants were found. The similarity between these constants, $k_{\text{TMPyP}} = 0.84 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_{\text{TPPS}_4} = 0.97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, suggests a mechanism independent of the nature of the porphyrin meso-substituents. It was demonstrated that the nitrosylation by SNAP is different from that by NO gas, and a reaction mechanism was proposed. The reaction was also studied in aerobic environment. In contrast to NO gas, SNAP was able to produce nitrosylated iron porphyrins even in the presence of oxygen. The influence of ionic micelles on the stability of nitrosylated complexes was evaluated. The association of iron porphyrins with BSA and its influence on nitrosylation by SNAP were studied. The results demonstrated strong electrostatic influence on the binding of iron porphyrins to BSA. The interaction with BSA influenced the nitrosylation rates. The nitrosylated porphyrins were characterized by EPR spectroscopy.

Key-words:

Biophysics, EPR spectroscopy, iron porphyrins, nitric oxide, micelles.

Sumário

1.	Introdução	15
1.1	Introdução	15
1.2	Objetivos	17
1.3	Estrutura dos capítulos	18
2.	O óxido nítrico e os sistemas biológicos	19
2.1	O óxido nítrico	19
2.1.1	Processos biológicos envolvendo óxido nítrico	20
2.1.2	Reações envolvendo óxidos de nitrogênio	28
2.1.3	Doadores de NO	30
2.2	Porfirinas e hemoproteínas	35
2.2.1	As porfirinas.	35
2.2.2	As Ferro-porfirinas.	37
2.2.3	Hemoproteínas	39
2.2.4	A nitrosilação de Fe-porfirinas por gás NO	44
2.3	Biomembranas e Micelas	46
2.3.1	Membranas biológicas	46
2.3.2	Micelas, um modelo de membranas	49
3.	Técnicas Experimentais	55
3.1	Espectroscopia por absorção óptica	55
3.1.1	Lei de Beer-Lambert	56
3.1.2	Tipos de transições eletrônicas	57
3.1.3	Efeitos do solvente	59
3.1.4	Descrição do equipamento	60
3.2	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR): princípios básicos	61
3.2.1	O fator g	65
3.2.2	O desdobramento hiperfino	67
3.2.3	Espectros de amostras em solução e espectros de pó	69
3.2.4	Instrumentação básica em EPR	71
4.	Materiais e Métodos	77
4.1	Materiais	77
4.2	Equipamentos	78
4.3	Procedimentos	78
4.3.1	Absorção ótica	78
4.3.2	Ressonância Paramagnética Eletrônica	83
4.3.3	Determinação da constante de ligação de Fe-porfirinas a albumina	84

5.	Resultados e Discussões	87
5.1	Nitrosilação das Fe-porfirinas em função da concentração de SNAP	87
5.1.1	Fe(III)TPPS ₄	87
5.1.2	Fe(III)TMPyP	95
5.1.3	Constante cinética de nitrosilação por SNAP: solução exata	100
5.1.4	Mecanismo proposto para nitrosilação reductiva por SNAP	102
5.2	Estudo da nitrosilação por ressonância paramagnética eletrônica	103
5.3	Estudo da Cinética de nitrosilação por SNAP em ambiente aeróbico	111
5.4	Influência de micelas na estabilidade de compostos nitrosilados	115
5.4.1	Absorção ótica	115
5.4.2	Ressonância paramagnética eletrônica	128
5.5	Nitrosilação de Fe-porfirinas em proteínas	135
5.5.1	Influência da albumina na nitrosilação da FeTPPS ₄	135
5.5.2	Influência da albumina na nitrosilação da FeTMPyP	142
5.5.3	Nitrosilação de Mioglobina por SNAP	148
6.	Conclusão	151
	Referências bibliográficas	153

