# 5.
# Resultados e Discussões

## 5.1
## Nitrosilação das Fe-porfirinas em função da concentração de SNAP

Antes de apresentarmos resultados sobre a influência de interação com diversos sistemas na nitrosilação das Fe-porfirinas, apresentaremos um estudo para conhecer melhor o mecanismo de sua reação com SNAP. Apresentaremos resultados de cinética de nitrosilação em função da concentração de SNAP e estequiometria da nitrosilação redutiva por SNAP. A partir dos resultados vamos propor um modelo de reação.

### 5.1.1
### Fe(III)TPPS$_4$

A evolução temporal do espectro de absorção ótica de Fe(III)TPPS$_4$ foi registrada durante a reação com SNAP em concentrações correspondentes a frações molares de aproximadamente 1:1, 2:1 e 4:1, em pH 5,0. As Figuras 5.1 A, B e C apresentam os resultados desses experimentos. Nessas figuras destacamos os picos de absorção óptica para a porfirina não nitrosilada em 394 nm na banda de Soret, e em 528 nm na banda Q. Após a adição de SNAP, a absorbância nesses comprimentos de onda decai, enquanto picos em 414 nm (Soret), e 542 nm (Banda Q) tornam-se cada vez mais definidos. Esses picos são característicos de NO-Fe(II)TPPS$_4$ (Vilhena e Louro, 2004). Na Fig. 5.1 C observa-se que, no fim da evolução temporal, o pico em 414 nm atingiu seu nível mais alto. Tomamos esse espectro como característico da NO-Fe(II)TPPS$_4$ para cálculo de porcentagem de porfirina nitrosilada.

Pontos isosbésticos nos espectros durante a nitrosilação indicam a presença de apenas duas espécies. Para estimar a porcentagem de porfirinas nitrosiladas em espectros contendo as duas espécies FeIII-P e NOFeII-P, foram escolhidos os

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

comprimentos de onda na banda de Soret, característicos da $FeTPPS_4$ antes (394 nm) e depois (414 nm) de nitrosilada (para diminuir o erro experimental foi feita a média utilizando também os comprimentos de onda anterior e posterior a cada comprimento de onda escolhido). Em cada comprimento de onda, as variações de absorbância, $\Delta A$, provenientes da nitrosilação da $FeTPPS_4$, foram calculadas em cada tempo e para cada concentração de SNAP e normalizadas à máxima variação, $\Delta A_{max}$ (obtida com a proporção de 4:1 de SNAP em relação a porfirina).

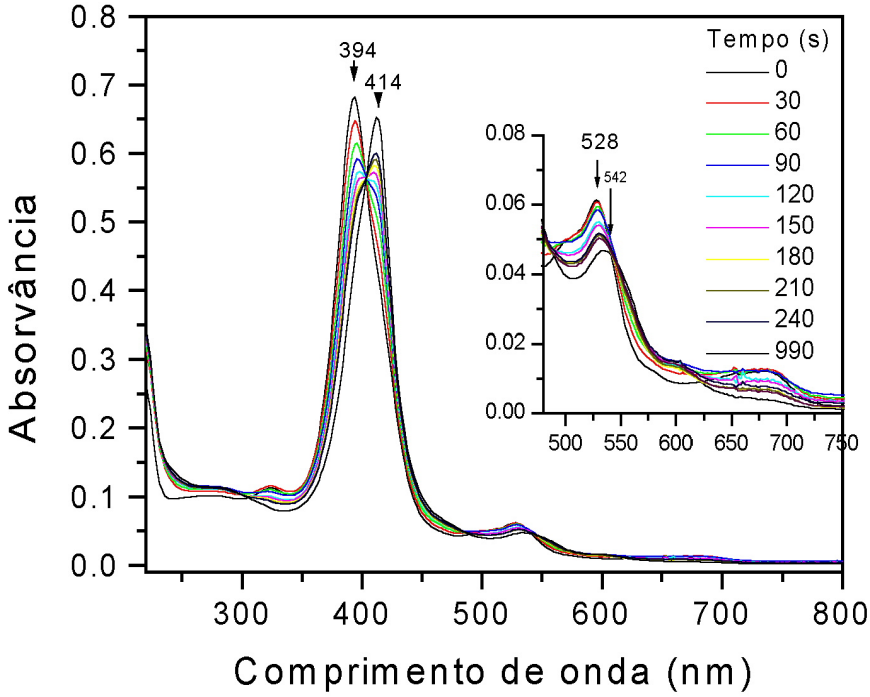



Figura 5.1 A

Evolução do espectro de absorção da $FeTPPS_4$ (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (8 μM).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

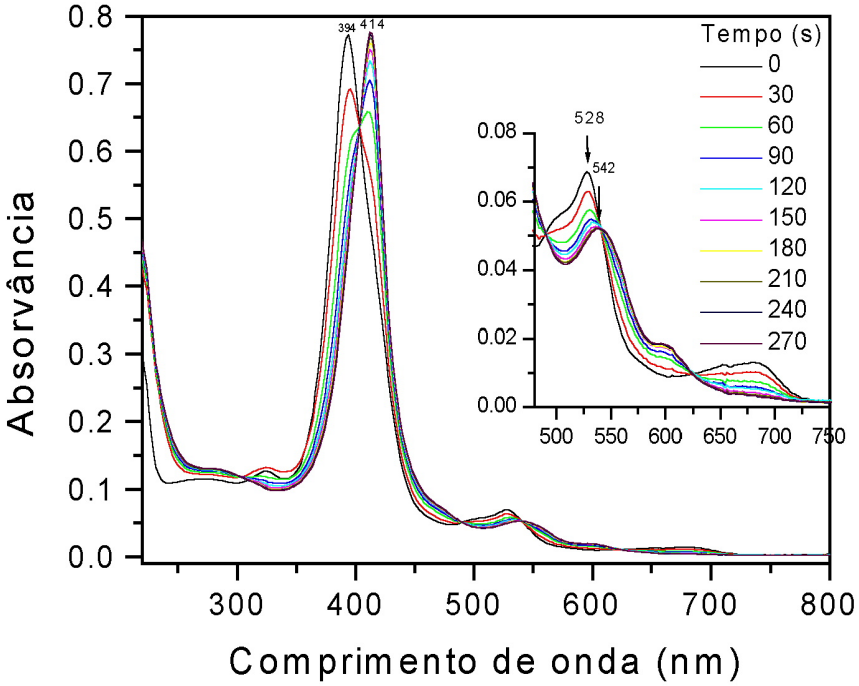



Figura 5.1 B

Evolução do espectro de absorção da $FeTPPS_4$ (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (22 μM).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

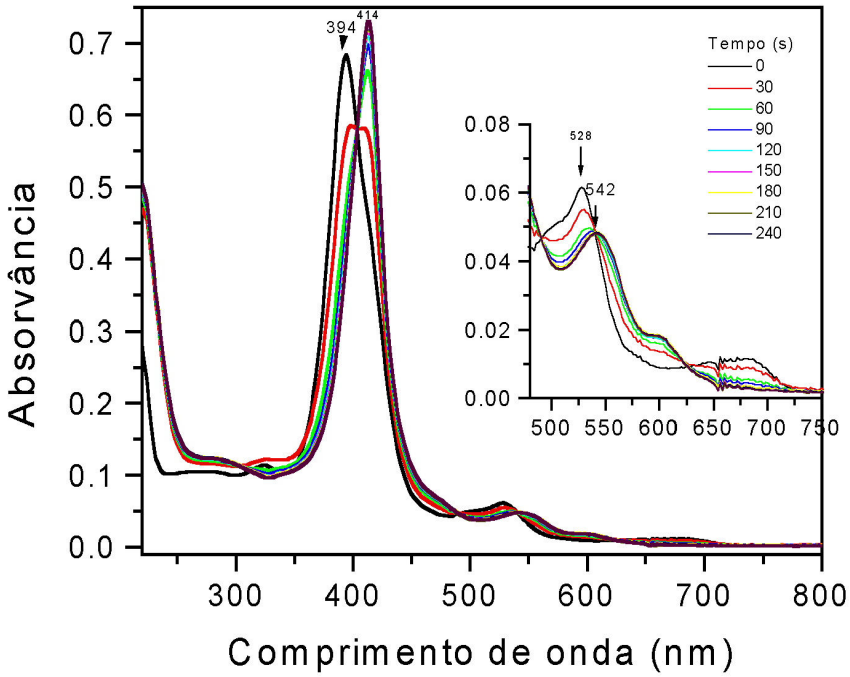



Figura 5.1 C

Evolução do espectro de absorção da $FeTPPS_4$ (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (35 μM).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**Porcentagem de $FeTPPS_4$ nitrosilada em função da concentração de SNAP**

A partir do espectro inicial de absorção da $Fe(III)TPPS_4$ (7μM) em tampão universal pH 5,0 e dos espectros finais da reação com diferentes concentrações de SNAP, calculamos a fração de porfirina nitrosilada ao final da reação, em função da concentração inicial de SNAP (8 μM, 22 μM e 35 μM). O gráfico da variação fracionária de absorbância ($\Delta A/\Delta A_{max}$) em função da concentração de SNAP encontra-se na Fig. 5.2, e representa a fração máxima de porfirina nitrosilada para as diferentes concentrações de SNAP em pH 5,0.

Os pontos foram ajustados utilizando-se a equação de equilíbrio entre dois estados (Eq. 5.1, curva contínua da Fig. 5.2), mais como um guia para os olhos, já que não temos indicações de no final da cinética de reação haja um simples equilíbrio entre dois estados.

$$\frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}} = \frac{F_f\ x}{K + x} \qquad (5.1)$$

onde $x$ é razão entre as concentrações de SNAP e $FeTPPS_4$, $F_f$ é a fração final de porfirina nitrosilada (≈1) e $K$ é uma constante de dissociação adimensional. O ajuste forneceu $K = 0{,}58$, o que representaria uma constante de dissociação $K_d = K.[FeP] = 4{,}1\ \mu M$, e $F_f = 1{,}08$. Admitir a validade da Eq. 5.1 seria admitir o seguinte equilíbrio ao final da cinética de reação com SNAP:

$$NOFe(II)P \xleftrightarrow{K_d} Fe(III)P + NO^- \qquad (5.2)$$

Os pontos apresentados na Fig. 5.2 indicam que, ao final da nitrosilação, a proporção 1:1 de SNAP para $FeTPPS_4$ é capaz de nitrosilar mais do que 50% de $FeTPPS_4$. Esse resultado sugere que a nitrosilação envolve SNAP em primeira ordem em outras palavras, é necessária apenas uma molécula de SNAP para nitrosilar uma ferro porfirina.

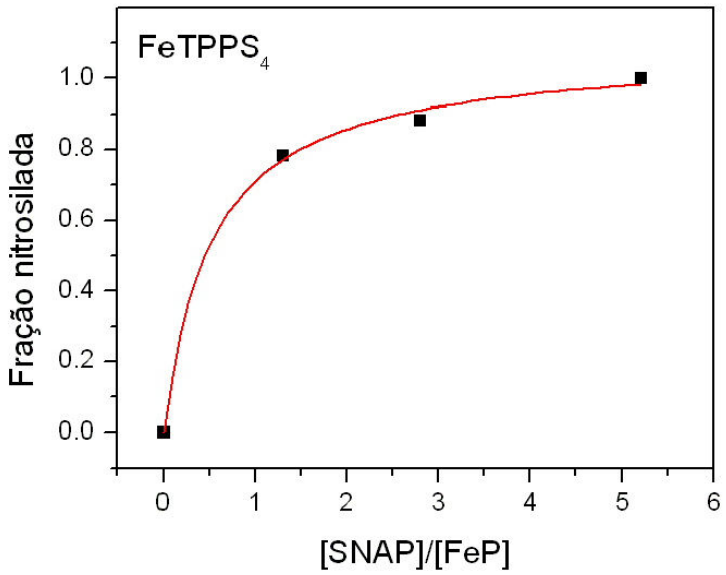



Figura 5.2

Fração de $FeTPPS_4$ 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 ± 0,11 e $F_f$ = 1,08 ± 0,04, conforme o texto.

### Determinação da constante cinética de nitrosilação de $FeTPPS_4$ por SNAP

A Fig. 5.3 mostra os gráficos das variações normalizadas de absorbância de $FeTPPS_4$ para pH 5,0 para diferentes concentrações de SNAP. Para obtenção desses gráficos, os ΔA encontrados em cada comprimento de onda, a partir dos espectros da Fig. 5.1, foram normalizadas à máxima variação $\Delta A_{max}$, encontrada

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

com a maior concentração de SNAP, e foi realizada a média dessa variação fracionária ($\Delta A/\Delta A_{max}$) nos comprimentos de onda 394 nm e 414 nm da banda de Soret.

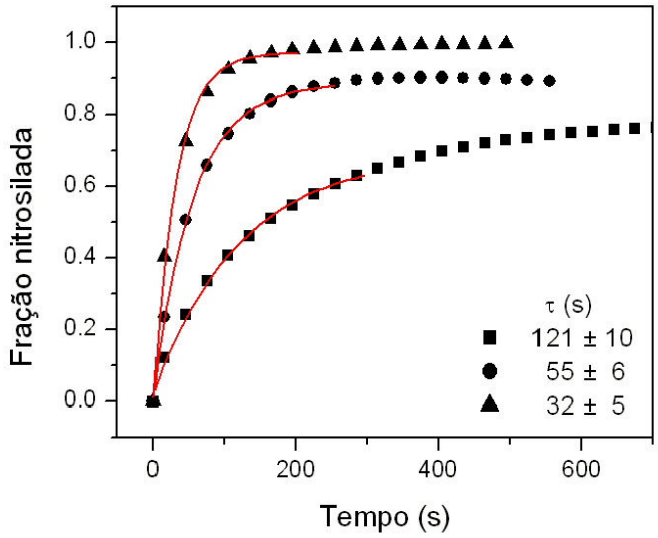



Figura 5.3

Curvas de cinética de nitrosilação da $FeTPPS_4$ (~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.

Para analisar esses resultados vamos partir da aproximação mais simples. Conforme sugerido na seção anterior, já que na proporção de 1:1 mais de 50% de ferro-porfirinas estão nitrosiladas, espera-se que apenas uma molécula de SNAP seja capaz de produzir a nitrosilação redutiva. Admitindo-se que a reação de nitrosilação se dá entre uma molécula de porfirina e uma de SNAP, podemos escrever:

$$\mathrm{Fe(III)P} + \mathrm{SNAP} \xrightarrow{k} \mathrm{NO\text{-}Fe(II)P} + \mathrm{produto(s)} \qquad (5.3)$$

Segundo a Eq. 5.3, a taxa com que [Fe(III)P] é consumida é igual à taxa com que [NO-Fe(II)P] é produzida. Esta é proporcional à concentração de porfirina e de SNAP. Assim, podemos escrever:

$$\frac{d\,[\mathrm{Fe(III)P}]}{dt} = -k\,[\mathrm{Fe(III)P}]\,[\mathrm{SNAP}] \qquad (5.4)$$

onde $k$ é a constante cinética de nitrosilação.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

$$\frac{d[\mathrm{Fe(III)P}]}{[\mathrm{Fe(III)P}]} = -k\,[\mathrm{SNAP}]\,dt \qquad (5.5)$$

Se [SNAP] não variar significativamente ([SNAP] ≈ $[\mathrm{SNAP}]_i$ , no início da reação), resolve-se a equação diferencial e temos:

$$\frac{[\mathrm{Fe(III)P}]}{[\mathrm{Fe(III)P}]_i} = \exp(-k[\mathrm{SNAP}]t) \qquad (5.6)$$

Onde $[\mathrm{Fe(III)P}]_i$ é a concentração de porfirinas antes da adição de SNAP. Como esta concentração decresce após o início da reação, e supondo este decréscimo exponencial, podemos admitir que:

$$[\mathrm{Fe(III)P}] = [\mathrm{Fe(III)P}]_i \exp(-t/\tau)$$

onde $\tau$ é o tempo característico dessa função exponencial, que é o inverso da taxa de nitrosilação, $k_o$.

$$k_o = \frac{1}{\tau} = k\,[\mathrm{SNAP}] \qquad (5.7)$$

Como [NO-Fe(II)P]= $[\mathrm{Fe(III)P}]_i$ - [Fe(III)P], conforme modelo de duas espécies sugerido pela presença de pontos isosbésticos.

$$\frac{[\mathrm{NO\text{-}Fe(II)P}]}{[\mathrm{Fe(III)P}]_i} = \{1-\exp(-k[\mathrm{SNAP}]t)\} = \{1-\exp(-t/\tau)\} \qquad (5.8)$$

Ou seja, a concentração de porfirina nitrosilada segue uma função exponencial com tempo característico $\tau$ . Como essa concentração está associada à variação de absorbância, utilizamos a Eq. 5.9 para a determinação de $\tau$, onde $\Delta A/\Delta A_{máx}$ é a variação normalizada da absorbância.

$$\frac{\Delta A}{\Delta A_{máx}} = A_1 + A_2\,\{1-\exp(-t/\tau)\} \qquad (5.9)$$

A Eq. 5.9 foi ajustada aos dados experimentais da Fig. 5.3, tomando apenas os pontos iniciais, para os quais a [SNAP] ainda não tenha variado significativamente. Os parâmetros $A_1$ e $A_2$ (da ordem de 0 e 1, respectivamente) foram deixados livres para dar conta de erros na medida do primeiro intervalo de tempo e na normalização.

Os tempos característicos de nitrosilação, $\tau$ , obtidos do ajuste da Eq. 5.9 encontram-se na Tabela 5.1, junto com as taxas de reação, $k_o = 1/\tau$. Devemos ressaltar que, para a determinação de $\tau$, restringimos o ajuste da curva apenas aos primeiros pontos experimentais (12, 10 e 9 primeiros pontos, para as proporções

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

SNAP / porfirina de aproximadamente 1:1, 2:1 e 4:1, respectivamente), já que consideramos a aproximação de que [SNAP] ≈ $[SNAP]_i$ .

Tabela 5.1: Parâmetros do ajuste da função mono-exponencial $\Delta A/\Delta A_{max} = A_1 + A_2*(1 - exp(-t/\tau))$ aos dados experimentais da cinética de nitrosilação de $FeTPPS_4$ em pH 5,0. A taxa de nitrosilação $k_o$ foi obtida como $1/\tau$.

| $FeTPPS_4$ pH 5,0 | | | |
|---|---|---|---|
| [SNAP] | 8 μM | 22 μM | 35 μM |
| $\tau$ (s) | 121 ± 10 | 55 ± 6 | 32 ± 5 |
| $k_o$ ($10^{-3}s^{-1}$) | 8,3 ± 0,7 | 18,2 ± 1,7 | 31,2 ± 4,9 |

Uma vez determinados estes tempos característicos de nitrosilação como função da concentração de SNAP, fizemos o gráfico da taxa de nitrosilação $k_o$ (inverso de $\tau$) em função concentração de SNAP (Fig. 5.4). A linearidade indica que, de fato, a taxa de reação é proporcional à concentração de SNAP, ou seja, a reação de nitrosilação é de primeira ordem em SNAP, estando em concordância com a Eq. 5.3. Determinamos o valor da constante cinética de segunda ordem, $k$, a partir do coeficiente angular da reta. Encontramos, para a constante cinética de nitrosilação, o valor de $k_{TPPS4} = 0,88 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$.

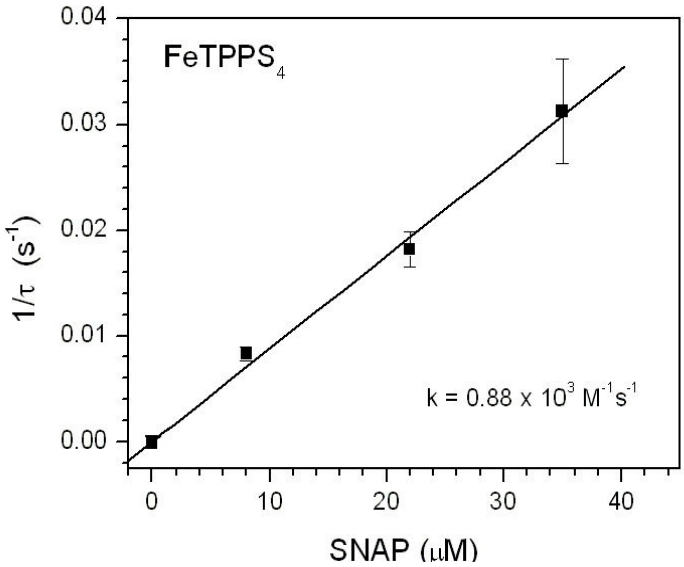



Figura 5.4

Taxa de nitrosilação $k_o$ de $TPPS_4$ (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 x $10^3\ M^{-1}s^{-1}$.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

### 5.1.2
### Fe(III)TMPyP

Nesta seção descrevemos procedimentos semelhantes aos da Seção 5.1.1 realizados agora com a porfirina catiônica FeTMPyP. As Figuras 5.5 A, B e C apresentam a evolução temporal do espectro de Fe(III)TMPyP durante a reação com SNAP em concentrações de aproximadamente 1:1, 2:1 e 4:1. Nessas figuras, para a Fe-porfirina não nitrosilada, destacamos os picos de absorção ótica em 422 nm na banda de Soret, enquanto na banda Q, os picos ocorreram em 500 e 630 nm. Após a adição de SNAP, a absorbância nestes comprimentos de onda muda drasticamente. No pico em 422 nm, ocorre um grande aumento da intensidade de absorbância e um pequeno deslocamento para 424 nm, enquanto na banda Q, ocorre um decréscimo da intensidade de absorbância em 500 e 630 nm, tornando-se cada vez mais bem definido um pico em 552 nm característico da NO-Fe(II)TMPyP. Após inspeção dos gráficos de absorbância, percebe-se que as mudanças espectroscópicas tornam-se muito mais rápidas à medida que a proporção SNAP: porfirina aumenta.

