



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INORGÂNICA

Estudo cinético da reação dos complexos
***cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆) com redutores**
biológicos

Francisco Ordelei Nascimento da Silva

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

Tese submetida à
coordenação do curso de Pós-
graduação em Química Inorgânica,
como um dos requisitos para
obtenção do título de doutor em
Química Inorgânica.

Fortaleza-Ceará, 2008

Livros Grátis

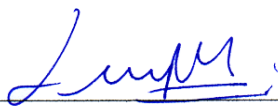
<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Inorgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

Francisco Ordelei Nascimento da Silva
Francisco Ordelei Nascimento da Silva

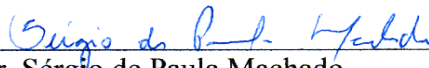
Tese aprovada em: **07/03/2008**



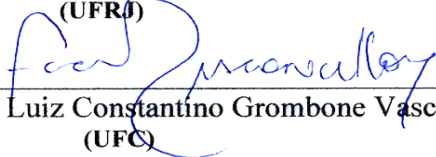
Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
(Orientador -UFC)



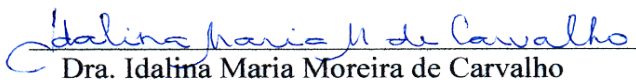
Dr. Daniel Rodrigues Cardoso
(USP)



Dr. Sérgio de Paula Machado
(UFRJ)



Dr. Luiz Constantino Grombone Vasconcellos
(UFC)



Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho
(UFC)

*À Deus, por ter me abençoado com
esta conquista.*

*Aos meus pais e meus irmãos que me
apoiaram e incentivaram em todos os
sentidos.*

*À minha noiva Ana Ellen, pelo
amor, carinho, paciência e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes pela orientação profissional, amizade e as discussões que resultaram neste trabalho.

Ao professor Dr. Jackson Rodrigues de Sousa, à Profa. Dra. Izaura Cirino Nogueira Diógenes, à Profa. Dra. Idalina Maria Moreira de Carvalho e à Profa. Dra. Elisane Longhinotti pelo convívio diário, o ensino profissional e o exemplo de vida.

Aos professores Dr. Luiz Augusto Basso e Diógenes A. Santo, e ao Igor B. de Vasconcelos do grupo de Biotecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela contribuição e colaboração nos dados obtidos a partir da técnica de Stopped Flow.

Ao professor Dr. Douglas W. Franco e Daniel Rodrigues Cardoso pela colaboração nos experimentos de ressonância paramagnética de elétrons e eletrodo seletivo de NO.

Ao CENAUREM, na pessoa do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira pela disponibilidade em realizar os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C .

Aos amigos que fazem parte do laboratório de Bioinorgânica: Alda Karine, Ana Lúcia, Arquimedes, Alice, Daniel, Elis, Emerson, Fernando, Francisco Adilson, João Paulo, Jefferson, Marcos, Manuela, Natália, Marcelo, Aparecida, Socorro, Pedro Hermano, Régia, Sérgio, Solange, Tércio, Thiago Alves e Thiago dos Santos pela agradável convivência.

Ao grupo de polímero pelo excelente convívio.

A todos os professores do curso de pós-graduação em química inorgânica, pela estima e consideração.

Aos funcionários do departamento de Química Orgânica e Inorgânica pelo auxílio na parte burocrática.

À Universidade Federal do Ceará pela oportunidade e toda a estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e auxílio financeiro disponibilizado para esta pesquisa.

Conviver com alguém para quem tudo foi fruto de grande esforço e determinação foi, sem dúvida, um grande privilégio. Para nós do Grupo de Bioinorgânica da UFC, além da perda do chefe, fica o enorme vazio deixado por um orientador dedicado, extremamente motivado, otimista e que tinha a capacidade de exercer a autoridade sem jamais apelar para o autoritarismo. Certamente essa capacidade devia-se ao profundo respeito e admiração que todos do Grupo tinham pelo **Professor Ícaro**. Sentimentos estes que irão permanecer eternamente na memória de cada um de nós.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma espécie endógena responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos, sendo também ativo no cérebro e em outros processos fisiológicos. Doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam espontaneamente ou são metabolizadas. Nitroprussiato de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, faz parte de uma classe de compostos que liberam NO espontaneamente e é o único complexo metálico usado clinicamente. Problemas associados com o uso de nitroprussiato incluem suscetibilidade a fotólise e ação oxidativa do sistema imune, no qual conduz à liberação de cianeto.