Índice de Figuras

Figura 2.1	Óxido nítrico sintetase (dímero) (Prof. D. Rousseau, Dept. of Physiology & Biophysics, Albert Einstein College of Medicine).	20
Figura 2.2	Grupos prostéticos presentes na enzima NO sintetase.	21
Figura 2.3	Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase endotelial eNOS, e seu mecanismo de atuação na relaxação muscular.	22
Figura 2.4	Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase neuronal, nNOS, e seu mecanismo de atuação como mensageiro retrógrado	25
Figura 2.5	Produção de óxido nítrico a partir da enzima iNOS e seu mecanismo de atuação na destruição de células tumorais.	27
Figura 2.6	Oxidação e redução de espécies reativas de nitrogênio.	30
Figura 2.7	Comparação entre concentrações de óxido nítrico expirado por indivíduos saudáveis (controle) e apresentando asma brônquica.	34
Figura 2.8	À esquerda a porfirina, os quatro grupamentos pirrol e os algarismos romanos que os designam; os algarismos arábicos apresentam as posições nas quais os possíveis ligantes podem se vincular; as letras gregas denotam as pontes de meteno. À direita; representação esquemática das porfirinas.	35
Figura 2.9	Esquema das porfirinas e seus possíveis substituintes. Acima: uroporfirinas; no centro coproporfirinas e abaixo protoporfirina.	36
Figura 2.10	Estrutura das porfirinas TMPyP e TPPS ₄ .	37
Figura 2.11	Esquema estrutural das ferro-porfirinas Fe-TPPS ₄ e FeTMPyP. Apresentando em detalhe os átomos de carbono (azul claro); átomos de nitrogênio (azul escuro); átomo de ferro (vermelho); enxofre (amarelo); oxigênio (marrom) e hidrogênio (branco).	38
Figura 2.12	Estrutura quaternária da hemoglobina, com quatro cadeias (duas α e duas β), cada uma contendo o grupo heme.	40
Figura 2.13	Esquema do heme, à esquerda, e a estrutura de nitrosil heme em hemoglobina, com as histidinas distal, E7, e proximal, F8, à direita.	41
Figura 2.14	Estrutura tridimensional da molécula de mioglobina, mostrando o grupo heme e as histidinas proximal (à direita do heme) e distal (à esquerda)	42
Figura 2.15	Albumina humana complexada com ácidos graxos e heme (RCSB Protein Data Bank, 109X).	43
Figura 2.16	Ligação de NO a hemes no estado ferroso (Fe^{+2}).	44
Figura 2.17	Esquema de ligação de NO gás a hemes no estado férrico (Fe^{+3}).	45
Figura 2.18	Estrutura da membrana plasmática, segundo o Modelo de Mosaico Fluido de Singer e Nicholson, 1972.	47
Figura 2.19	Estrutura básica dos fosfolipídios. A região polar contém o grupamento fosfato e mudanças nesta estrutura caracterizam diferentes fosfolipídios. A região apolar é uma grande cadeia de ácido graxos que podem	

variar de acordo com o fosfolípido em questão, mas sempre possuem uma ramificação saturada e outra insaturada.	48
Figura 2.20 Representação esquemática de algumas estruturas organizadas de surfactantes.	50
Figura 2.21 Estrutura da micela de SDS (simulação).	51
Figura 2.22 Formação de vesículas por sonicação (ultra-som).	53
Figura 2.23 Comparação entre os sítios de solubilização de diferentes analitos em micelas e vesículas.	53
Figura 3.1 Níveis de energia para uma molécula pequena. São indicadas transições eletrônicas (e), vibracionais (v) e rotacionais (r).	56
Figura 3.2 Diagrama esquemático de níveis de energia mostrando as energias relativas e as transições possíveis.	58
Figura 3.3 Efeitos típicos da polaridade do solvente nas energias de transição [para as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$].	59
Figura 3.4 Esquema ilustrativo do funcionamento do espectrofotômetro HP 8452A diode array com detecção por arranjo de diodos (1), conectado a um computador (2). Esquema do espectrofotômetro: (a) lâmpada de deutério/tungstênio; (b) lente da fonte; (c) obturador; (d) amostra; (e) lente espectrográfica; (f) fenda; (g) rede de difração; (h) arranjo de diodos detectores.	60
Figura 3.5 Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético B, a forma da linha de absorção de energia do campo de microonda e sua derivada.	65
Figura 3.6 Desdobramento hiperfino para spin nuclear I=1.	68
Figura 3.7 Espectro idealizado de EPR para um sistema casualmente orientado exibindo g anisotrópico característico de um sistema com simetria axial, desta maneira $g_{//} > g_{\perp}$. (a) Espectro de absorção. Uma intensidade significativa de ressonância é possível somente entre B_{min} e $B_{máx}$. (b) primeira derivada do espectro de EPR. Os pontos marcam onde ocorrem $g_{//}$ e g_{\perp} .	70
Figura 3.8 Espectro de pó de uma proteína de cobre típica a -150°C .	71
Figura 3.9 Variação dos estados de energia de spin como função de um campo magnético aplicado.	72
Figura 3.10 O espectrômetro mais simples.	73
Figura 3.11 O esquema geral para o espectrômetro de EPR	73
Figura 3.12 Diagrama em bloco da ponte de microondas	74
Figura 3.13 Diagrama em bloco do controlador de campo e componentes associados.	75
Figura 3.14 Diagrama em blocos do espectrofotômetro de EPR.	76
Figura 4.1 Espectro de absorção do SNAP 80 μM em tampão universal 30 mM, EDTA 0,1 mM, pH 5.0. Em pH 8.0 o espectro é igual.	80
Figura 5.1 (A) Evolução do espectro de absorção da FeTPPS ₄ (7 μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (8 μM).	88
Figura 5.1 (B) Evolução do espectro de absorção da FeTPPS ₄ (7 μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (22 μM).	89