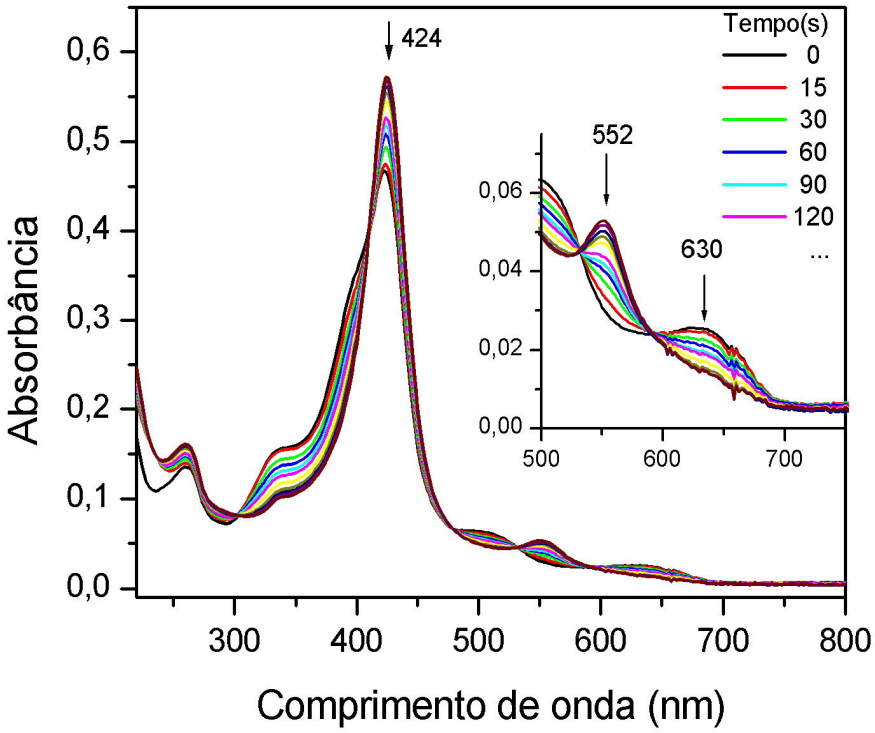



Figura 5.5 A

Evolução do espectro de absorção da FeTMPyP (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP, 8μM

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

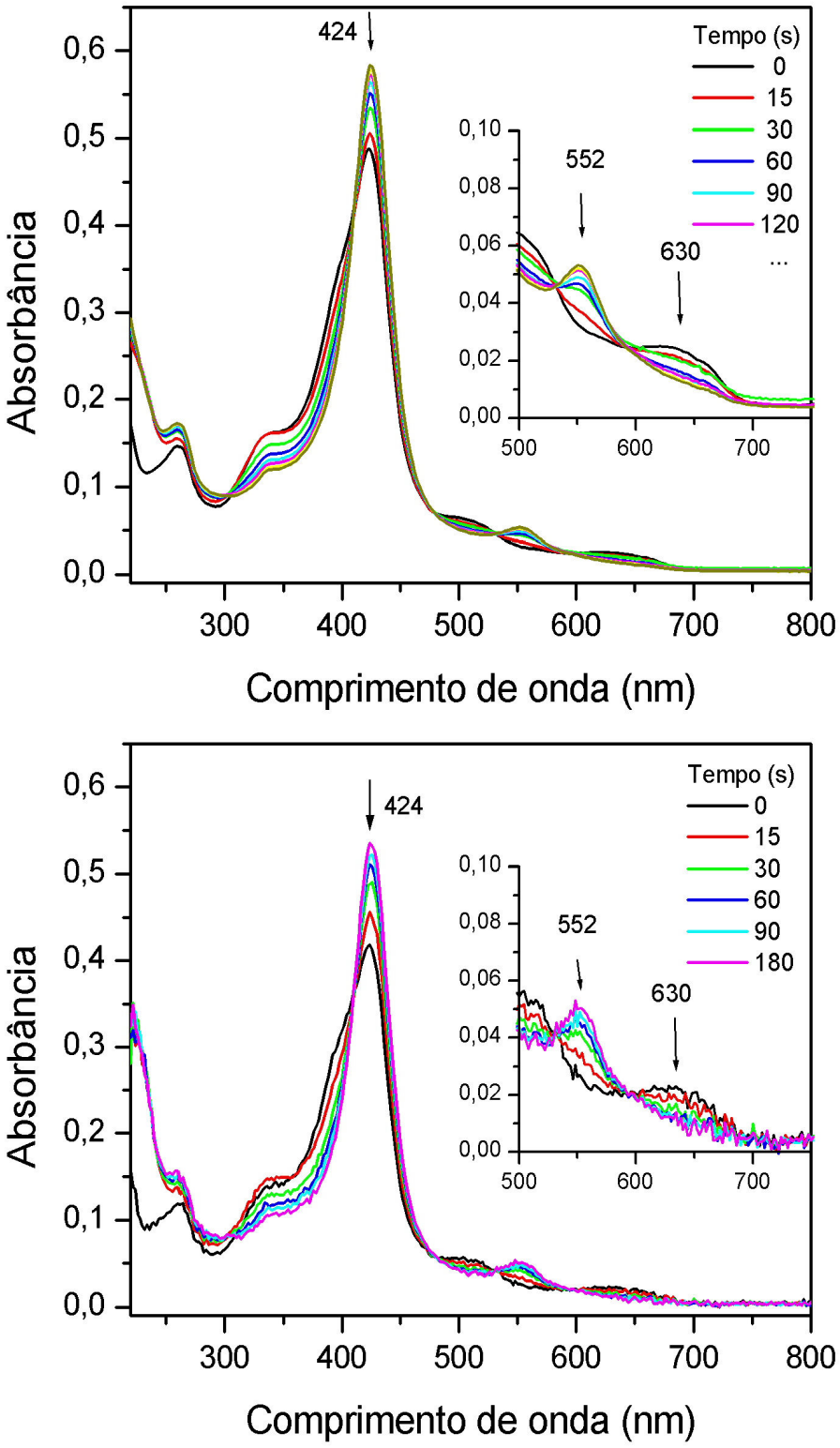



Figura 5.5 B,C

Evolução do espectro de absorção da FeTMPyP (7μM) em tampão universal pH 5.0 durante a nitrosilação por SNAP (B) 17μM (C) 32μM.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**Porcentagem de FeTMPyP nitrosilada em função da concentração de SNAP**

A partir dos espectros iniciais e finais das Figuras 5.5 A, B e C, investigamos a fração de porfirina nitrosilada ao final da reação da Fe(III)TMPyP (7 μM) em tampão universal pH 5.0, em função da concentração de SNAP (8 μM, 17 μM e 32 μM).

Para estimar a percentagem de porfirinas nitrosiladas foram escolhidos os comprimentos de onda nas bandas de Soret e na banda Q (422 e 552 nm), característicos da FeTMPyP antes e após a nitrosilação. Para esta estimativa, seguimos os mesmos passos já descritos no estudo da $FeTPPS_4$. O gráfico da variação fracionária de absorbância ($\Delta A/\Delta A_{max}$) em função da concentração de SNAP encontra-se na Fig. 5.6 e representa a fração máxima de porfirina nitrosilada para as diferentes concentrações de SNAP em pH 5,0.

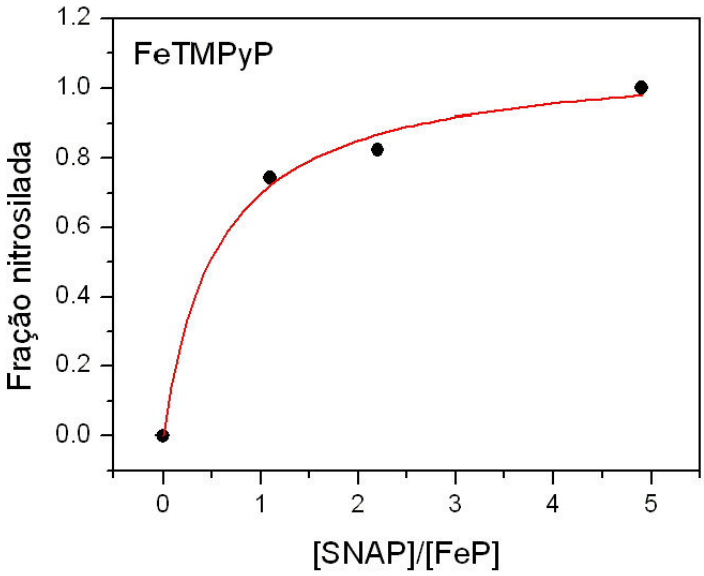



Figura 5.6
Fração de FeTMPyP nitrosilada como função da fração de SNAP. A concentração de porfirina é 7 μM. A curva representa o ajuste com o modelo de um sítio de ligação, com K = 0,56 ± 0,15 e $F_f$ = 1,09 ± 0,06.

Os pontos foram ajustados utilizando-se a Equação 5.1, com $K$= 0,56, o que representa uma constante de dissociação $K_d$= 3,9 μM, e $F_f$ =1,09. Assim como para a $FeTPPS_4$, o modelo de equilíbrio descrito pela Eq. 5.1 não é

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

necessariamente válido, mas é interessante notar que a constante $K_d$ foi semelhante para as duas porfirinas.

**Determinação da constante cinética de nitrosilação de FeTMPyP por SNAP**

Como na Seção 5.1.1, para a determinação da constante cinética de reação *k*, admitimos que a reação de nitrosilação é uma reação escrita pela Eq. 5.3, consistindo na reação de Fe(III)TMPyP e SNAP resultando na formação do complexo NO-Fe(II)TMPyP além de outros produtos da reação. A Fig. 5.7 mostra os gráficos das variações de absorbância (normalizadas) de TMPyP como função do tempo, em pH 5,0 e para diferentes concentrações de SNAP. Foram utilizados os comprimentos de onda 422 nm e 552 nm, na banda de Soret e banda Q, respectivamente. Para obtenção desses gráficos, os $\Delta A$ encontrados em cada comprimento de onda a partir dos espectros da Fig. 5.5 foram normalizadas à máxima variação na maior concentração de SNAP, $\Delta A_{max}$ .

Como para $FeTPPS_4$, restringimos o ajuste da Eq. 5.9 apenas aos primeiros pontos experimentais da Fig. 5.7 para a determinação do tempo característico de nitrosilação $\tau$. Os valores de $\tau$ obtidos encontram-se na Tabela 5.2, assim como os valores de $k_o = 1/\tau$.

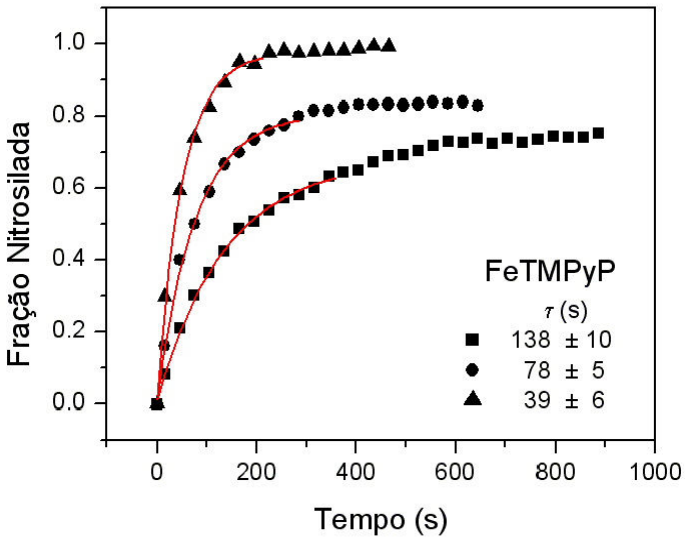



Figura 5.7

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.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Tabela 5.2: Parâmetros do ajuste da função mono-exponencial $\Delta A/\Delta A_{max} = A_1 + A_2\,(1-exp(-t/\tau))$ aos dados experimentais da cinética de nitrosilação de FeTMPyP em pH 5,0. A taxa de nitrosilação $k_o$ foi obtida como $1/\tau$.

| FeTMPyP pH 5,0 | | | |
|---|---|---|---|
| [SNAP] | 8 μM | 17 μM | 32 μM |
| $\tau$(s) | 138 ± 10 | 78 ± 5 | 39 ± 6 |
| $k_o$ ($10^{-3}s^{-1}$) | 7,2 ± 0,8 | 12,8 ± 1,0 | 25,6 ± 3,9 |

Novamente, de posse dos tempos característicos de nitrosilação, fizemos o gráfico da taxa de formação de complexos nitrosilados como função da concentração de SNAP. A determinação de *k* (constante cinética de nitrosilação) foi feita pela determinação do coeficiente angular da reta.

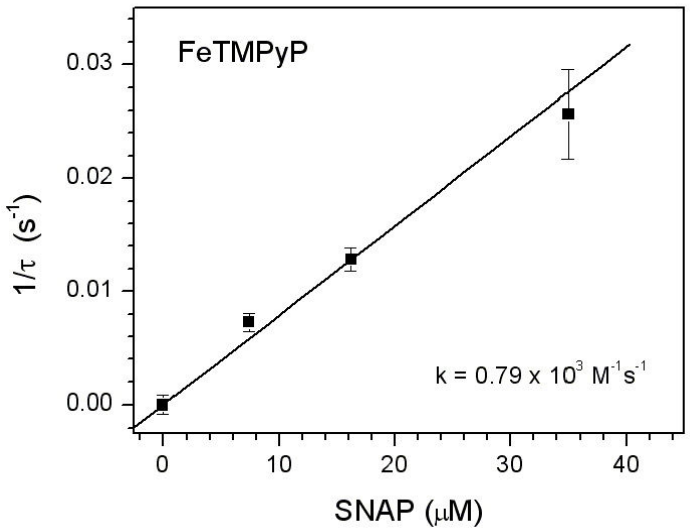



Figura 5.8

Taxa de nitrosilação (1/τ) 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 x $10^3$ $M^{-1}s^{-1}$.

Encontramos para o coeficiente angular da reta, ou a constante cinética de nitrosilação, o valor de $k_{TMPyP} = 0{,}79 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$ que é bastante parecida com o obtido para a $FeTPPS_4$, indicando que a carga elétrica dos substituintes na porfirina não têm grande influência no processo de nitrosilação. Como já anteriormente citado, a linearidade entre taxa de nitrosilação e concentração de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

SNAP indica que a reação de nitrosilação é de primeira ordem na concentração de SNAP, estando em concordância com a Eq. 5.3.

### 5.1.3
### Constante cinética de nitrosilação por SNAP: solução exata

Apresentaremos a solução exata da equação da Eq 5.4 que é de primeira ordem com relação a [SNAP]. A determinação da constante cinética de segunda ordem é feita sem considerar que [SNAP] é constante durante todo o processo de nitrosilação redutiva.

Omitindo-se a valência do Fe, para simplificar a notação:

$$\frac{d[\mathrm{FeP}]}{dt} = -k\,[\mathrm{FeP}][\mathrm{SNAP}] \tag{5.4}$$

A molécula de SNAP consumida pela reação, tem sua concentração relacionada à concentração inicial de SNAP ($[\mathrm{SNAP}]_o$) e de porfirinas nitrosiladas.

$$[\mathrm{SNAP}] = [\mathrm{SNAP}]_o - [\mathrm{NOFeP}] = C + [\mathrm{FeP}] \tag{5.10}$$

onde $C$ é constante, uma vez que $[\mathrm{NOFeP}] = [\mathrm{FeP}]_o - [\mathrm{FeP}]$.

Desta maneira a Eq.5.4 pode ser reescrita como a Eq. 5.11

$$\frac{d[\mathrm{FeP}]}{dt} = -k\,[\mathrm{FeP}]\left(C + [\mathrm{FeP}]\right) \tag{5.11}$$

Integrando a Eq. 5.11, tem-se:

$$\int_{[FeP]_i}^{[FeP]} \frac{d[\mathrm{FeP}]}{[\mathrm{FeP}]\left(C + [\mathrm{FeP}]\right)} = -k\int_0^t dt \tag{5.12}$$

Consultando-se uma tabela de integrais obtém-se a Eq 5.13.

$$\frac{1}{|C|}\left[\ln\frac{2[\mathrm{FeP}] + C - |C|}{2[\mathrm{FeP}] + C + |C|}\right]_{[\mathrm{FeP}]_o}^{[\mathrm{FeP}]} = -k\,t \tag{5.13}$$

Se consideramos o caso onde $[\mathrm{SNAP}]_o > [\mathrm{FeP}]_o$ , ou seja, C >0, após alguma álgebra podemos escrever a Eq. 5.13 em termos da concentração de ferro-porfirina não nitrosilada.

$$[\mathrm{FeP}] = \frac{C}{\frac{[\mathrm{SNAP}]_o}{[\mathrm{FeP}]_o}\exp C\,k\,t - 1} \tag{5.14}$$

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

A fração de porfirina nitrosilada $F = 1 - [\mathrm{FeP}]/[\mathrm{FeP}]_o$ é desta maneira dada pela Eq. 5.15, com $R = \dfrac{[\mathrm{SNAP}]_o}{[\mathrm{FeP}]_o}$ e $C = [\mathrm{SNAP}]_o - [\mathrm{FeP}]_o$

$$F = F_f \frac{R(\exp Ckt - 1)}{R \exp Ckt - 1} \tag{5.15}$$

A Eq. 5.15 é a Eq. 5.14 multiplicada pelo fator constante $F_f$ (fração final de porfirina nitrosilada). A Eq. 5.15 foi ajustada aos dados experimentais da variação fracionária de absorção ($\Delta A/\Delta A_{max}$) nas Figs. 5.3 e 5.7, para $FeTPPS_4$ e FeTMPyP, respectivamente, onde $F_f$ e $k$ foram os parâmetros de ajuste. Para ajuste com essa expressão não foi necessário limitar os pontos experimentais aos primeiros instantes da reação. As curvas resultantes do ajuste aparecem na Fig. 5.9. Os valores para $F_f$ são apresentados ao fim do ajuste computacional aos pontos experimentais apresentados nas Figs. 5.2 e 5.6.

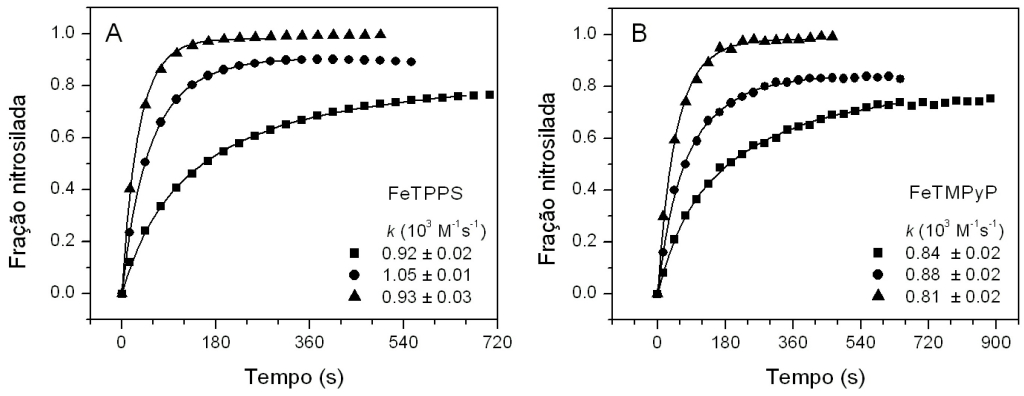



Figura 5.9.

Fração de porfirinas nitrosiladas. (A) $FeTPPS_4$ 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.

O valor da constante cinética de nitrosilação $k$ foi encontrado, para as duas porfirinas, a partir dos valores ajustados para as três diferentes concentrações de SNAP ( $k_{TMPyP} = 0{,}84 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$ and $k_{TPPS4} = 0{,}97 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$). A solução exata forneceu valores de 6 a 9% maiores que os valores aproximados das Seções 5.1.1 e 5.1.2, demonstrando que a aproximação exponencial utilizada não chega a ser ruim.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

### 5.1.4
### Mecanismo proposto para nitrosilação redutiva por SNAP (ou qualquer RSNO)

Ao contrário do que ocorre com NO gasoso, as Fe-porfirinas sofrem nitrosilação por SNAP em ambiente aeróbico. Além disso, de acordo com o esquema da Fig. 2.17, são necessárias duas moléculas de NO para produzir NOFe(II)-porfirina através de reação com gás NO: a primeira forma o complexo NOFe(III)-porfirina que, quando hidrolisado produzindo $NO_2^-$, reage prontamente com outra molécula de NO. A reação com SNAP, no entanto, produz NOFe(II)-porfirina com uma estequiometria de 1:1, conforme os resultados apresentados acima. Apenas uma molécula de SNAP é necessária para formar o complexo NOFe(II)-porfirina. Isso sugere fortemente que há uma tranferência, não de NO, mas de $NO^-$ para a porfirina férrica, o que contraria a idéia usualmente aceita na literatura de que SNAP é um doador de $NO^+$ (ou libera NO através da reação 2 RSNO → RS-SR + 2 NO).