- Figura 5.1 (C) Evolução do espectro de absorção da FeTPPS₄ (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (35 μM). 90
- Figura 5.2 Fração de FeTPPS₄ nitrosilada como função da fração de SNAP. A concentração de porfirina é 7 μM. A curva representa o ajuste com o modelo de equilíbrio entre dois estados, com $K = 0,58 \pm 0,11$ e $F_f = 1,08 \pm 0,04$. 91
- Figura 5.3 Curvas de cinética de nitrosilação da FeTPPS₄ (~7μM) em pH 5,0, obtidas da variação de absorbância em dois diferentes comprimentos de onda, 394 nm e 414 nm. [SNAP]: (■) 8 μM; (●) 22 μM; (▲) 35 μM. As linhas representam os ajustes da função mono-exponencial apenas para os primeiros pontos experimentais. As constantes de tempo (τ) obtidas do ajuste encontram-se na Tabela 5.1. 92
- Figura 5.4 Taxa de nitrosilação k_o de TPPS₄ (7μM) em função da concentração de SNAP. A reta é resultado do ajuste linear do gráfico. A constante cinética foi obtida do coeficiente angular da reta: $k = 0,88 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 94
- Figura 5.5 (A) Evolução do espectro de absorção da FeTMPyP (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP, 8μM 95
- Figura 5.5 (B e C) Evolução do espectro de absorção da FeTMPyP (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (B) 17μM (C) 32μM. 96
- Figura 5.6 Fração de FeTMPyP nitrosilada como função da fração de SNAP. A concentração de porfirina é 7 μM. A curva representa o ajuste com o modelo de um sítio de ligação, com $K = 0,56 \pm 0,15$ e $F_f = 1,09 \pm 0,06$. 97
- Figura 5.7 Curvas de cinética de nitrosilação da FeTMPyP (~7μM) em pH 5,0. [SNAP]: (■) 8 μM; (●) 17 μM; (▲) 32 μM. As linhas representam os ajustes da função mono-exponencial apenas para os primeiros pontos experimentais. Os parâmetros do ajuste encontram-se na Tabela 5.2. 98
- Figura 5.8 Taxa de nitrosilação ($1/\tau$) de FeTMPyP (7μM) em função da concentração de SNAP. A reta é resultado do ajuste linear do gráfico. A constante cinética foi obtida do coeficiente angular da reta: $k = 0,79 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 99
- Figura 5.9 Fração de porfirinas nitrosiladas. (A) FeTPPS₄ e (B) FeTMPyP em função do tempo para diferentes concentrações de SNAP: (■) 8 μM; (●) 22 μM; (▲) 35 μM. As concentrações de porfirinas são próximas a 7μM. 101
- Figura 5.10 Mecanismo proposto para nitrosilação redutiva por SNAP (ou qualquer RSNO). 103
- Figura 5.11 Espectro de EPR de FeTMPyP e FeTPPS₄ (100μM) em tampão universal 66mM em vários valores de pH. Região do FeIII, spin alto, a 77^oK. 104
- Figura 5.12 Variação da intensidade do sinal de EPR de Fe(III)P, spin alto, em função do pH. 105
- Figura 5.13 Espectros de EPR a 77^oK de NO-Fe(II)TPPS₄ formado por reação de Fe(III)TPPS₄ (100μM) com SNAP (400μM), em tampão universal 66mM (A) pH 5.0; (B) pH 8,0. 107
- Figura 5.14 Espectros de EPR a 77^oK de NO-Fe(II)TMPyP formado por reação de Fe(III)TMPyP (100μM) com SNAP (400μM), em tampão universal 66mM (A) pH 5.0; (B) pH 8.0. 108
- Figura 5.15 Nitrosilação da ferro-porfirinas FeTMPyP em (A) pH 5.0 e (B) pH 8.0. Os gráficos representam a amplitude dos espectros de EPR de Fe(III)P e de NO-Fe(II)P em função do tempo de reação com SNAP. 109