O mecanismo pelo qual SNAP nitrosila ferro-porfirinas não foi ainda descrito. Recentemente, (Tao & English, 2004) propuseram a Eq (5.16)

$$GSNO + H_2O \leftrightarrow GSOH + NO^- + H^+ \qquad (5.16)$$

como uma reação intermediária para a formação de GS(O)GS onde G é glutationa. Na reação (5.16), a hidrólise de GSNO gera GSOH e $HNO/NO^-$. Uma evidência da formação de $HNO/NO^-$ foi observada após a completa conversão da meta-hemoglobina em $(NO)Fe^{II}Hb$ em presença de dimedona, que reage especificamente com GSOH. Baseados nessa observação de que S-nitrosotióis podem dar origem a $HNO/NO^-$, ainda que o equilíbrio da reação 5.16 encontre-se deslocado para a direita, propomos o mecanismo ilustrado na Fig. 5.11 para a nitrosilação redutiva de porfirinas férricas por SNAP.

Inicialmente, a ferro porfirina no estado férrico, Fe(III)P, tem como ligante na sexta posição de coordenação uma molécula de água. Se essa molécula for responsável pela hidrólise do S-nitrosotiol, pode haver a rápida transferência de $NO^-$ para a sexta posição de coordenação da Fe(III)P, ainda que o tempo de vida de $NO^-$ seja muito reduzido. Essa hidrólise produziria a formação do ácido sulfênico derivado do SNAP com liberação de um $H^+$. A molécula de $NO^-$

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

transferida para a sexta posição de coordenação do Fe(III) promove a imediata redução do átomo de ferro para Fe(II) e a quebra da eventual ligação do ligante trans.

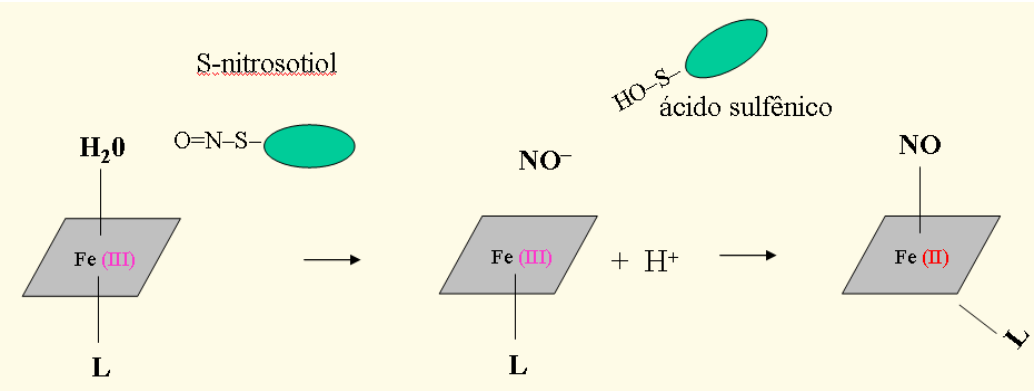



Figura 5.10
Mecanismo proposto para nitrosilação redutiva por SNAP (ou qualquer RSNO).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

## 5.2
## Estudo da nitrosilação por ressonância paramagnética eletrônica

Procedeu-se em seqüência aos resultados de absorção ótica uma avaliação da nitrosilação das porfirinas de ferro utilizando-se EPR. Foi feito um estudo do sinal de EPR das Fe(III)-P em função do pH. Em seguida realizou-se um estudo da nitrosilação dessas porfirinas em pH 5.0 e 8.0. Todos os espectros apresentados foram obtidos com as amostras congeladas em nitrogênio líquido, 77 K.

A Fig. 5.11 mostra os espectros de EPR das Fe(III)-P na região de $g \approx 6$ (spin alto), para amostras em vários valores de pH.

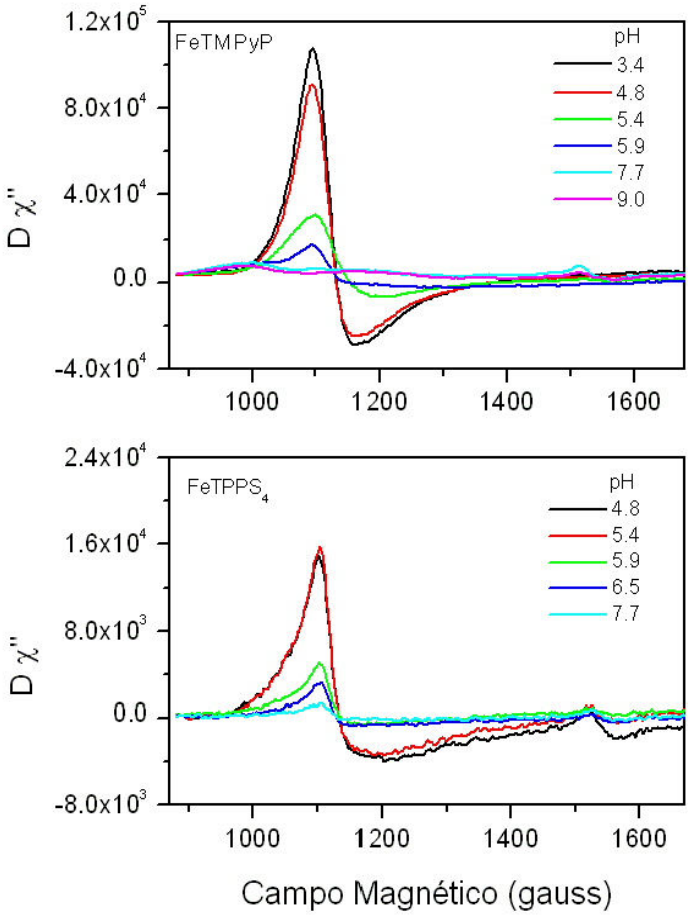



Figura 5.11

Espectro de EPR de FeTMPyP e $FeTPPS_4$ (100μM) em tampão universal 66mM em vários valores de pH. Região do FeIII, spin alto, a $77^0$K.

Observa-se que o sinal de Fe(III)TMPyP é bem mais intenso do que o de Fe(III)-$TPPS_4$. Quando o pH aumenta o sinal diminui para ambas porfirinas. Isso é atribuído à formação de dímeros, que leva a um acoplamento antiferromagnético dos spins (Gandini et al., 2003). Para pH em torno de 8.0 existe uma predominância de espécies diméricas. Desta forma um sinal realmente baixo de EPR é absolutamente compreensível e atribuído a monômeros presentes na solução (Maiti et al., 1996). Os resultados da Fig. 5.11 estão em concordância com resultados mais detalhados de EPR em 4K para a Fe(III)TMPyP (Gandini et al., 2003). Nota-se ainda um sinal em g = 4.27, associado à distorção rômbica, provavelmente proveniente de alguma impureza da amostra.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

A Fig. 5.12 mostra a variação da amplitude do sinal em g ≈ 6 em função do pH. Os pontos foram ajustados com a equação de Henderson-Hasselbalch e foram obtidos os valores de pK de 5.2 para FeTMPyP e 5.7 para $FeTPPS_4$.

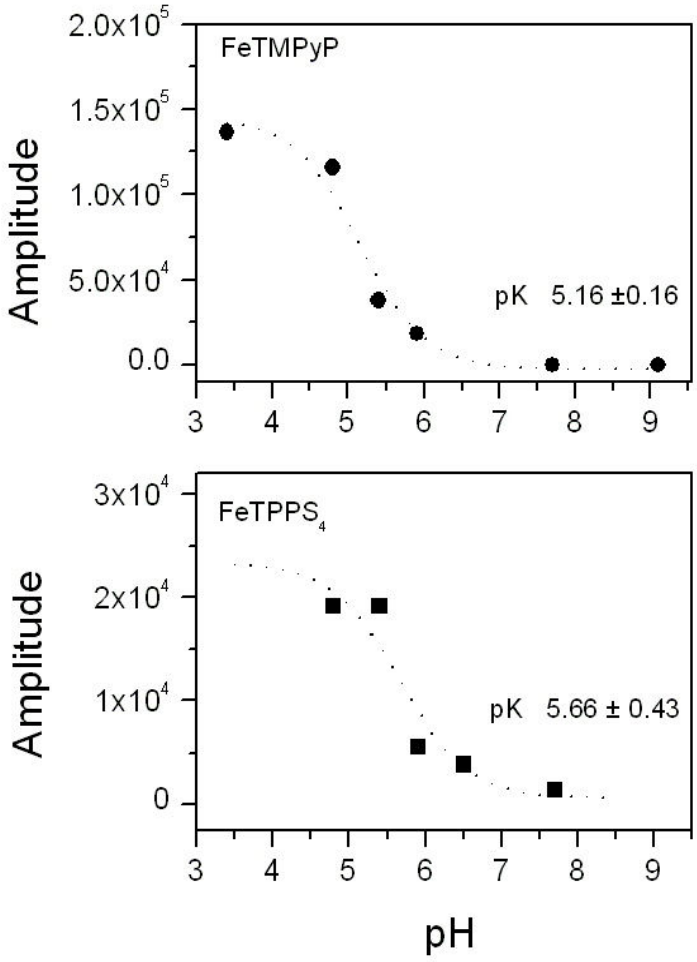



Figura 5.12
Variação da intensidade do sinal de EPR de Fe(III)P, spin alto, em função do pH.

A titulação por absorção ótica da $Fe(III)TPPS_4$ em concentrações micro molares e tampão acetato fosfato, forneceu um pK em torno de 8.0 (Gandini et al., 2001). Este valor não muda com mudanças no tampão e Yushmanov et al. (1996) encontraram o mesmo valor. Esses valores de pK encontrados são próximos aos que publicamos (Vilhena & Louro, 2003), mostrando que a diferença de tampão não implica em mudanças significativas dos valores de pK. Porém, em concentrações milimolares utilizadas em EPR, Gandini et al. (2003), titulando a Fe(III)TMPyP em tampão acetato fosfato encontraram um valor de pK semelhante aos encontrados por nós, em torno de 5.0, tendo associando este valor ao

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

aparecimento da espécie $H_2O$-FeP-$OH^-$. Esses resultados sugerem que o aumento de concentração, implica em deslocamento dos valores de pK para valores mais altos (Vilhena & Louro, 2003).

Em seguida são apresentados os resultados de nitrosilação de Fe(III)$TPPS_4$ e Fe(III)TMPyP por SNAP em pH 5 e 8. Nesses experimentos, alíquotas de SNAP foram adicionadas à solução de porfirina 100 μM previamente desoxigenada e, em tempos determinados, alíquotas de 100 μl foram retiradas, transferidas anaerobicamente para os porta-amostras descritos em Materiais e Métodos e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram transferidas para o criostato com nitrogênio líquido para obtenção dos espectros de EPR a 77 K.

Os espectros de EPR de amostras resultantes da nitrosilação por SNAP em pH 5 e 8 são apresentados na Fig. 5.13, para Fe$TPPS_4$ e Fig. 5.14 para FeTMPyP, na região de $g \approx 2$. Os espectros são característicos de NO-Fe(II)-porfirinas.

O espectro de NO-Fe$TPPS_4$ (Fig. 5.13) é bastante isotrópico, centrado em $g = 2{,}050$, exceto pela presença da estrutura hiperfina de três linhas, devido à interação do elétron desemparelhado com o núcleo do átomo de nitrogênio do NO, centradas em $g = 2{,}015$. O espectro de NO-FeTMPyP (Fig. 5.14) é muito mais anisotrópico do que o de Fe$TPPS_4$ e apresenta estrutura hiperfina bem mais resolvida apenas na região de campo alto ($g_3$) centrada em $g = 2.0146$. Os espectros da NO-Fe$TPPS_4$ são similares ao de NO-Fe(II)TPP pentacoordenado em tolueno porém, com a estrutura hiperfina muito menos resolvida (Praneeth et al. 2005). As diferenças entre os espectros das porfirinas aniônica e catiônica indicam diferentes simetrias locais e diferentes ângulos de ligação entre Fe–N–O.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

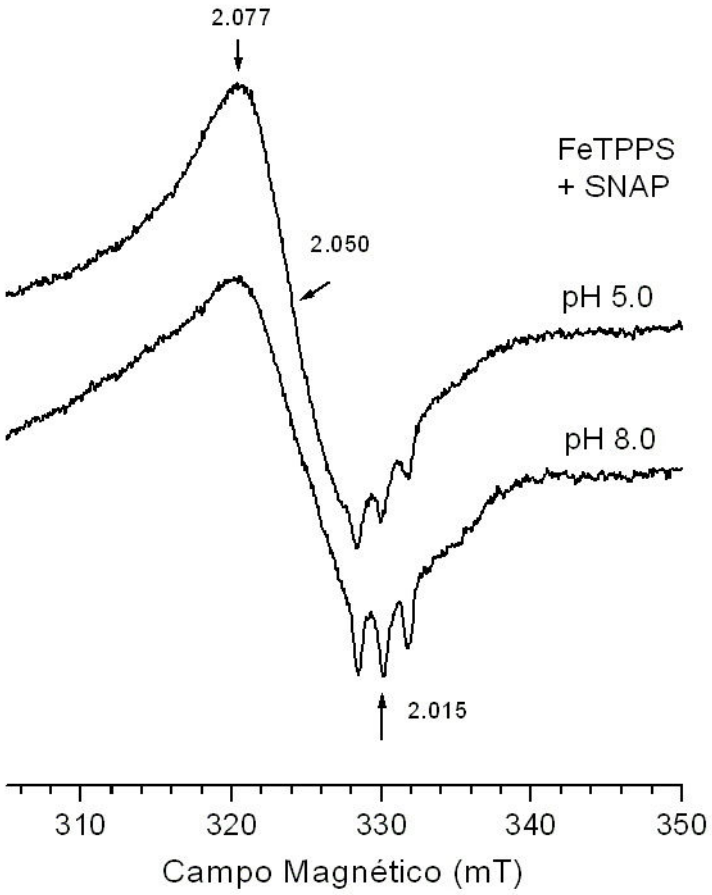



Figura 5.13

Espectros de EPR a $77^0$K de NO-Fe(II)$TPPS_4$ formado por reação de Fe(III)$TPPS_4$ (100μM) com SNAP (400μM), em tampão universal 66mM (A) pH 5.0; (B) pH 8,0.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

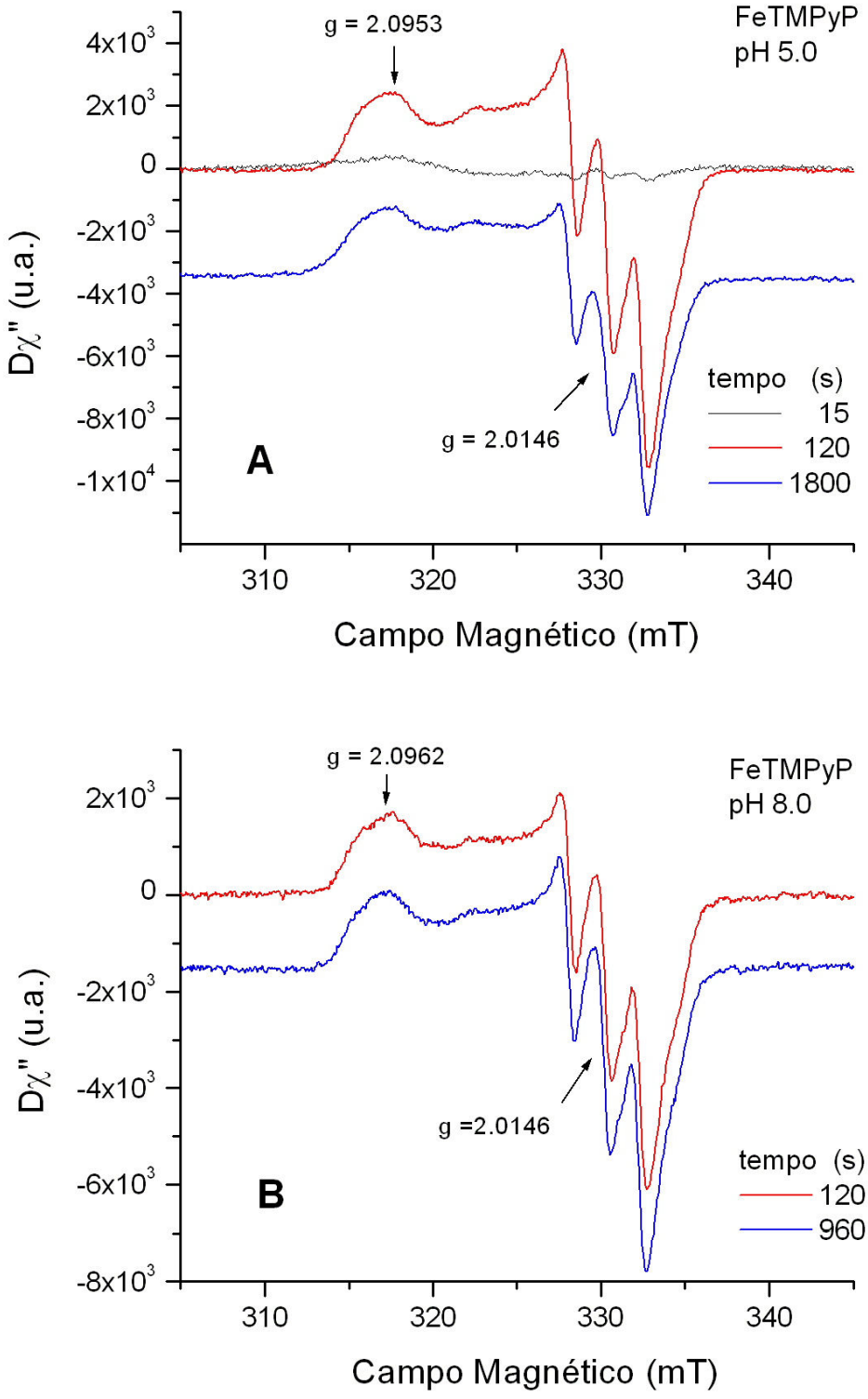



Figura 5.14

Espectros de EPR a $77^0$K 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.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

A Fig. 5.15 apresenta a variação das intensidades dos sinais de EPR correspondentes a FeTMPyP em sua reação com óxido nítrico como função do tempo. Verificamos então que, em concentrações de 100 μM de porfirina, a cinética de nitrosilação foi muito mais rápida do que nas concentrações utilizadas em espectrofotometria (~10 μM), como esperado, e os intervalos de tempo necessários para preparar as amostras não permitiu estudar por EPR a cinética de formação dos complexos formados pela reação com SNAP, mesmo em pH 8.0. Já nos primeiros três minutos a reação estava praticamente completa.

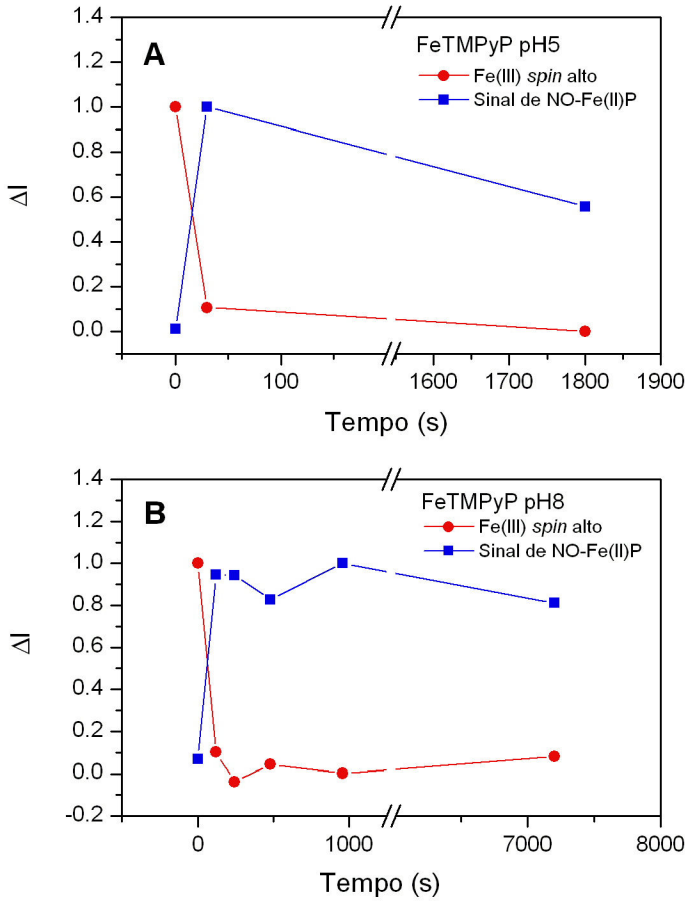



Figura 5.15
Nitrosilação da ferro-porfirinas FeTMPyP em (A) pH 5.0 e (B) pH 8.0. Os gráficos representam a amplitude dos espectros de EPR de Fe(III)P e de NO-Fe(II)P em função do tempo de reação com SNAP.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

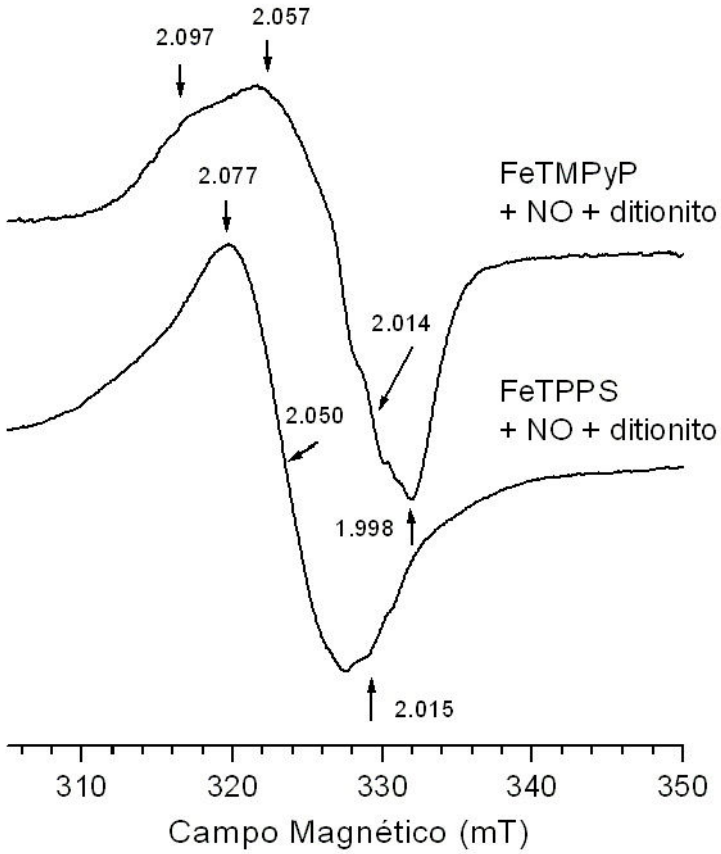



Figura 5.16

Espectros de EPR a $77^0$K de NO-Fe(II)TMPyP e NO-Fe(II)$TPPS_4$ formados por reação de Fe(III)TMPyP (100μM) com gás NO em excesso + ditionito. (Tese de mestrado: da Silva, 1999)

A Fig. 5.16 apresenta o espectro de ambas NO-Fe(II)P obtidos por adição de ditionito após a injeção de NO gasoso em amostras desoxigenadas de porfirinas (da Silva, 1999). Foi observado que os parâmetros de EPR (como os valores de g e a localização da estrutura hiperfina) são os mesmos que os das Figs. 5.13 e 5.14, porém as estruturas hiperfinas não são bem resolvidas. Imai et al. (2004) também obtiveram um espectro de EPR mal resolvido para a porfirina catiônica solúvel tratada com NO gasoso. Uma possível explicação para a diferença de resolução da estrutura hiperfina dos complexos formados no tratamento com SNAP seria uma diferença no estado de agregação das porfirinas.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

## 5.3
## Estudo da Cinética de nitrosilação por SNAP em ambiente aeróbico

Como já previamente publicado (Vilhena e Louro, 2004), a evolução temporal do espectro de absorção ótica para ambas FeTMPyP e $FeTPPS_4$ em presença do doador de óxido nítrico SNAP, foi medida em tampão e na presença de micelas em ambientes desoxigenados. Nossa investigação foi realizada em valores de pH 5.0, onde há predominância de ferro-porfirinas na forma monomérica, e pH 8.0, onde há predominância de espécies μ-oxo diméricas (Gandini et al., 2003). No presente trabalho, para avaliar a infuência do oxigênio na nitrosilação de ambas as formas das Fe-porfirinas (monoméricas e diméricas), foi realizado o estudo da nitrosilação por SNAP em ambiente oxigenado, na ausência de detergentes. É importante mencionar que o gás NO não é capaz nitrosilar Fe-porfirinas em presença de oxigênio.

A cinética da nitrosilação das Fe-porfirinas foi acompanhada por um gráfico de variação de absorbância normalizada versus tempo, construído partindo-se da evolução temporal dos espectros de absorção ótica. As variações, $\Delta A$, foram calculadas para cada instante após a adição de SNAP e normalizadas à máxima variação $\Delta A_{máx}$ em cada comprimento de onda. Em seguida, para diminuir o erro experimental, foi realizada a média das variações fracionárias ($\Delta A/ \Delta A_{máx}$) nos vários comprimentos de onda escolhidos. Observou-se que os desvios em relação à média eram pequenos.

Os gráficos de ($\Delta A/ \Delta A_{máx}$) em função do tempo encontram-se na Fig. 5.17 e representam o processo de nitrosilação da $FeTPPS_4$ e da FeTMPyP em tampão na ausência (símbolos cheios) e na presença (símbolos vazados) de oxigênio. O decréscimo dos valores de ($\Delta A/ \Delta A_{máx}$) estão associados à nitrosilação redutiva de Fe(III)P para NO-Fe(II)P. Na ausência de oxigênio, a cinética de nitrosilação é muito mais lenta para dímeros (B) do que para monômeros (A) e apresenta um comportamento bifásico. Este foi interpretado como devido à quebra da ponte de oxigênio, que ocorre pela ligação do NO ao átomo de ferro de uma das porfirinas (Vilhena e Louro, 2004).

Na presença de oxigênio (símbolos vazados na Fig. 5.17), observa-se um decréscimo inicial de ($\Delta A/ \Delta A_{máx}$), indicando formação das porfirinas nitrosiladas,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

seguido de um aumento destes valores, uma tendência de retorno aos valores iniciais. Esse aumento pode ser interpretado como o ataque das porfirinas nitrosiladas por $O_2$, resultando em um retorno ao estado Fe(III)P devido à presença de oxigênio, gerando provavelmente nitrato:

$$NO\text{-}Fe(II)P + O_2 \rightarrow Fe(III)P + NO_3^- \quad (5.16)$$

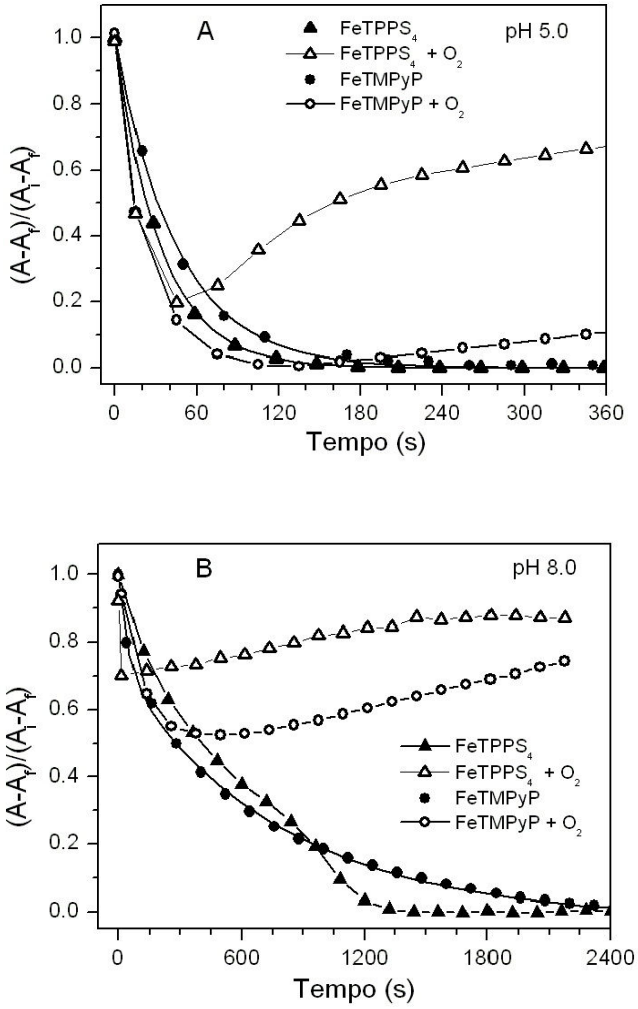



Figura 5.17

Cinética de nitrosilação da $FeTPPS_4$ 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.

Na Fig. 5.17 A, relativa a pH 5,0, observa-se que a FeTMPyP monomérica (círculos vazados) é praticamente toda nitrosilada antes do ataque por oxigênio. A recuperação do valor de ($\Delta A/\Delta A_{máx}$) é lenta. Já a $FeTPPS_4$ (triângulos vazados)

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

apresenta um comportamento bifásico para o ataque por $O_2$. A nitrosilação chega a atingir 80%, mas há uma fase inicial mais rápida de ataque, com tempo característico de cerca de $1,5 \times 10^2$ s, seguida de uma fase lenta semelhante à da FeTMPyP. Conclui-se que a NO-FeTMPyP é bem mais estável do que a NO-$FeTPPS_4$ em ambiente aeróbico. Na Fig. 5.17 B, em pH 8,0, observa-se também a maior estabilidade de NO-FeTMPyP em relação a NO-$FeTPPS_4$, mas como a nitrosilação de dímeros é bem mais lenta a porcentagem de porfirina nitrosilada atinge pouco menos de 50% para a FeTMPyP e 30% para a $FeTPPS_4$.

O ataque por $O_2$ foi também investigado partindo-se de amostras previamente nitrosiladas por SNAP em ambiente anaeróbico. Após nitrosilação abria-se a cubeta, uniformizava-se por inversão e registrava-se a evolução temporal dos espectros de absorção. A Fig. 5.18 mostra os resultados desses experimentos com FeTMPyP e $FeTPPS_4$.

Em pH 5,0 (Fig.5.18 A) a análise leva a conclusões semelhantes ao do experimento da Fig. 5.17 A: a NO-FeTMPyP é bem mais estável do que a NO-$FeTPPS_4$ em ambiente aeróbico. Em pH 8,0 o processo de ataque de NO-FeP por oxigênio fica bem mais claro partindo-se da amostra nitrosilada em ambiente anaeróbico (Fig. 5.18 B) do que em ambiente aeróbico (Fig. 5.17 B). Observa-se, na Fig. 5.18 B, um ataque monofásico à NO-FeTMPyP enquanto que à NO-$FeTPPS_4$ o ataque apresenta pelo menos duas fases. No entanto, em aproximadamente 40 min 80% das duas porfirinas voltam ao estado Fe(III)P.

Foi verificado anteriormente que a reação de nitrosil-mioglobina com $O_2$ é muito mais lenta do que a reação de oxi-mioglobina com NO, ainda que ambas produzam metMb e nitrato (Ford e Lorkovic, 2002; Andersen e Skibsted., 1992; Bruun-Jensen e Skibsted, 1996). Uma constante cinética $k_1 = 4.73 \times 10^{-5}$ $s^{-1}$ foi encontrada a 15° C (Bruun-Jensen e Skibsted, 1996). Esse valor corresponde a um tempo característico de $2.1 \times 10^4$ s, que é uma ordem de grandeza maior do que o da fase lenta de recuperação do espectro de Fe(III)P. Esse resultado não é surpreendente, já que em mioglobina a porfirina encontra-se bem mais protegida do que as porfirinas em solução estudadas por nós.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

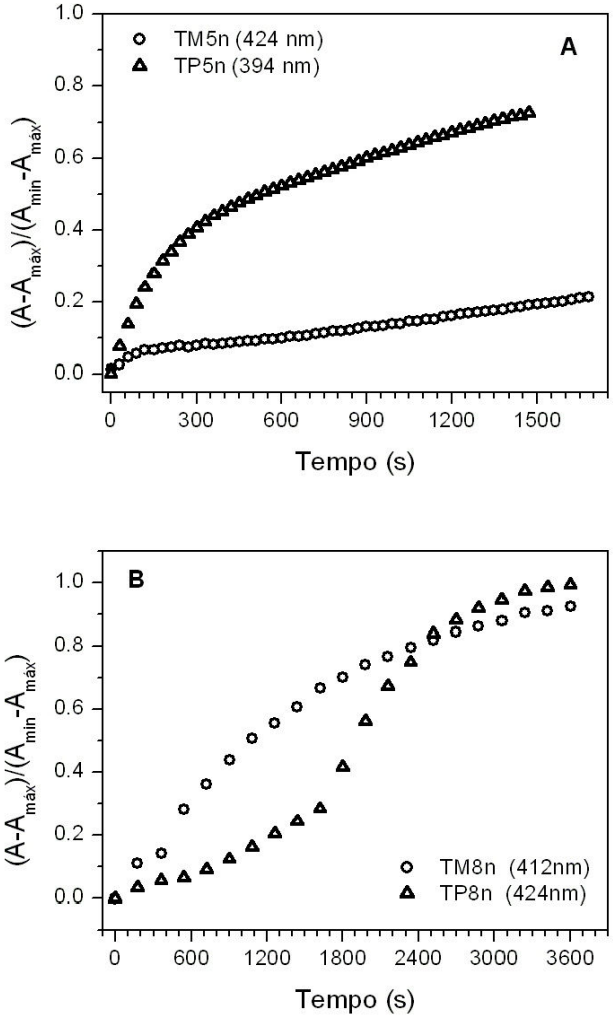



Figura 5.18

Cinética de nitrosilação da $FeTPPS_4$ 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, $FeTPPS_4$.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

## 5.4
## Influência de micelas na estabilidade de compostos nitrosilados

Em trabalho recente (Vilhena e Louro, 2004) verificou-se que micelas de detergentes com carga elétrica oposta à das porfirinas eram capazes de proteger as porfirinas da nitrosilação por SNAP. Nessa seção investigamos como a interação com as micelas influenciam as porfirinas já nitrosiladas, em particular, estudando seu ataque por $O_2$. Nesse estudo foram utilizadas as técnicas de absorção ótica e de EPR.

### 5.4.1
### Absorção ótica

Para determinar a influência das micelas negativa (SDS) e positivamente (CTAB) carregadas na proteção do ataque por oxigênio das porfirinas nitrosiladas, as porfirinas FeTMPyP e $FeTPPS_4$ eram previamente nitrosiladas por SNAP em ambiente anaeróbico. Posteriormente à adição de micelas, o espectro ótico era novamente registrado. Completadas essas etapas, as cubetas eram abertas e gentilmente invertidas permitindo a circulação de ar. Os espectros de absorção eram medidos em intervalos de tempo predeterminados. Pretende-se avaliar se as micelas são capazes de proteger as porfirinas nitrosiladas do ataque por oxigênio por comparação dos espectros.

#### Oxigenação de NO-$FeTPPS_4$ em micelas de CTAB

O ataque por $O_2$ da porfirina aniônica nitrosilada NO-$FeTPPS_4$ em presença de micelas catiônicas (CTAB) foi estudado em pH 5.0 e 8.0. Em ambos pHs a porfirina nitrosilada se apresenta na forma monomérica (Vilhena e Louro, 2004). Apresentaremos separadamente os resultados em pH 5.0 e em pH 8.0.

#### pH 5.0

Apresentam-se, na Fig. 5.19 A, os espectros de absorção ótica de FeTPPS4 em pH 5.0 antes e após nitrosilação por tratamento com SNAP na relação molar de 4:1. Após nitrosilação, o pico de absorção na Banda de Soret inicialmente em

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

394 nm desloca-se para 414 nm. Na banda Q, o pico de absorção inicialmente em 528 nm evolue para 542 nm.

Mudanças espectrais de NO-FeTPPS$_4$ decorrentes da adição do detergente catiônico CTAB são observadas na Fig. 5.19 B (1 e 2). O pico na banda de Soret decresce e alarga-se após a adição de CTAB, deslocando-se de 414 para 410 nm. A banda Q praticamente não se altera. Essa figura também mostra o espectro obtido logo após exposição ao ar (3). Observa-se que a forma do espectro não muda porém, a amostra fica bastante turva o que provoca o espalhamento observado como uma elevação não uniforme da linha de base. Essa turbidez foi associada à formação de algum óxido de nitrogênio, gasoso, que provocou minúsculas bolhas no detergente, já que quando a amostra era submetida à centrifugação voltava a ficar límpida, sem formação de precipitado.

Mudanças espectrais foram observadas em função do tempo de exposição ao oxigênio (Fig. 5.19 C). Após 2 horas de oxigenação ocorreu uma mudança no pico de absorção de 410 para 416 nm na banda de Soret e os picos da banda Q tornaram-se largos e indefinidos. Na Fig. 5.19 D pode-se comparar o espectro final, obtido após cessarem as variações provocadas por $O_2$, ao espectro de Fe(III)TPPS$_4$ em presença de CTAB em pH 5.0. Os dois espectros são muito diferentes, indicando que a reação de $O_2$ com NO-FeTPPS$_4$ não produz Fe(III)TPPS$_4$ e nitrato, mas que espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio devem atacar a porfirina comprometendo sua integridade.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

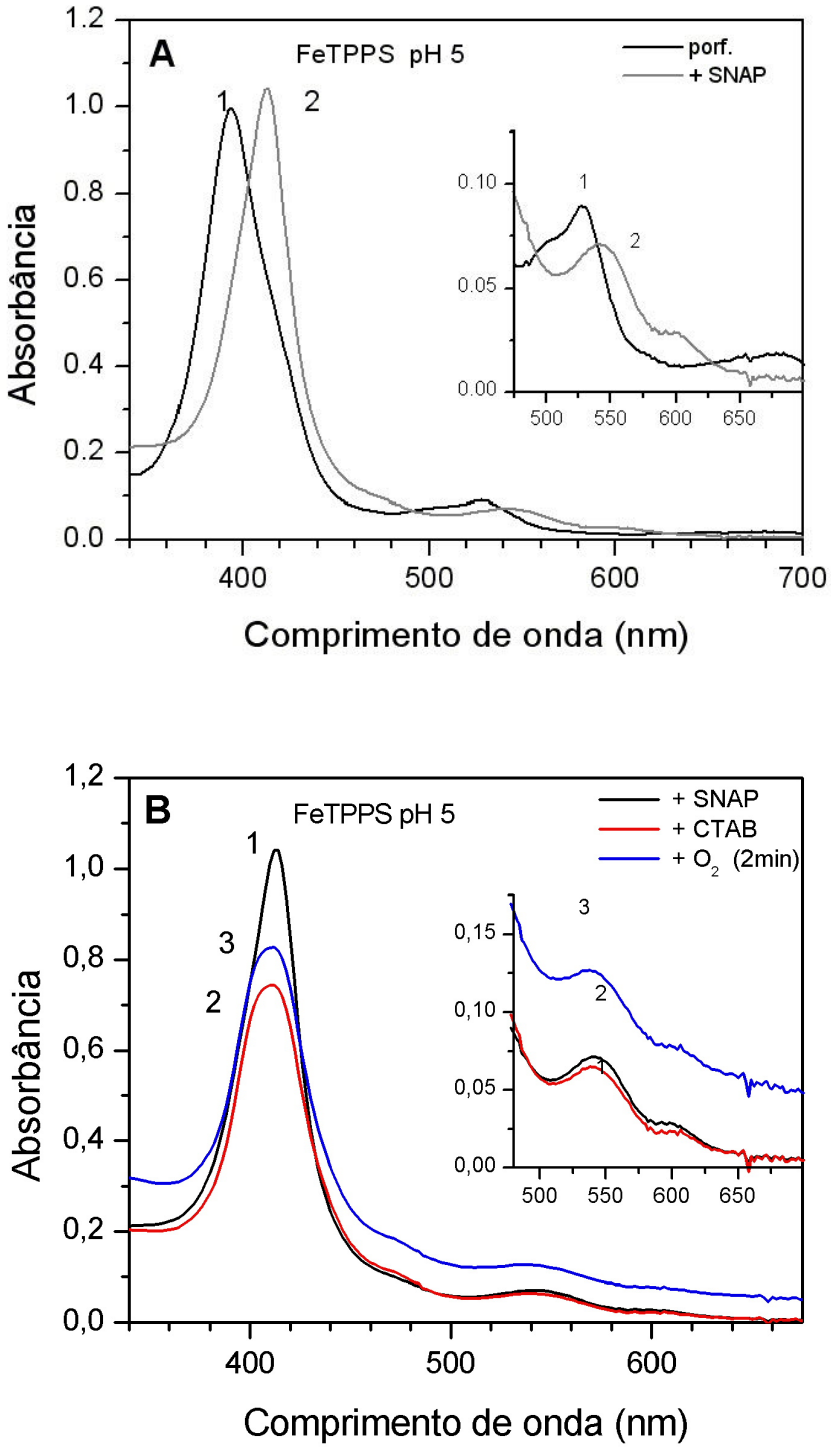



Figura 5.19 (A, B)

Espectros óticos de NO-$FeTPPS_4$ (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).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