Figura 5.16 Espectros de EPR a 77⁰K de NO-Fe(II)TMPyP e NO-Fe(II)TPPS₄ formados por reação de Fe(III)TMPyP (100µM) com gás NO em excesso + ditionito. 110

Figura 5.17 Cinética de nitrosilação da FeTPPS₄ e FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM (A) pH 5.0 e (B) pH 8.0: variação de absorção normalizada como função do tempo, após a adição de SNAP(40µM). Símbolos cheios: nitrosilação na ausência de oxigênio; símbolos vazados: nitrosilação na presença de oxigênio. 112

Figura 5.18 Cinética de nitrosilação da FeTPPS₄ e FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM (A) pH 5,0; (B) pH 8,0. Variação de absorção normalizada como função do tempo, após a exposição ao ar. Círculos, FeTMPyP; triângulos, FeTPPS₄. 114

Figura 5.19 (A e B) Espectros óticos de NO-FeTPPS₄ (10µM) em tampão universal 66mM, pH 5.0. (A) Antes (1) e após (2) nitrosilação com SNAP (40µM). (B) Após nitrosilação (1), seguida de adição de CTAB, 20 mM (2), seguida de exposição ao ar (3). 117

Figura 5.19 (C e D) Espectros óticos de NO-FeTPPS₄ (10µM) em tampão universal 66mM, pH 5.0. (C) Evolução temporal após exposição ao ar. (D) Comparação entre o espectro obtido ao final da reação com O₂ (1) e o de porfirina em CTAB, pH 5.0 (2) . 118

Figura 5.20 (A e B) Espectros óticos de NO-FeTPPS₄ (10µM) em tampão universal 66mM, pH 8.0. (A) Antes (1) e após (2) nitrosilação com SNAP (40µM). (B) Após nitrosilação (1), seguida de adição de CTAB, 20 mM (2), seguida de exposição ao ar (3). 120

Figura 5.20 (C e D) Espectros óticos de NO-FeTPPS₄ (10µM) em tampão universal 66mM, pH 8.0. (C) Evolução temporal após exposição ao ar. (D) Comparação entre o espectro obtido ao final da reação com O₂ (1) e o de porfirina em CTAB, pH 8.0 (2). 121

Figura 5.21 (A) Espectros óticos de NO-FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM, pH 5.0. (A) Antes (1) e após (2) nitrosilação com SNAP (40µM). 123

Figura 5.21 (B, C) Espectros óticos de NO-FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM, pH 5.0. (B) Após nitrosilação (1), seguida de adição de CTAB, 20 mM (2), seguida de exposição ao ar (3). (C) Após exposição ao ar por 40 min (1), 72h (2) e, para comparação, de FeTMPyP em CTAB, pH 5.0 (3). 124

Figura 5.22 (A) Espectros óticos de NO-FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM, pH 8.0. (A) Antes (1) e após (2) nitrosilação com SNAP (40µM). 125