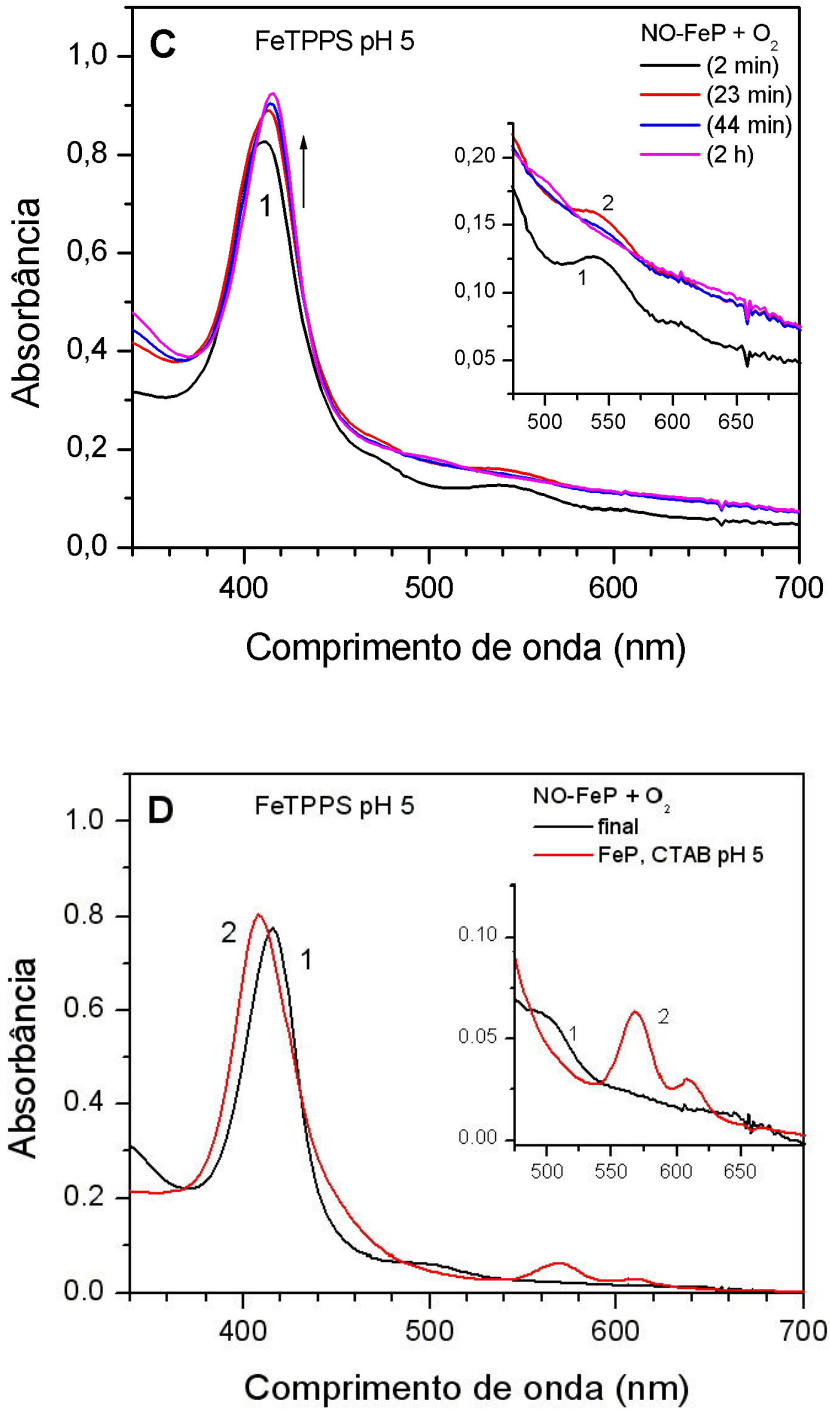



Figura 5.19 (C, D)

Espectros óticos de NO-FeTPPS$_4$ (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 $O_2$ (1) e o de porfirina em CTAB, pH 5.0 (2) .

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

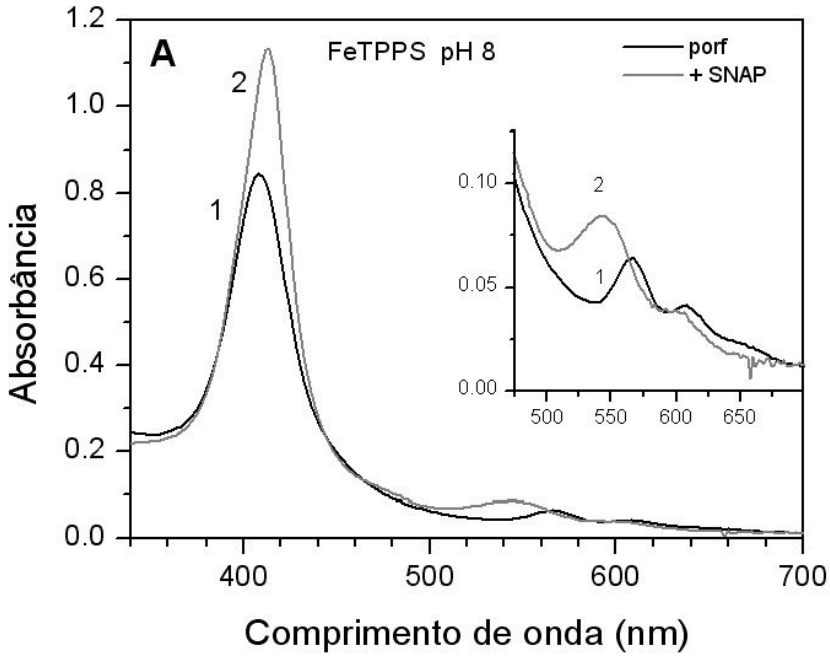
**pH 8.0**

Apresentam-se, na Fig. 5.20 A, os espectros de absorção ótica de $FeTPPS_4$ em pH 8.0 antes e após nitrosilação por tratamento com SNAP na relação molar de 4:1. Após nitrosilação, o pico de absorção na Banda de Soret, inicialmente em 408 nm, aumenta e desloca-se para 414 nm. Na banda Q, os picos de absorção inicialmente em 566 e 608 nm evoluem para novos picos em 542 e 600 nm, característicos de $NO\text{-}FeTPPS_4$. É interessante ressaltar que os espectros de absorção de $NO\text{-}FeTPPS_4$ em pH 8.0 e em pH 5.0 são idênticos, implicando na mesma espécie nitrosilada resultante.

As mudanças espectrais de $NO\text{-}FeTPPS_4$ decorrentes da adição do detergente catiônico CTAB, observadas na Fig. 5.20 B (1 e 2), são iguais às obtidas em pH 5.0 (Fig. 5.19 B). O espectro (3) obtido logo após exposição ao ar (Fig. 5.20 B), no entanto, apresentou em pH 8.0 um espalhamento muito menor do que em pH 5.0. Isso indica que em pH mais alto forma-se menos do óxido de nitrogênio responsável pelo surgimento de micro-bolhas.

As mudanças espectrais observadas em função do tempo de exposição ao oxigênio são apresentadas na Fig. 5.20 C. Após 4 horas de oxigenação ocorreu uma mudança no pico de absorção de 410 para 416 nm na banda de Soret e os picos da banda Q, apesar de mais alargados, evoluíram para 566 e 608 nm. Na Fig. 5.20 D pode-se comparar o espectro final, obtido após cessarem as variações provocadas por $O_2$, ao espectro de $Fe(III)TPPS_4$ em presença de CTAB em pH 8.0. Apesar da diferença, observa-se especialmente na Banda Q uma tendência de recuperação parcial do espectro de $Fe(III)TPPS_4$ após reação com $O_2$. Essa recuperação pode estar associada à menor quantidade de bolhas, ou seja, menos espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA



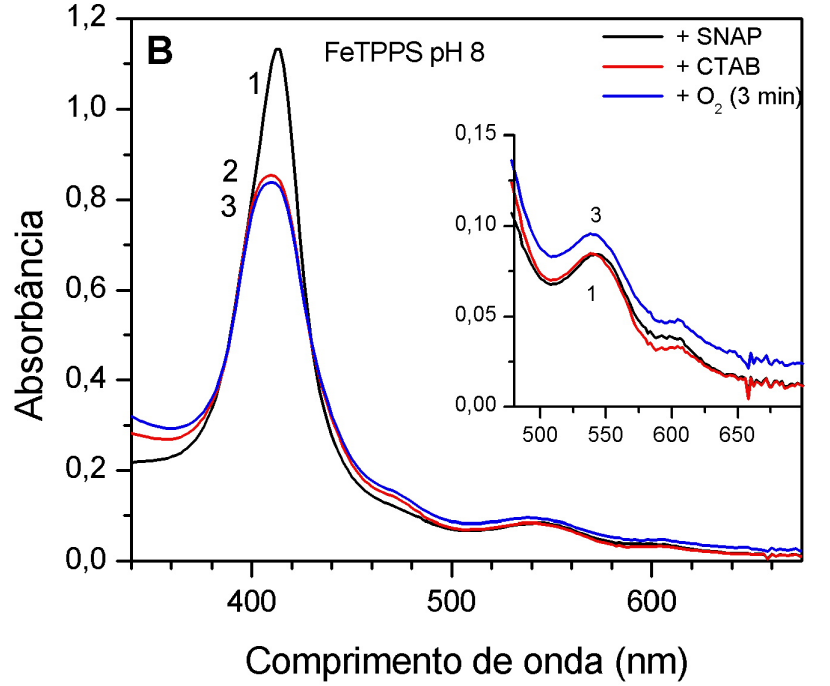
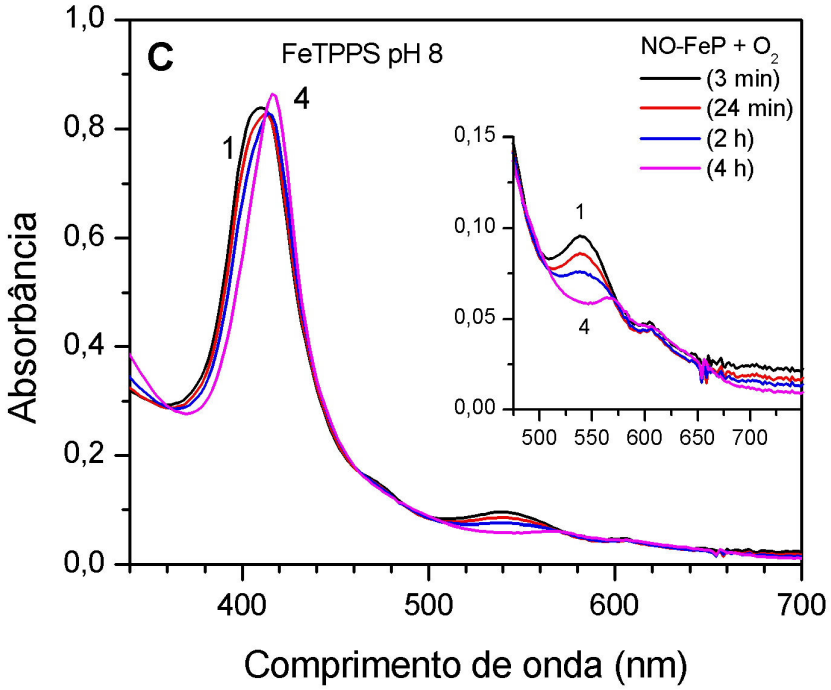




Figura 5.20 (A, B)

Espectros óticos de NO-FeTPPS$_4$ (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).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA



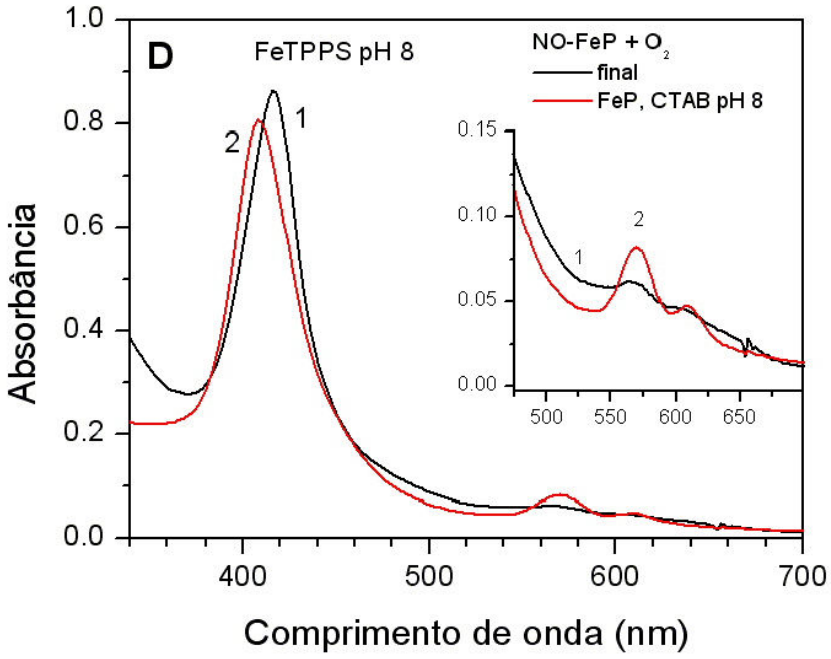




Figura 5.20 (C, D)

Espectros óticos de NO-FeTPPS$_4$ (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 $O_2$ (1) e o de porfirina em CTAB, pH 8.0 (2).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Tabela 1

Comprimentos de onda dos picos de absorção ótica de $FeTPPS_4$ em tampão, após adição de SNAP, na presença de CTAB, em ambiente oxigenado e para a $FeTPPS_4$ em detergente catiônico CTAB (controle).

| $FeTPPS_4$ | Banda de Soret (nm) | | Bada Q (nm) | |
|---|---|---|---|---|
| | pH 5.0 | pH 8.0 | pH 5.0 | pH 8.0 |
| Tampão | 394 | 408 | 528 | 566 |
| NO-$FeTPPS_4$ | 414 | 414 | 540 | 540 |
| + CTAB | 410 | 410 | 540 | 540 |
| + $O_2$ | 416 | 416 | _____ | 570 |
| $FeTPPS_4$-CTAB (controle) | 408 | 408 | 568 | 570 |

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**Oxigenação de NO-FeTMPyP em micelas de SDS**

O ataque por $O_2$ da porfirina catiônica nitrosilada NO-FeTMPyP em presença de micelas aniônicas (SDS) foi estudado em pH 5.0 e 8.0. Em ambos pHs a porfirina nitrosilada se apresenta na forma monomérica (Vilhena e Louro, 2004). Apresentaremos separadamente os resultados em pH 5.0 e em pH 8.0.

**pH 5.0**

Os espectros de absorção ótica de FeTMPyP em pH 5.0 antes e após nitrosilação por tratamento com SNAP na relação molar de 4:1 são apresentados na Fig. 5.21 A. As mudanças espectrais da FeTMPyP em tampão após a completa nitrosilação por SNAP são as seguintes. Surge um pico de absorção em 424 nm na banda de Soret e na banda Q, o pico em 500 e 630 nm desaparece e surge um novo pico de absorção em 552 nm. Mudanças espectrais de NO-FeTMPyP decorrentes da adição do detergente aniônico SDS são observadas na Fig. 5.21 B (1 e 2). O pico na banda de Soret decresce e desloca-se para 430 nm, enquanto a banda Q praticamente não se altera, deslocando-se cerca de 2 nm para o vermelho.

Essa figura também mostra o espectro obtido logo após exposição ao ar (3). Observa-se que a forma do espectro não mudou porém o espalhamento provocou uma elevação não uniforme da linha de base, como ocorreu com a NO-FeTPPS$_4$ (Fig. 5.19 B). No entanto, não foram observadas mudanças espectrais em função do tempo de exposição ao oxigênio durante poucas horas, indicando um importante papel do detergente aniônico SDS na manutenção do complexo nitrosilado de porfirina. Para uma exposição mais longa, porém, foram observadas mudanças consideráveis (Fig. 5.21 C). O espectro evoluiu de (1) a (2) após três dias em refrigerador. A Banda de Soret passou de 430 nm para 424 nm e o pico da banda Q em 552 nm deslocou-se para 560 nm. A evolução da posição e da forma dos picos sugere uma tendência de retorno ao espectro de FeTMPyP em SDS pH 5.0 (3).

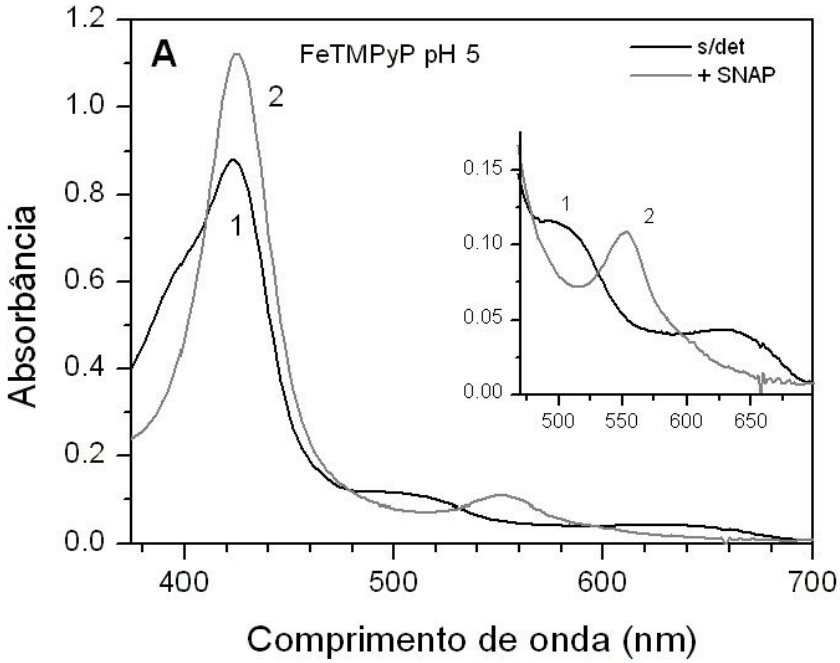
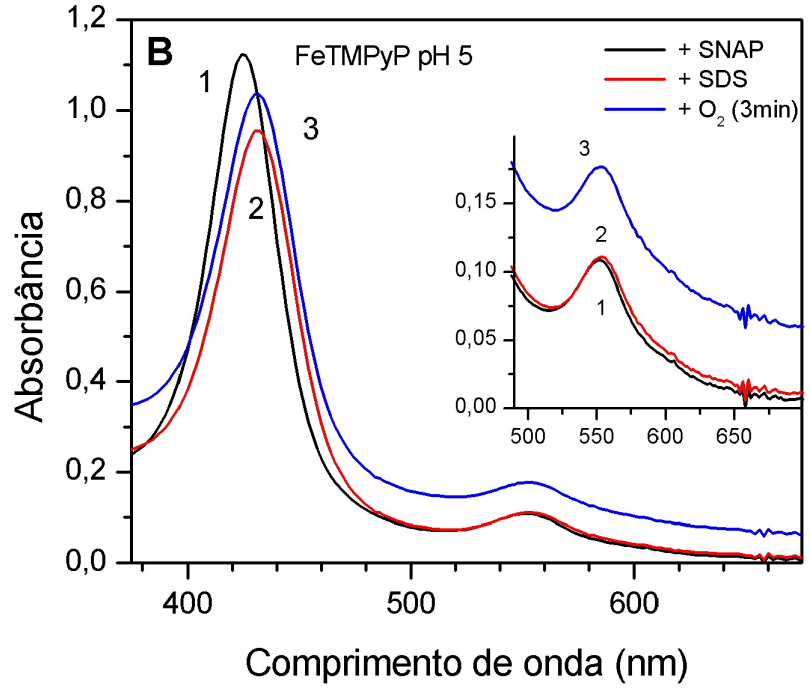



Figura 5.21 (A)

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

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA



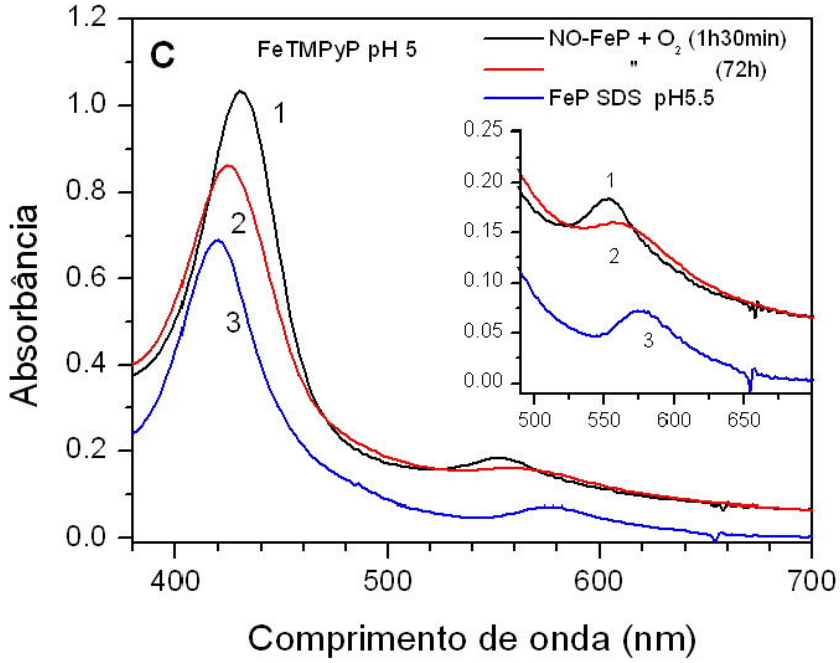




Figura 5.21 (B, C)

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).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**pH 8.0**

Os espectros de absorção ótica de FeTMPyP em pH 8.0 antes e após nitrosilação por tratamento com SNAP na relação molar de 4:1 são apresentados na Fig. 5.22 A. As mudanças espectrais da FeTMPyP em tampão após a completa nitrosilação por SNAP são as seguintes: o pico de absorção na banda de Soret, em 422 nm apresenta um aumento com pequeno deslocamento para 424 nm; na banda Q os picos em 590 e 630 nm desaparecem e dando origem ao pico único em 552 nm, característico da NO-FeTMPyP. Assim como para NO-FeTPPS$_4$, os espectros de absorção de NO-FeTMPyP em pH 5,0 e pH 8,0 são idênticos.

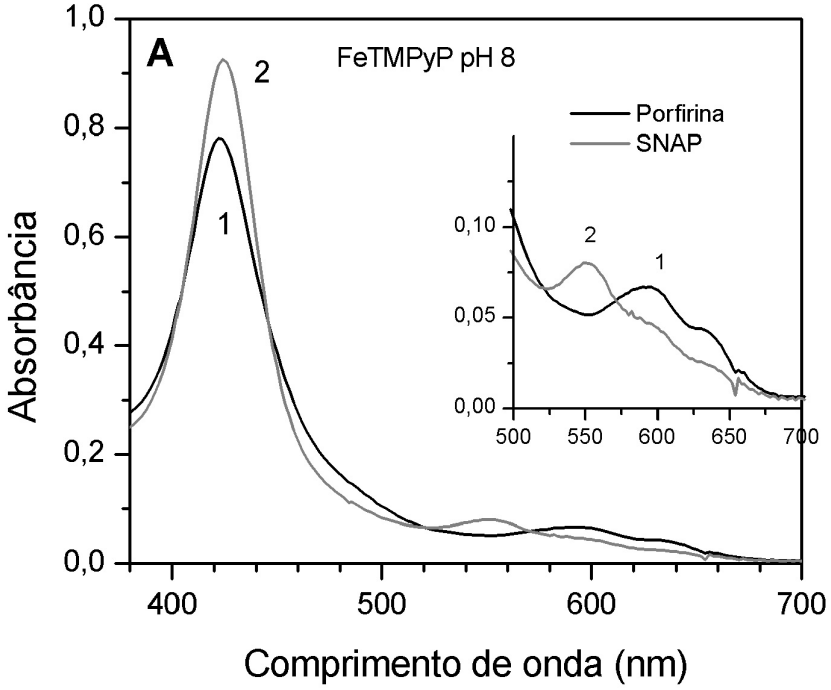
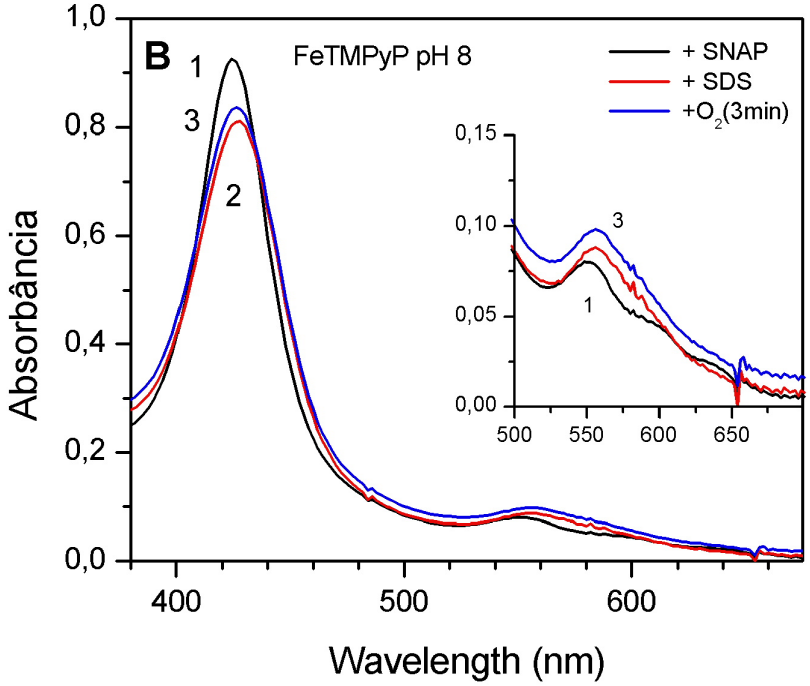



Figura 5.22 (A)

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

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA



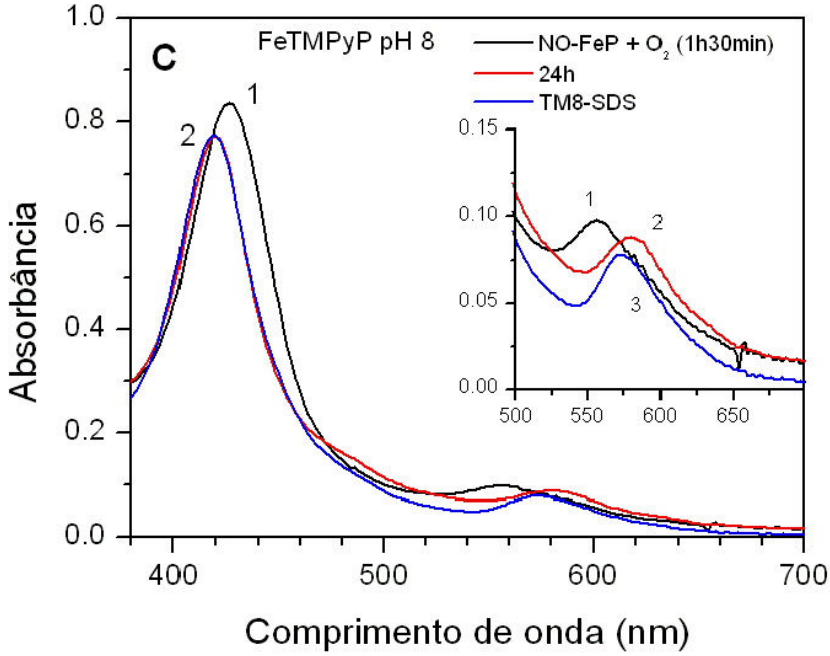




Figura 5.22 (B,C)

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).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Mudanças espectrais de NO-FeTMPyP decorrentes da adição do detergente aniônico SDS (Fig. 5.22 B, 1 e 2) são muito semelhantes às observadas em pH 5,0 (Fig. 5.21 B, 1 e 2). A Fig. 5.22 B também mostra o espectro obtido logo após exposição ao ar (3). Observa-se que a forma do espectro não mudou e que o espalhamento foi muito menor do que em pH 5,0. Também não houve mudanças espectrais em função do tempo de exposição ao oxigênio durante poucas horas, como em pH 5,0. Para uma exposição mais longa, de 24h (Fig. 5.22 C), o espectro evoluiu de (1) a (2). A Banda de Soret passou de 428 nm para 420 nm e o pico da banda Q em 552 nm deslocou-se para 580 nm. Comparando-se o espectro (2) com o espectro de FeTMPyP em SDS pH 5.0 (3) observa-se que o pico na Banda Q apresenta-se um pouco deslocado para o vermelho, mas que as bandas de Soret são idênticas. Isso sugere que o ataque de NO-FeTMPyP por $O_2$ produz majoritariamente a espécie Fe(III)TMPyP e somente após muitas horas.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Tabela 2

Comprimentos de onda dos picos de absorção ótica de FeTMPyP em tampão, após adição de SNAP, na presença de SDS, em ambiente oxigenado e para a $Fe^{+3}$TMPyP em detergente aniônico SDS (controle).

| FeTMPyP | Banda de Soret (nm) | | Banda Q (nm) | |
|---|---|---|---|---|
| | pH 5.0 | pH 8.0 | pH 5.0 | pH 8.0 |
| Tampão | 424 | 422 | 628 | 594 |
| NO-FeTMPyP | 424 | 424 | 552 | 552 |
| + SDS | 432 | 428 | 552 | 556 |
| + $O_2$ (24 h) | 424 | 420 | 558 | 580 |
| FeTMPyP+SDS (controle) | 418 | 420 | 576 | 576 |

## 5.4.2
## Ressonância paramagnética eletrônica

A influência de micelas iônicas na preservação do ataque por $O_2$ das Fe-porfirinas solúveis FeTMPyP e $FeTPPS_4$ nitrosiladas, foi investigada também pela técnica de EPR. As concentrações de porfirina (100 μM) e SNAP (400 μM) utilizadas foram cerca de dez vezes maiores do que as utilizadas nos experimentos de absorção, no entanto manteve-se a concentração de detergente em 20 mM, portanto, acima da concentração micelar crítica. Outra diferença da metodologia de EPR em relação à absorção ótica é a temperatura de obtenção dos espectros, 77 K. Apresentamos abaixo os resultados dessa investigação.

### $FeTPPS_4$ em micelas de CTAB

Os espectros de EPR de $Fe(III)TPPS_4$ foram obtidos a temperatura de 77 K, antes do tratamento com SNAP, em solução tampão universal em pH 5,0 e 8,0. Foi observado o sinal em $g \approx 6$, em pH 5,0 (análogo ao da Fig. 5.11). Esse sinal desapareceu totalmente após adição de SNAP. Em pH 8.0 a amplitude desse sinal já foi desprezível mesmo antes do tratamento com SNAP, devido ao estado dimérico das porfirinas.

A Fig. 5.23 mostra os espectros de EPR após tratamento com SNAP 4:1. A formação do complexo $NO\text{-}Fe(II)TPPS_4$ tanto em pH 5,0 como em pH 8,0 é demonstrada pela forma do espectro, característica de Fe-porfirinas nitrosiladas. Em particular, espectros bem semelhantes foram obtidos através de tratamento de $FeTPPS_4$ com gás NO seguido de adição de ditionito de sódio (nitrosilação redutiva) (da Silva, 1999). Observa-se que esse espectro é bastante isotrópico para a $NO\text{-}Fe(II)TPPS_4$, com $g_{iso}$= 2,047. No entanto, aparece na região de campo alto a estrutura hiperfina de três linhas centrada em $g = 2{,}017$, característica da interação com o núcleo de N, sugerindo que há uma espécie anisotrópica contribuindo para o sinal. É importante lembrar que espécies NO-Fe(III)P são diamagnéticas e portanto não apresentam sinal de EPR.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

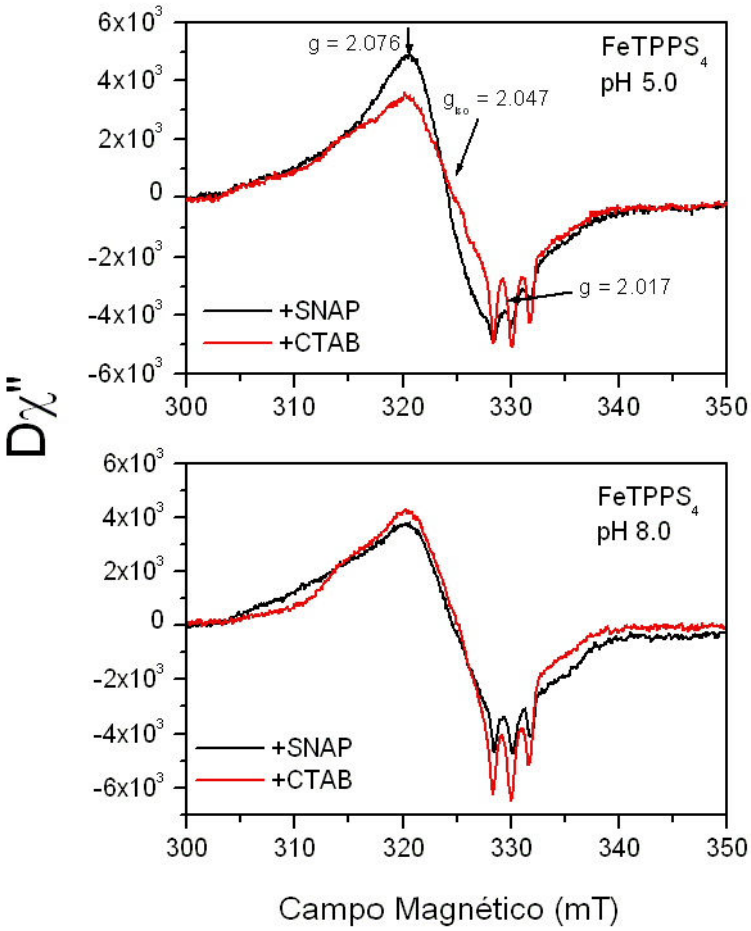



Figura 5.23

Espectro de EPR da $FeTPPS_4$ 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.

A Fig. 5.23 mostra também o espectro após adição do detergente catiônico CTAB. A interação com micelas desse detergente torna a estrutura hiperfina mais resolvida, indicando aumento na porcentagem de espectro anisotrópico. A diferença de intensidade, após a adição de detergente, não é significativa, já que pode ter havido variação na geometria e posição das diferentes amostras.

Nakagawa et al. (2003) observaram que o borbulhamento direto de NO em solução aquosa de $FeTPPS_4$ produzia NO-Fe(III)$TPPS_4$, já que o sinal de Fe(III)P spin alto desaparecia e não surgia sinal de NO-Fe(II)P. Verificaram também que o borbulhamento direto de NO em solução de $FeTPPS_4$ em metanol/água 9:1 produzia um espectro de EPR de NO-Fe(II)P. No entanto, o espectro apresentado

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

por esses autores é bem mais anisotrópico do que o obtido por nós (Fig. 5.23) e apresenta estrutura hiperfina bem mais resolvida.

**Oxigenação do complexo NO- Fe(III)TPPS$_4$ / CTAB**

A oxigenação por 3 minutos da porfirina nitrosilada em presença de CTAB implicou apenas em mudança espectral sutil em pH 5,0 (Fig. 5.24). Esta exposição inicial ao oxigênio não modifica o espectro isotrópico da NO-Fe(II)P centrado em g = 2.047, bem como é preservada a definição das linhas hiperfinas centradas em g = 2.017.

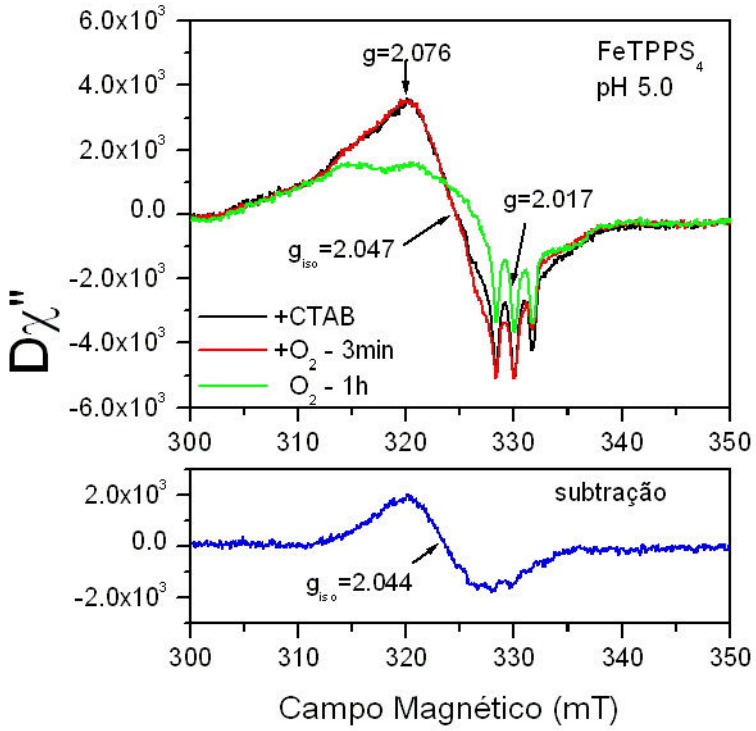



Figura 5.24

Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)TPPS$_4$ 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.

No entanto, após 1 hora de exposição, o espectro de EPR diminui em intensidade e se torna mais anisotrópico. Há um deslocamento do g no cruzamento da linha de base, de $g_{iso}$ = 2,047 para g = 2,038. Na busca das espécies consumidas durante oxigenação prolongada, fizemos uma subtração espectral entre os espectros antes e uma hora após exposição a $O_2$. O resultado dessa subtração é uma espécie com espectro de EPR bem isotrópico centrado em $g_{iso'}$ = 2,044,

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

indicando que essa espécie está bem mais acessível à ação do oxigênio do que as espécies com anisotropia alta. Essa última, provavelmente, está protegida pela interação com as micelas do detergente.

Em pH 8,0 (Fig. 5.25) a porfirina nitrosilada também apresenta, em CTAB, um espectro bastante isotrópico ($g_{iso}$= 2,047), mas com estrutura hiperfina centrada em g = 2,017. Como em pH 5,0, a oxigenação por 3 minutos implica em um pequeno decréscimo da intensidade deste sinal e após uma hora de exposição ao oxigênio, o espectro fica bem mais anisotrópico.

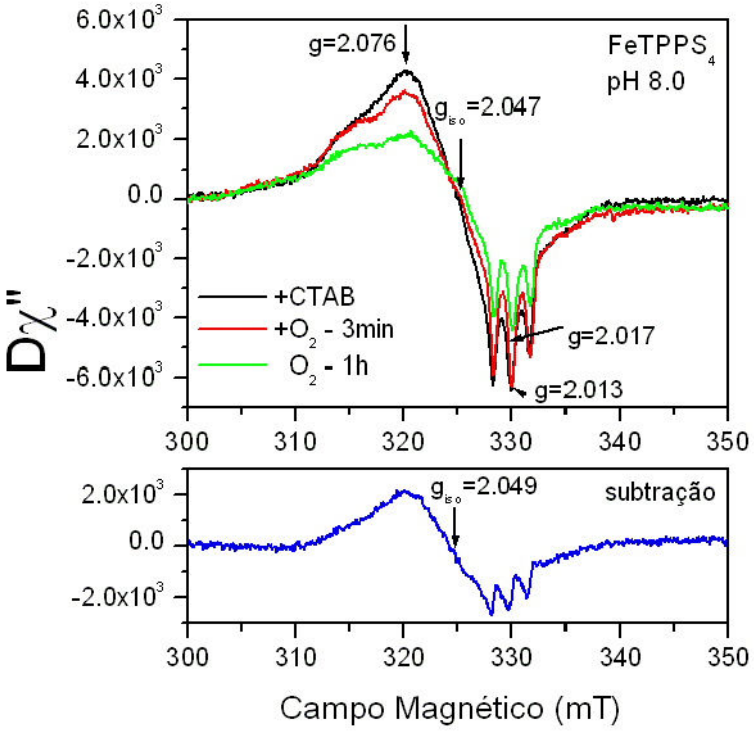



Figura 5.25

Acima: Espectro de EPR da NO-Fe(II)$TPPS_4$ 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:

A subtração espectral (Fig. 5.25), entre os espectros antes e após 1 hora de exposição ao oxigênio, revelou espectro menos isotrópico que em pH 5,0 (Fig. 5.24) e apresentando estrutura hiperfina. Isso indica que, além da degradação da espécie isotrópica, em pH 8,0 há maior degradação da espécie anisotrópica do que em pH 5,0. Em ambos valores de pH, observou-se que, depois de 14 h em presença de $O_2$, os espectros de EPR eram reduzidos a apenas 10%, em média.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Pode-se dizer que, em ambos valores de pH, a blindagem micelar prolonga a vida de Fe(II)TPPS$_4$ nitrosilada em presença de oxigênio.

**Fe(III)TMPyP em micelas de SDS**

Os espectros de EPR de Fe(III)TMPyP foram obtidos à temperatura de 77 K, antes do tratamento com SNAP, em solução tampão universal em pH 5,0 e 8,0. Em pH 5,0 foi observado que o sinal de $g \approx 6$, (análogo ao da Fig. 5.11) já estava bem menor do que o esperado. Esse sinal diminuiu bastante em pH 8.0 mas não desapareceu totalmente. Após adição de SNAP, a amplitude desse sinal tornou-se desprezível.

A Fig. 5.26 mostra os espectros de EPR após tratamento com SNAP 4:1 em pH 5,0 e 8,0, antes e após adição do detergente aniônico SDS.