Figura 5.22 (B,C) Espectros óticos de NO-FeTMPyP (10µM) em tampão universal 66mM, pH 8.0. (B) Após nitrosilação (1), seguida de adição de SDS, 20 mM (2), seguida de exposição ao ar (3). (C) Após exposição ao ar por 4 h (1), 24 h (2) e , para comparação, de FeTMPyP em SDS, pH 8.0 (3). 126

Figura 5.23 Espectro de EPR da FeTPPS₄ 100 µM em pH 5.0 e 8.0 em nitrogênio líquido a 77 K em tampão universal 66mM, após a adição de SNAP 400 µM e na presença de CTAB 20 mM. 129

Figura 5.24 Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)TPPS₄ 100 µM em pH 5.0, na presença de CTAB 20 mM e após oxigenação por 3 minutos e 1 hora; abaixo: subtração espectral antes e após exposição à atmosfera aeróbia. 130

- Figura 5.25 Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)TPPS₄ 100 µM em pH 8,0, na presença de CTAB 20 mM e após oxigenação por 3 minutos e 1 hora; abaixo: subtração espectral antes e após exposição à atmosfera aeróbia: 131
- Figura 5.26 Espectro de EPR da FeTMPyP 100 µM em pH 5,0 e 8,0 a 77⁰K, em tampão universal 66 mM, após a adição de SNAP 400 µM e na presença de SDS 20 mM. 132
- Figura 5.27 Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)TMPyP 100 µM em pH 5,0, na presença de SDS 20mM e após oxigenação por 3 minutos e 1 hora; abaixo: subtração espectral antes e após exposição à atmosfera aeróbica. 134
- Figura 5.28 Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)TMPyP 100 µM em pH 8,0, na presença de SDS 20 mM e após oxigenação por 3 minutos e 1 hora; abaixo: subtração espectral antes e após exposição à atmosfera aeróbia. 135
- Figura 5.29 Titulação da Fe(III)TPPS₄ (8,5µM) em pH 7,4 por BSA. A BSA foi adicionada de 1 em 1 µM, até uma concentração de 16 µM. 137
- Figura 5.30 Gráficos da variação de absorbância como função da concentração de albumina em 396 e 424 nm, indicando os ajustes computacionais das curvas de ligação a n sítios idênticos. Os parâmetros do ajuste encontram-se na Tabela 1. 139
- Figura 5.31 Estrutura cristalina da albumina humana complexada com hemina e ácido mirístico. a) A estrutura secundária da proteína é mostrada esquematicamente com os subdomínios IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB diferenciados por cores. Os sítios de ligação para ácidos graxos são numerados de 2 a 7, apresentando os átomos diferenciados: carbono-cinza; nitrogênio-azul; oxigênio-vermelho; ferro-laranja. b) Simulação da ligação da hemina ligada ao subdomínio IB. 140
- Figura 5.32 Nitrosilação em função do tempo por SNAP (14 µM), da solução de FeTPPS₄ (8,5 µM) e BSA (16 µM) em pH 7,4 em tampão Tris, desoxigenada após 10 minutos em fluxo de N₂ . 141
- Figura 5.33 Titulação da Fe(III)TMPyP (8,5µM) por BSA. A BSA foi adicionada de 1 em 1µM resultando em uma concentração de aproximadamente 15 µM. 143
- Figura 5.34 Gráficos da variação de absorbância como função da concentração de albumina em 424 e 598 nm, indicando os ajustes computacionais das curvas de ligação a 1 sítio. Os parâmetros do ajuste encontram-se na Tabela 2. 144
- Figura 5.35 Nitrosilação em função do tempo por SNAP (14µM), da solução de FeTMPyP (8,5µM) e BSA (15µM) em tampão Tris pH 7,4, desoxigenada após 10 minutos em fluxo de N₂ . 146
- Figura 5.36 Curvas de cinética de nitrosilação da Fe-TMPyP (8,5 µM) em BSA (15 µM) em tampão tris (50 mM) a pH 7,4. As linhas representam os ajustes de função mono-exponencial. Os parâmetros do ajuste encontram-se na Tabela 1. 147
- Figura 5.37 Espectro de absorção óptica da mioglobina (7µM) em tampão universal pH 7,4, nitrosilada por SNAP 7 e 28 µM como função do tempo. 148