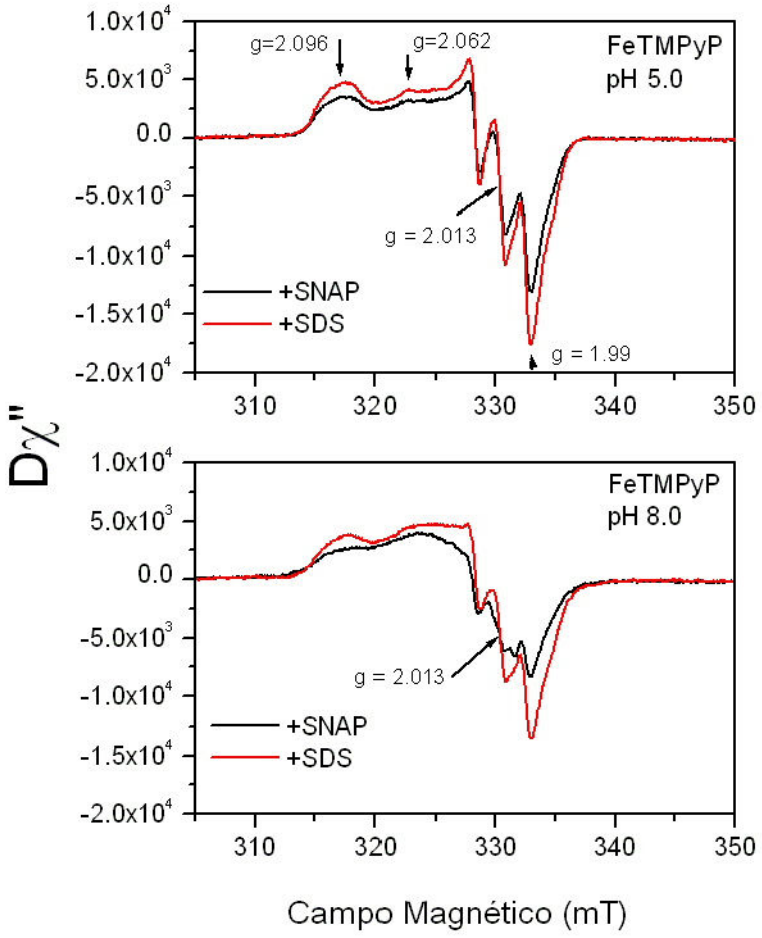



Figura 5.26

Espectro de EPR da FeTMPyP 100 μM em pH 5,0 e 8,0 a 77$^0$K, em tampão universal 66 mM, após a adição de SNAP 400 μM e na presença de SDS 20 mM.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Os espectros indicam formação do complexo NO-Fe(II)TMPyP tanto em pH 5,0 como em pH 8,0 (Fig. 5.26). Como para a $FeTPPS_4$, espectros bem semelhantes foram obtidos através de tratamento com gás NO seguido de adição de ditionito de sódio (da Silva, 1999), porém com estrutura hiperfina bem menos resolvida. Observa-se que o espectro é bastante anisotrópico para a NO-Fe(II)TMPyP caracterizado pelos valores de $g_1 = 2{,}096$, $g_2 = 2{,}062$ , $g_3 = 1{,}997$ e com as três linhas hiperfinas centradas em $g = 2{,}013$ e constante hiperfina $A = 2.15$ mT. O espectro é semelhante ao da cadeia $\alpha$ de hemoglobina na conformação T e é característico de NO-Fe(II)P pentacoordenada (Yoshimura, 1991). Em pH 8.0, percebemos uma perda de resolução estrutura hiperfina, deixando visível um espectro de impureza em $g \approx 2.004$.

Em pH 5,0 não são observadas mudanças espectrais significativas após a adição de SDS, enquanto que em pH 8,0 a resolução espectral na região hiperfina melhora.

Um espectro a 77 K com parâmetros bem próximos, porém com estrutura hiperfina pouco resolvida, foi publicado por Imai et al. (2004), após tratamento com gás NO de uma porfirina catiônica semelhante em pH 3.0. Esse espectro é idêntico ao obtido por da Silva (1999). A forma monomérica da porfirina perdeu o seu sinal de Fe(III) spin alto após a formação do composto (NO)Fe(II)TcatP. Os autores associaram os detalhes espectrais à Fe(II)porfirina ligada ao NO na quinta posição de coordenação.

Por outro lado, relatou-se um espectro de EPR da NO-Fe(II)TMPyP em pH 7,4 (Trofimova et al., 2003) bem diferente dos nossos (Fig. 5.26), tanto na região de g mais baixo quanto na das três linhas hiperfinas.

Praneeth et al. (2005) explorou os espectros de EPR de adutos de NO-Fe(II)TPP em solução de tolueno com tiofenolatos e tetrahidrotiofeno. A partir dos valores de g e da estrutura hiperfina eles concluiram que a interação de tiofenolatos com o centro de Fe(II) é fraca em comparação com 1-metilimidazol.

É interessante notar que, a disposição das três linhas hiperfinas observadas na Fig. 5.25, para NO-Fe(II)$TPPS_4$, é muito semelhante à do espectro de NO-Fe(II)-TPP relatado por Praneeth et al. (2005) em ausência de ligante na sexta posição de coordenação, enquanto a disposição dessas linhas na Fig. 5.26, para a NO-Fe(II)TMPyP é muito semelhante à da mesma NO-Fe(II)-TPP ligada a tetrahidrotiofeno (1 M). Essas semelhanças sugerem que os complexos de NO

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

com ambas porfirinas solúveis são penta-coordenados ou possuem na sexta posição de coordenação um ligante fraco (tiolato) derivado de SNAP após transferência de NO à porfirina.

**Oxigenação do complexo NO- Fe(II)TMPyP/ SDS**

A Fig. 5.27 mostra os espectros de EPR de NO-Fe(III)TMPyP em presença de micelas de SDS antes e após exposição a $O_2$. A oxigenação por 3 minutos da porfirina nitrosilada em presença de SDS não implicou em mudança espectral em pH 5,0. A micela SDS age como uma blindagem eficiente para a manutenção dos compostos nitrosilados nos 3 minutos após a oxigenação das amostras.

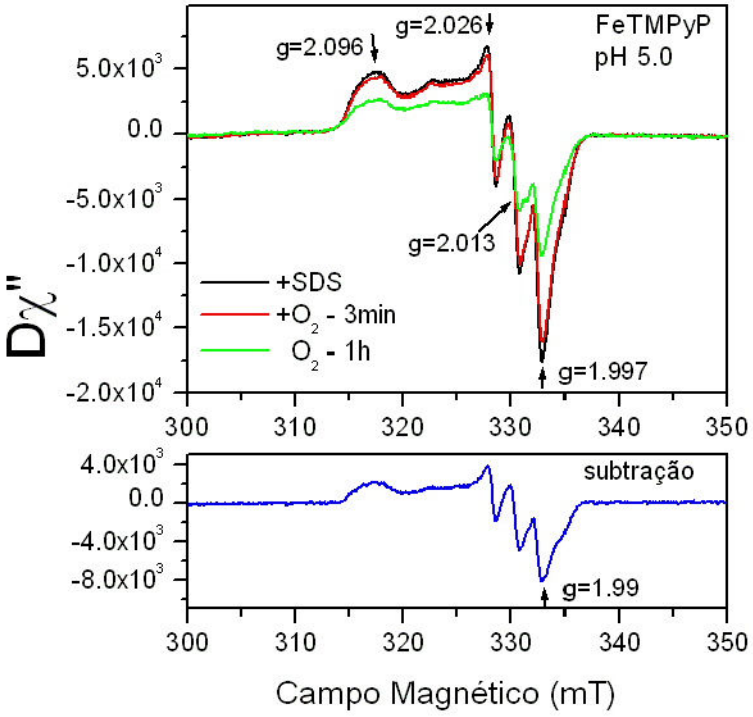



Figura 5.27

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.

Após 1 hora de exposição ao oxigênio o espectro perde intensidade, cerca de 45%. Além disso, na região das linhas hiperfinas centradas em g = 2,013, a exposição ao oxigênio implica em alguma perda da resolução das linhas. A subtração espectral, entre os espectros antes e após a oxigenação, sugere que há principalmente uma espécie anisotrópica, que vai sendo consumida com $t_{1/2} \approx 1$ h.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Em pH 8,0 (Fig. 5.28), exceto pela diminuição mais pronunciada nos primeiros 3 minutos de exposição ao oxigênio, o comportamento é espectro foi semelhante ao obtido em pH 5,0.

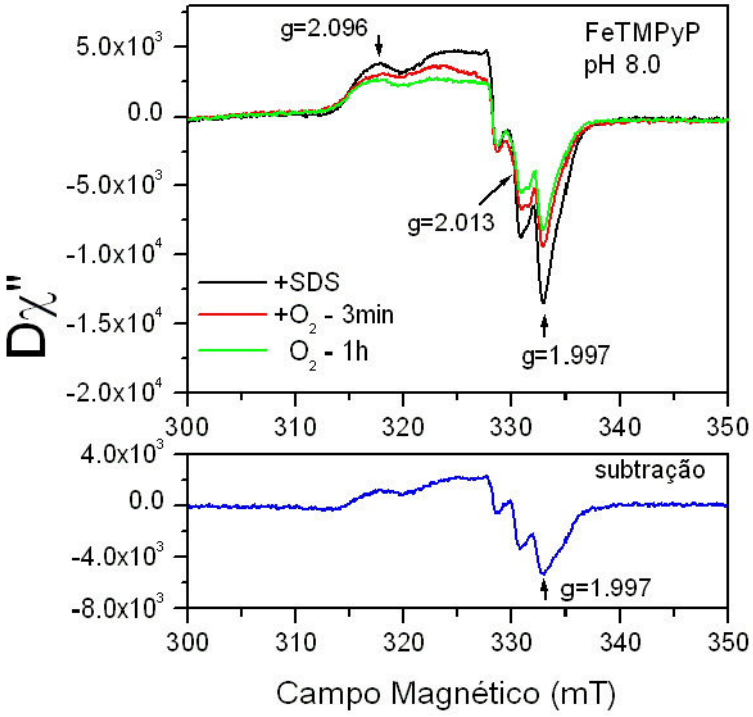



Figura 5.28

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.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

## 5.5
## Nitrosilação de Fe-porfirinas em proteínas

### 5.5.1
### Influência da albumina na nitrosilação da $FeTPPS_4$

Seguindo nossos experimentos, esta nova seção destina-se a avaliar a interação de $FeTPPS_4$ com albumina e observar o efeito dessa interação na nitrosilação por SNAP. Observamos as mudanças no espectro de absorção ao

titularmos a $FeTPPS_4$ com alíquotas de BSA. Ao fim dessa titulação, quando a concentração da albumina alcançou aproximadamente o dobro da concentração de porfirina, foi acrescentado SNAP e a cinética de nitrosilação também foi acompanhada oticamente.

**Titulação de $FeTPPS_4$ com BSA**

A Fig. 5.29 apresenta as mudanças óticas ocorridas na $FeTPPS_4$ após sucessivas adições de pequenas alíquotas de BSA. Antes da adição, a $FeTPPS_4$ apresenta um pico bem definido na banda de Soret em 408 nm e três picos em menor intensidade na banda Q em 568, 610 e 660 nm. A adição de albumina produz uma mudança na posição do pico da banda de Soret, que de 408 nm, desloca-se para 416 nm. Na banda Q, ocorre um pequeno aumento da intensidade em 660 nm com o aumento da concentração de BSA. Não são observados pontos isosbésticos, sugerindo que a BSA possui mais de um sítio de ligação para $FeTPPS_4$.

A albumina tem um espectro ótico com pico bem definido em 278 nm, devido aos aminoácidos aromáticos, cujo aumento de intensidade pode ser observado na titulação (Fig. 5.29). Todas as mudanças nos outros picos de absorção, que ocorrem até 800 nm, são devidas às modificações estruturais da porfirina.

Em experiências de titulação da $FeTPPS_4$ com BSA, Tominaga et al. (1997) observaram por absorção ótica, em pH 5,0 e 9,0, modificações que indicaram ligação dessa porfirina à BSA. Nesse trabalho foram utilizadas concentrações de BSA até 200 μM. Nossos resultados, em pH 7,4, foram semelhantes aos descritos em Tominaga et al. (1997) em pH 9,0 para a faixa de concentração de BSA coberta por nós (0 a 16 μM).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

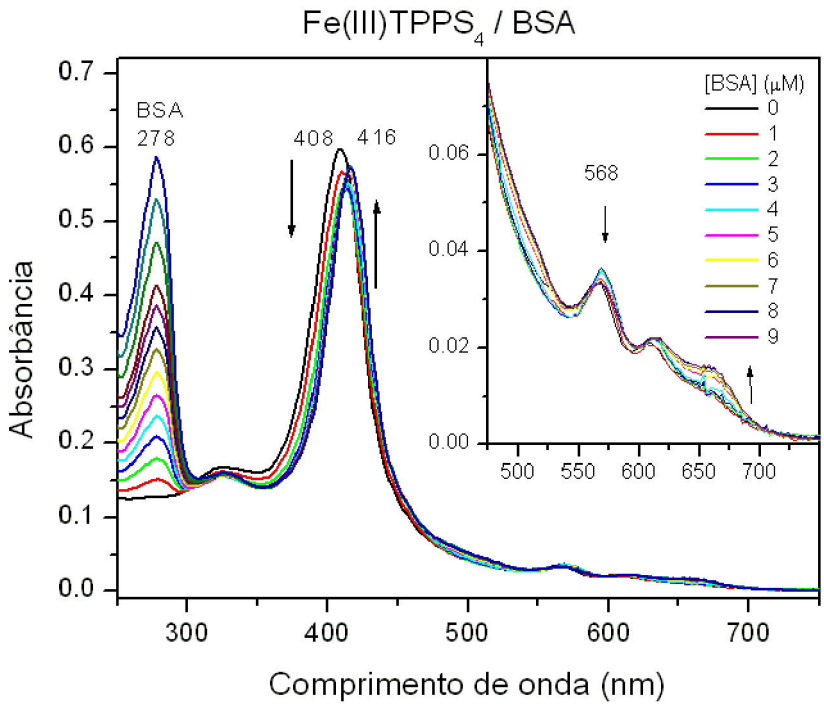



Figura 5.29

Titulação da Fe(III)TPPS$_4$ (8,5μM) em pH 7,4 por BSA. A BSA foi adicionada de 1 em 1 μM, até uma concentração de 16 μM.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**Determinação da constante de associação entre FeTPPS$_4$ e BSA**

A partir das modificações espectrais ocorridas na FeTPPS$_4$ após titulação com BSA, podemos determinar a constante de ligação da porfirina à albumina. Então, observando o espectro ótico da FeTPPS$_4$ em função da concentração de BSA, selecionamos dois picos de absorção em que ocorrem variações significativas dos valores de absorbância (396 e 424 nm).

Essas variações $\Delta A$ foram normalizadas à máxima variação $\Delta A_{max}$ em cada comprimento de onda e para diminuir o erro experimental, foi realizada a média dessa variação fracionária nos comprimentos de onda anteriores e posterires aos escolhidos.

Na Fig. 5.30 apresentamos as variações de intensidade em 396 e 424 nm ($\Delta A$) de Fe(III)TPPS$_4$ em função da concentração de BSA. Podemos notar que a Fe(III)TPPS$_4$ (8,5 μM) está totalmente ligada, mesmo a baixas concentrações de BSA (~2 μM em 396 nm e ~ 4 μM em 424 nm), indicando que uma molécula de

albumina pode ligar mais de uma ferro-porfirina. Portanto há mais de um sítio de ligação para $FeTPPS_4$ em BSA.

Para ajustar modelos teóricos a dados experimentais, devemos escolher os parâmetros experimentais a serem ajustados. A fração de porfirina ligada, $f_b$, pode ser escrita em função da variação de absorbância da porfirina. A absorbância $A$ num determinado comprimento de onda é a soma das absorbâncias da fração livre e da fração ligada.

$$A = A_f f_f + A_b f_b \tag{5.17}$$

onde $A_f$ é a absorbância quando toda a porfirina está em solução (na ausência de BSA) e $A_b$ é a absorbância quando todas estão associadas a BSA (concentração alta de BSA). Assim, o valor de $f_b$ para cada concentração total de BSA pode ser tirado dos espectros de absorção através da expressão da absorbância normalizada:

$$f_b = \frac{A - A_f}{A_b - A_f} \tag{5.18}$$

Desta maneira, relacionamos as variações das intensidades de absorção em função da concentração de BSA com o processo de ligação. A constante de dissociação $K_d$ foi obtida a partir de ajustes dos dados experimentais da Fig. 5.30. A equação para o ajuste computacional aos valores experimentais foi a de ligação a $n$ sítios idênticos. Esta equação é uma variação da Eq. 4.10, (ligação a sítio único) em que a concentração albumina $[BSA_t]$ foi substituída pela concentração total de sítios, que é igual ao número de sítios $n$ vezes a concentração de albumina, $n.[BSA_t]$.).

Para os dois comprimentos de onda escolhidos, os parâmetros dos ajustes foram diferentes, acarretando em diferentes constantes de dissociação e diferentes números de sítios ($K_{d396nm} > K_{d424nm}$; $n$=2 para 396 nm e $n$=6 para 424 nm). Concluimos que o modelo de n sítios equivalentes não é adequado. De fato, observando a Fig. 5.29 não encontramos qualquer ponto isosbéstico, indicando que realmente não está sendo formada uma única espécie. Portanto, além de a BSA estar ligando porfirinas em mais de um sítio, estes sítios são diferentes e a estrutura da $Fe\text{-}TPPS_4$ ligada varia de um sítio para outro, apresentando diferentes espectros de absorção.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

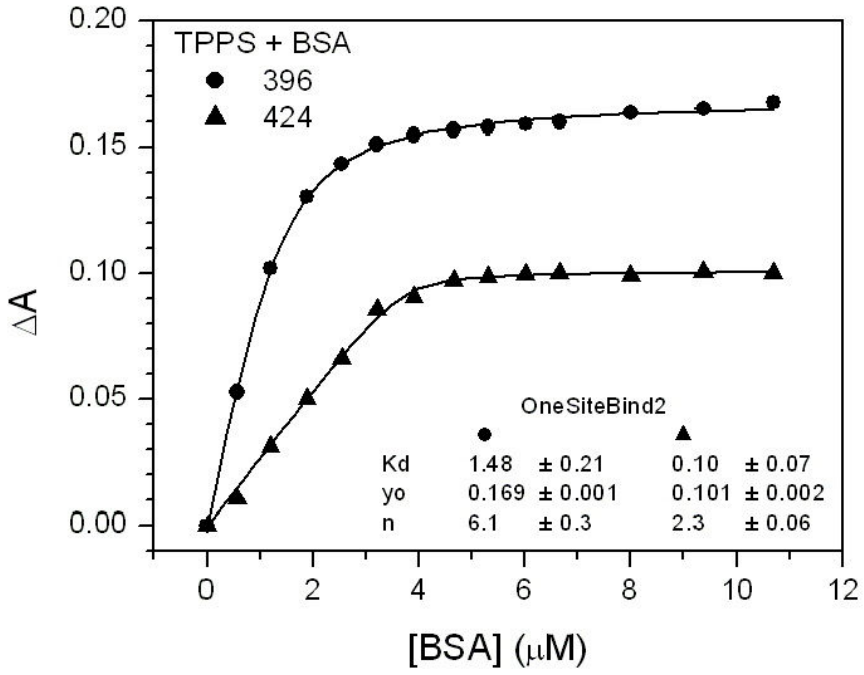



Figura 5.30

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.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Tabela 1: Parâmetros do ajuste da função de ligação a um sítio aos dados experimentais da titulação da Fe-$TPPS_4$ por albumina em pH 7,4.

| Fe-$TPPS_4$ / BSA pH 7,4 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $K_d$ ($10^{-6}$ M) | $K_b$ ($10^6$ $M^{-1}$) | $y_o$ | n |
| 394 nm | 1,5 ± 0,2 | 0,67 | 0,169 ± 0,001 | 6,1 ± 0,3 |
| 424 nm | 0,10 ± 0,07 | 10 | 0,101 ± 0,002 | 2,3 ± 0,1 |

Tominaga et al. (1997) calcularam, a partir de dados de supressão de fluorescência intrínseca de BSA em pH 5,0, constantes de associação $TPPS_4$-BSA dependentes da concentração de BSA. Para BSA 1 μM, a mais alta concentração utilizada no trabalho, a constante de associação foi 1,0 × $10^6$ $M^{-1}$, da mesma ordem de grandeza que a obtida por nós, através de absorção ótica da porfirina em

394 nm (desaparecimento da espécie livre). Por outro lado, constantes de associação bem maiores (~$10^8$ $M^{-1}$) foram encontradas em concentrações menores de BSA. A constante de ligação encontrada por nós utilizando a absorbância em 424 nm (ligação de porfirinas a pelo menos 2 sítios, de acordo com *n* da Tabela 1) foi ~$10^7$ $M^{-1}$. Apesar de a albumina ter apenas um sítio de ligação mais forte para hemina (Zunszain et al., 2003), ela possui sete sítios para ácidos graxos (Petitpas et al., 2001), que são aniônicos. Como a $TPPS_4$ é uma porfirina aniônica, é compreensível o fato de termos encontrado cerca de seis sítios de ligação à BSA.

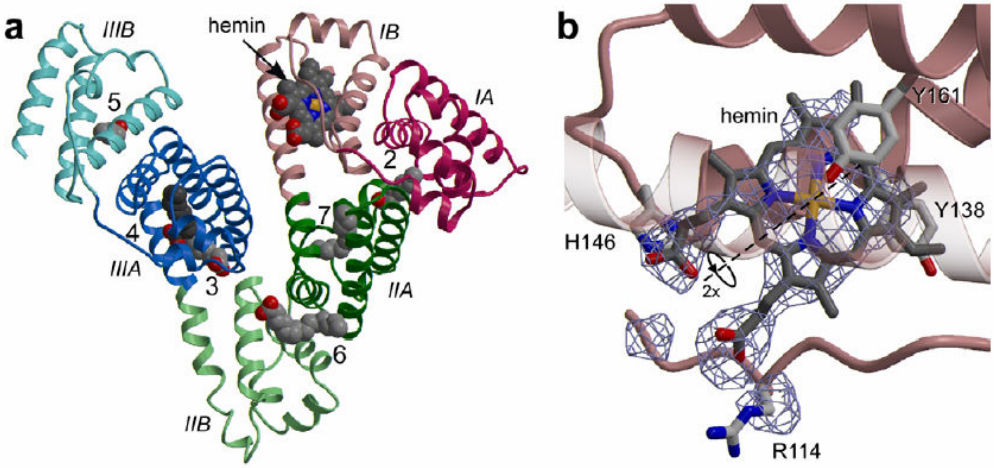



Figura 5.31

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 subdimínio IB. (Zunszain et al., 2003)

Em experiências de fluorescência sobre a interação de porfirinas bases livres com BSA Borissevitch et al. (1998) relataram constantes de ligação $K_b$ de 1,5 × $10^8$ $M^{-1}$ e 3,2 × $10^6$ $M^{-1}$ para $TPPS_4$ em pH 4,5 e 8,5, respectivamente. Nossos resultados em pH 7,4, sugerem cerca de seis sítios de ligação para $FeTPPS_4$, com constante de associação média da ordem de $10^6$ $M^{-1}$ (desaparecimento do pico em 394 nm, Tabela 1), da mesma ordem de grandeza, portanto, que para a base livre em pH 8,5. Devemos ressaltar que a ligação de mais de uma molécula de $FeTPPS_4$ (Borissevitch et al., 1998) e de $FeTPPS_4$ (Tominaga et al., 1997) à BSA foi

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

interpretada como agregação e, em nosso trabalho, estamos interpretando como existência de mais de um sítio em BSA para a $FeTPPS_4$, que inclusive podem ser próximos aos já identificados sítios de ligação para ácidos graxos.

**Adição de SNAP a Fe-$TPPS_4$ / BSA**

Para verificar a influência da albumina na nitrosilação da $FeTPPS_4$ por SNAP, desoxigenamos por fluxo contínuo de $N_2$ nossa amostra resultante da última adição de BSA (16 μM na cubeta). Com o cuidado necessário para manter a atmosfera anaeróbia, adicionamos SNAP (14 μM na cubeta) e observamos as mudanças espectrais. A Fig. 5.32 mostra que a adição de SNAP não implica em qualquer mudanças espectral, tanto na banda de Soret quanto na banda Q da ferro-porfirina ligada à albumina. Ou seja, a nossa ferro-porfirina está totalmente incorporada na albumina e desta maneira não nitrosila.

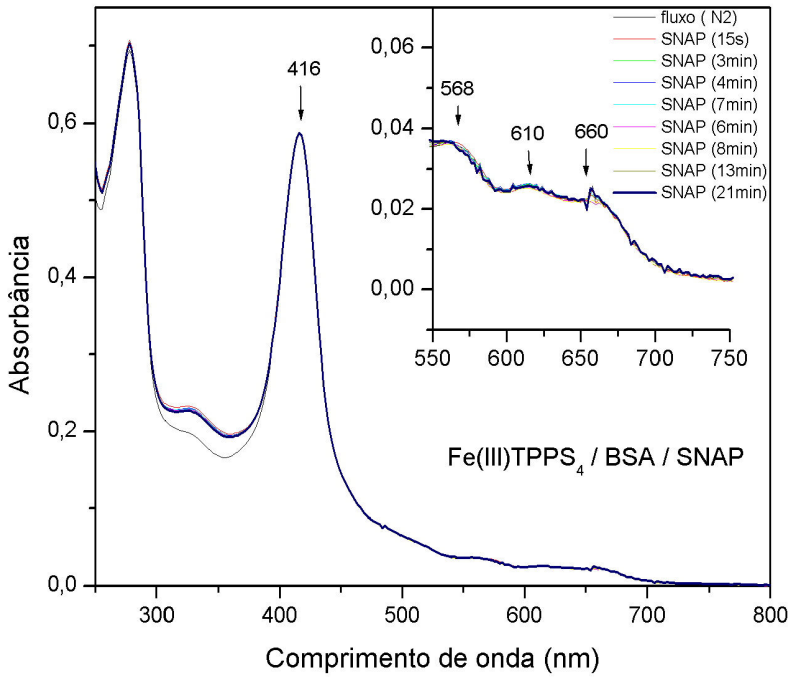



Figura 5.32

Nitrosilação em função do tempo por SNAP (14 μM), da solução de $FeTPPS_4$ (8,5 μM) e BSA (16 μM) em pH 7,4 em tampão Tris, desoxigenada após 10 minutos em fluxo de $N_2$ .

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

### 5.5.2
### Influência da albumina na nitrosilação da FeTMPyP

Conforme já fizemos para a porfirina aniônica, esta seção apresentará os resultados óticos obtidos da titulação por BSA da FeTMPyP, bem como a influência da BSA na nitrosilação por SNAP.

#### Titulação de FeTMPyP com BSA

A Fig. 5.33 apresenta as mudanças óticas ocorridas na FeTMPyP após sucessivas adições de pequenas alíquotas de BSA. O aumento da concentrção de albumina pode ser acompanhado pelo surgimento de um pico de absorção ótica em 278 nm. Antes da adição, a FeTMPyP apresenta um pico em 424 nm, na banda de Soret, e pico duplo de menor intensidade na banda Q em 598 e 634 nm. A Fig. 5.33 mostra que a interação com BSA faz surgir uma espécie com banda de Soret menos intensa, em torno de 424 nm, enquanto na banda Q há a diminuição dos picos em 598 e 634 nm acompanhando um pequeno aumento da absorção próximo a 550 nm. Ocorre também uma diminuição da intensidade da absorbância de um ombro localizado entre 470 e 520 nm. Ao contrário do que ocorreu com $TPPS_4$, aparecem pontos isosbésticos durante a titulação, sugerindo ligação a um único sítio. À concentração de 15 μM de BSA as variações espectrais ainda não atingiram a saturação, indicando que ainda restam Fe-porfirinas livres em solução.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

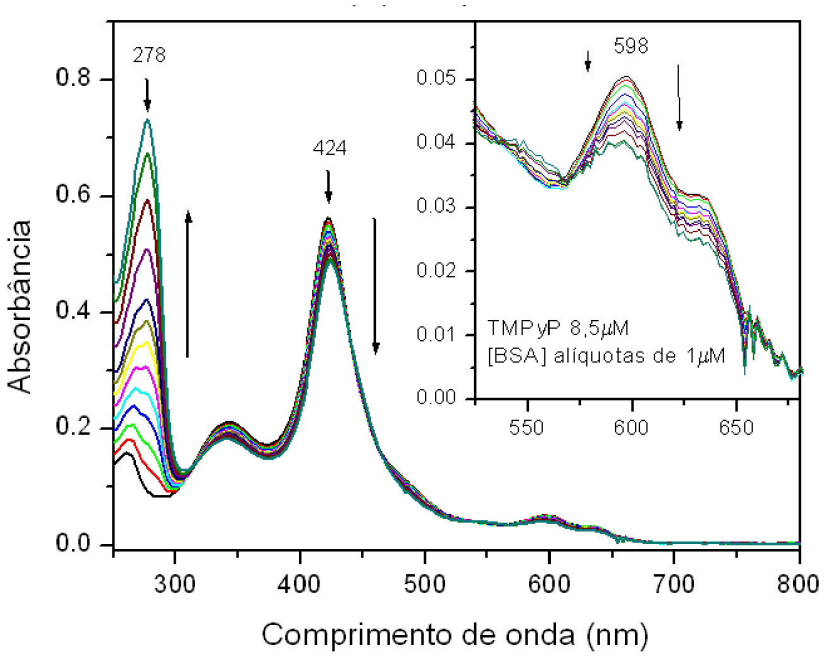



Figura 5.33

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.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

**Determinação da constante de associação entre FeTMPyP e BSA**

Com o intuito determinar a constante de ligação da FeTMPyP à albumina, selecionamos dois picos de absorção em que ocorrem variações significativas dos valores de absorbância (424 e 598 nm) após a titulação por BSA. A variação da absorbância (ΔA) nesses comprimentos de onda em função da concentração de albumina é apresentada nos gráficos da Fig. 5.34. Nessa figura observamos que a variação da absorbância não alcança valores constantes durante a titulação por albumina. Mesmo a uma concentração de 15 μM, aproximadamente o dobro de porfirina, a BSA não foi capaz de ligar toda a FeTMPyP em solução.

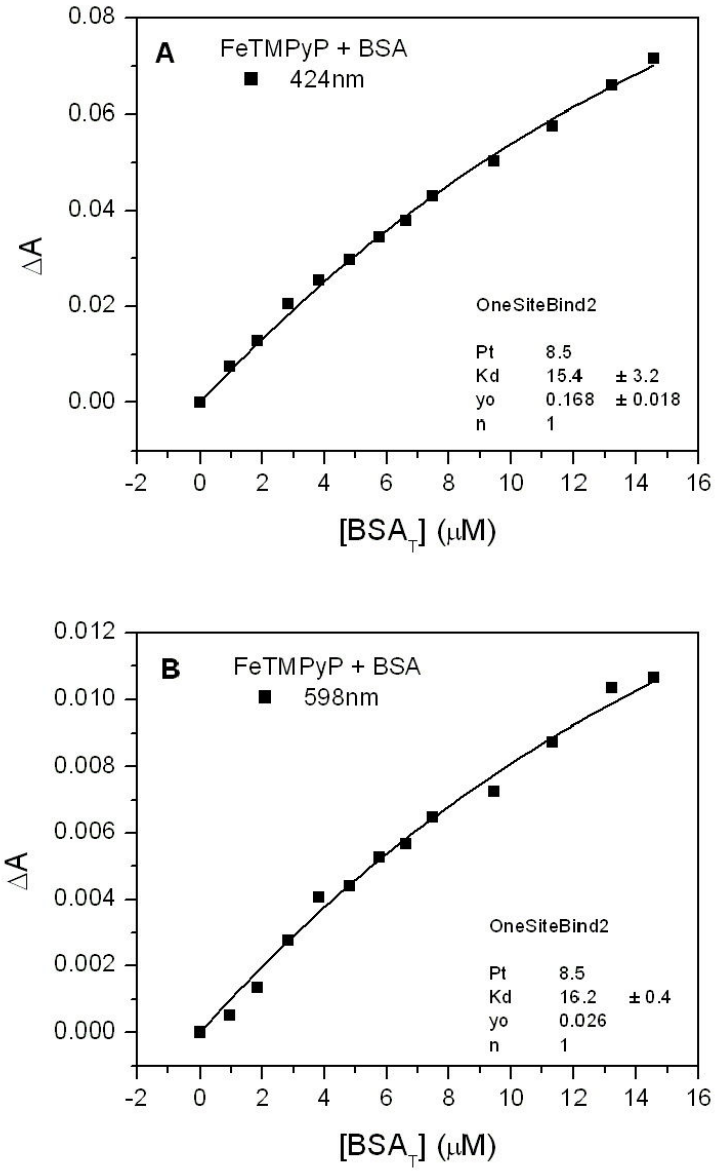



Figura 5.34

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.

A determinação da constante $K_d$ (de dissociação) foi feita ajustando-se aos dados da Fig. 5.34 a Eq. 4.10 multiplicada pelo parâmetro ajustável $y_o$ ($y_o = \Delta A_{max}$), já que não foi possível normalizar os valores de $\Delta A$. Os resultados do ajuste aparecem como linhas contínuas nos gráficos A e B da Fig. 5.34 e os parâmetros encontram-se na Tabela 2.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

Tabela 2: Parâmetros do ajuste da função de ligação a um sítio aos dados experimentais da titulação da FeTMPyP por albumina em pH 7,4.

| Fe-TMPyP / BSA pH 7,4 | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $K_d$ ($10^{-6}$ M) | $K_b$ ($10^5$ $M^{-1}$) | $y_o$ | n (fixo) |
| 394 nm | 15,4 ± 3,2 | 0,65 | 0,168 ± 0,018 | 1 |
| 424 nm | 16.2 ± 0,4 | 0,62 | 0,026 | 1 |

Em ambos comprimentos de onda, a constante de dissociação encontrada foi praticamente a mesma. Essa constante é da ordem de 10 vezes maior do que a encontrada para $FeTPPS_4$, indicando que a albumina tem afinidade muito mais baixa pela porfirina catiônica do que pela aniônica. Os resultados também sugerem que a BSA tem apenas um único sítio de ligação para a porfirina catiônica.

Borissevitch et al. (1998) encontraram para TMPyP constantes de ligação com BSA em função do pH diferindo por um fator dois: $K_b = 0,73 \times 10^6$ $M^{-1}$ e $1,8 \times 10^6$ $M^{-1}$ em pH 5,0 e 8,5, respectivamente. Já nossos resultados mostraram constante de ligação para a FeTMPyP pelo menos dez vezes menor.

**Adição de SNAP à Fe-TMPyP / BSA**

Para verificar a influência da albumina na nitrosilação da FeTMPyP, novamente desoxigenamos por fluxo contínuo de $N_2$ nossa amostra resultante da última adição de BSA (15μM na cubeta). Com o cuidado necessário para manter a atmosfera anaeróbia, e com o auxílio da micro-seringa gas tigth, adicionamos SNAP (14μM na cubeta) e observamos as mudanças espectrais. Observando a Fig. 5.35, a adição de SNAP pode ser notada por mudanças nos picos de absorção nas bandas de Soret e Q. Em 424 nm, a adição de SNAP pode ser acompanhada por um acréscimo e posteriormente um decréscimo dos valores de intensidade como função do tempo. Em 552 nm, no decorrer da reação de nitrosilação ocorre um aumento da intensidade de absorção.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

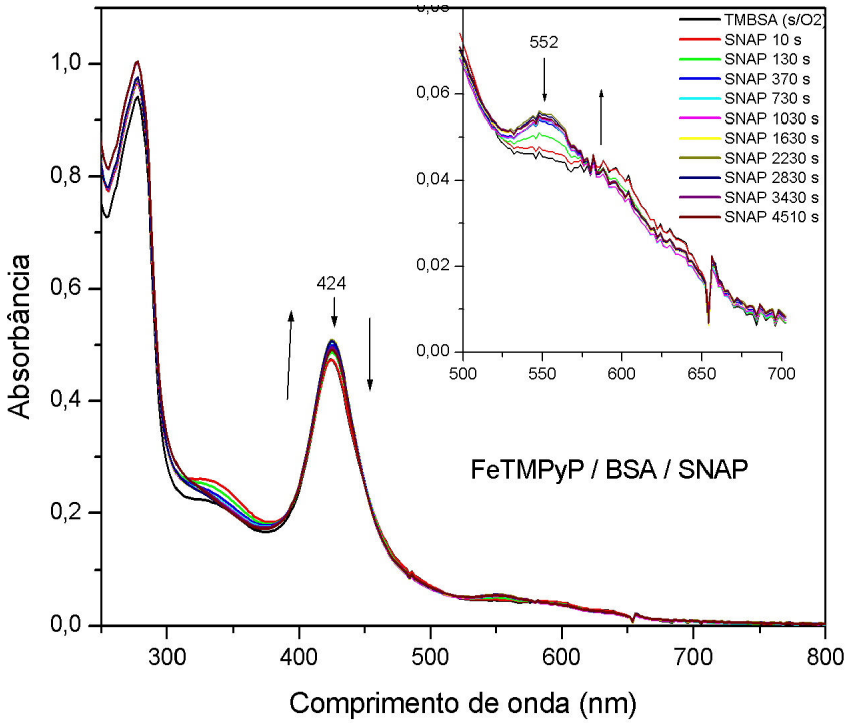



Figura 5.35

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 $N_2$ .

**Determinação da constante cinética de nitrosilação de TMPyP por SNAP**

Para descrever a cinética de nitrosilação foram escolhidos os picos de absorção em 424 e 552 nm. Os gráficos das variações fracionárias de absorbância ($\Delta A/\Delta A_{max}$) em função do tempo encontram-se na Fig. 5.36 e representam o processo de nitrosilação da Fe-TMPyP em BSA a pH 7,4. Os tempos característicos de nitrosilação foram determinados ajustando a equação exponencial de primeira ordem descrita por:

$$\Delta A/\Delta A_{max} = A_1 + A_2 (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (5.17)$$

onde $A_1$ , $A_2$ e o tempo característico $\tau$ foram obtidos do ajuste.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

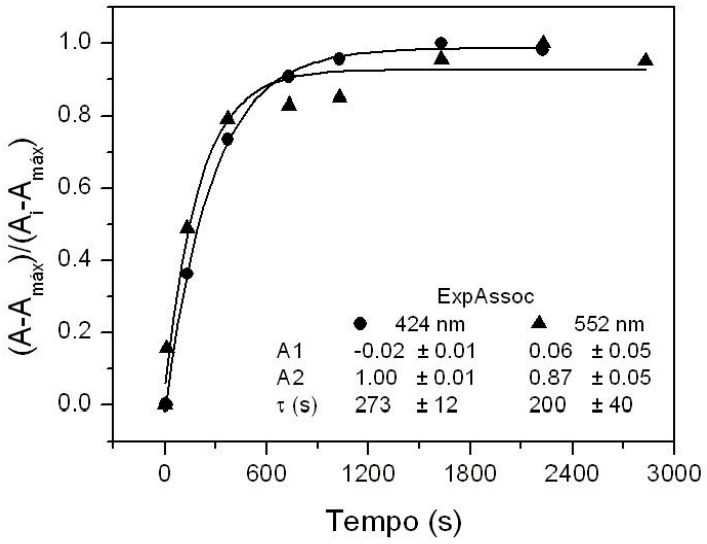



Figura 5.36

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.

Tabela 1: Parâmetros do ajuste da função mono-exponencial $\Delta A/\Delta A_{max} = A1 + A2*(1-exp(-t/\tau_c))$ aos dados experimentais da cinética de nitrosilação.

| Fe-TMPyP / BSA pH 7,4 | | | |
|---|---|---|---|
| | τ (s) | $A_1$ | $A_2$ |
| 424 nm | 273 ± 12 | -0,02 ± 0,01 | 1,00 ± 0,01 |
| 552 nm | 200 ± 40 | 0,06 ± 0,05 | 0.87 ± 0,05 |

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

### 5.5.3
### Nitrosilação de Mioglobina por SNAP

Nesta seção observou-se a evolução temporal do espectro de absorção de met-mioglobina tratada com SNAP na razão de 1:1 e de 4:1, para investigar a nitrosilação do grupo heme, presente na molécula de mioglobina. O íon de ferro encontra-se no estado Fe(III) spin alto.

Partindo de uma concentração de 7 μM, a mioglobina foi tratada com SNAP em concentrações de 7 e 28 μM em ambiente anaeróbico e os espectros foram obtidos em intervalos de tempo regulares. A Fig. 5.37 mostra o espectro de absorção ótica da mioglobina, com um pico de absorção na banda de Soret em 408 nm, enquanto na banda Q, ocorrem picos menos resolvidos e menos intensos, sendo o principal em 500 nm.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

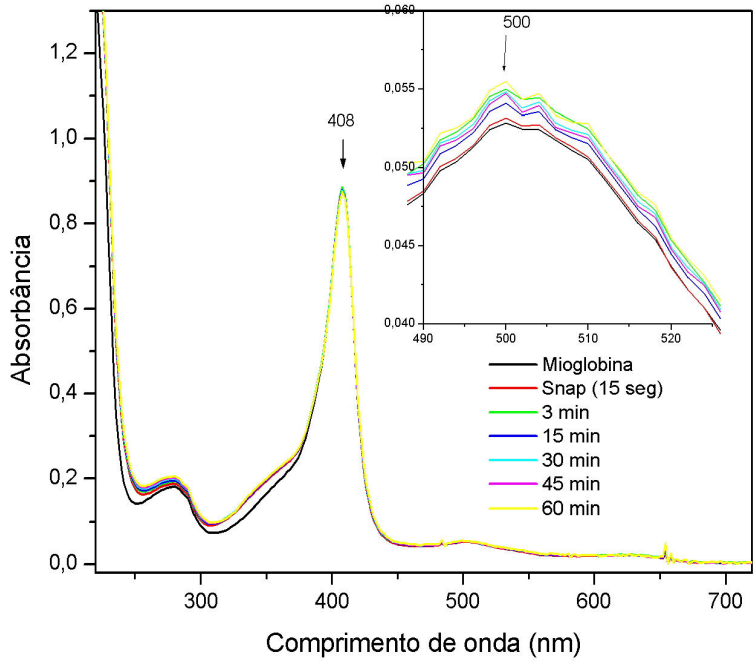



Figura 5.37

Espectro de absorção ótica da mioglobina (7μM) em tampão universal pH 7,4, nitrosilada por SNAP 7 e 28 μM como função do tempo.

Logo após adição de SNAP há o aumento da absorbância em torno de 338 nm, devido ao pico de absorção do SNAP. Em seguida, para ambas concentrações de SNAP, não ocorrem variações espectroscópicas significativas durante pelo menos uma hora. Dessa forma podemos dizer que na mioglobina o heme fica bem protegido da nitrosilação por SNAP pela cadeia polipeptídica.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0210614/CA