Neste trabalho foi realizado o estudo e acompanhamento cinético da reação dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{LNO}](\text{PF}_6)_n$ (L = imidazol e sulfito) com cisteína, glutatona, metionina e histidina, para a obtenção de dados cinéticos e espectroscópicos que possam contribuir para a elucidação de seu mecanismo de ação.

Os resultados cinéticos para a reação dos nitrosilo complexos com a cisteína e glutatona sugerem que há formação de dois intermediários: o primeiro com banda de absorção em 450 nm é referente ao ataque do enxofre dos tióis e o óxido nítrico. O segundo intermediário com banda de absorção características em 380 nm se deve ao ataque da segunda molécula dos redutores ao aduto formado.

As constantes de velocidade da reação com cisteína apresentaram dependência com relação ao pH. Isto ocorre, provavelmente, devido à desprotonação no enxofre da cisteína, facilitando a interação deste tiól com o óxido nítrico coordenado ao rutênio (II).

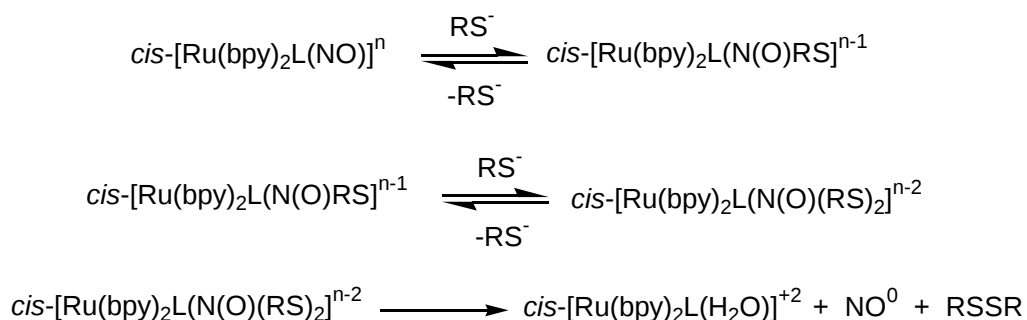
As reações com metionina e histidina mostram que não há o aparecimento dos intermediários, devido à ausência do grupo SH nos aminoácidos.

O acompanhamento realizado com HPLC nos mostra a existência do mesmo mecanismo entre os complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ com cisteína e glutatona. No caso da interação com

metionina e histidina, ocorre à diminuição do pico referente aos nitrosilos complexos e o aparecimento do pico atribuído ao aqua complexo.

Os resultados obtidos com o eletrodo seletivo de NO, de ressonância paramagnética de elétrons e RMN, mostraram que o óxido nítrico é reduzido e liberado nos complexo sem que haja a formação do nitrosotiol.

Baseado em estudos cinéticos e no espectro de EPR, a reação dos nitrosilo complexos com cisteína e glutathiona apresenta o seguinte esquema de redução e liberação do óxido nítrico:



Abstract

The oxide nitric (NO) is a responsible endogenous species by dilation of the blood vessels, being also active in the brain and in other physiologic processes. Donors of NO are pathophysiologically active healthy substances that liberate spontaneously or they are metabolized. Sodium nitroprusside, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, is part of a class of compounds that liberate NO spontaneously and it is the only metallic compound used clinically. Associated problems with the use of nitroprusside include susceptibility to photolysis and oxidative action of the immune system, in which it leads to the liberation of cyanide.

In this work it was accomplished the study and kinetic monitoring of the reaction of the compounds *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{LNO}](\text{PF}_6)_n$ (L = imidazole and sulphite) with cysteine, glutathione, methionine and histidine, for the obtaining of kinetic and spectroscopic data that can contribute to the elucidation of your action mechanism.

The kinetic results for the reaction of the nitrosyl complex with the cysteine and glutathione suggest that there is two intermediates formation: the first with absorption band in 450 nm is regarding the attack of the sulfur of the thiols and the nitric oxide. The second intermediate with characteristics band of absorption in 380 nm is due to the attack of the second molecule of the reducers to the formed adduct.

The rate constants of the reaction with cysteine presented dependence regarding the pH. This occurs, probably, due to the deprotonated in the sulfur of the cisteína, facilitating the interaction of this thiol with the coordinated nitric oxide to the ruthenium (II).

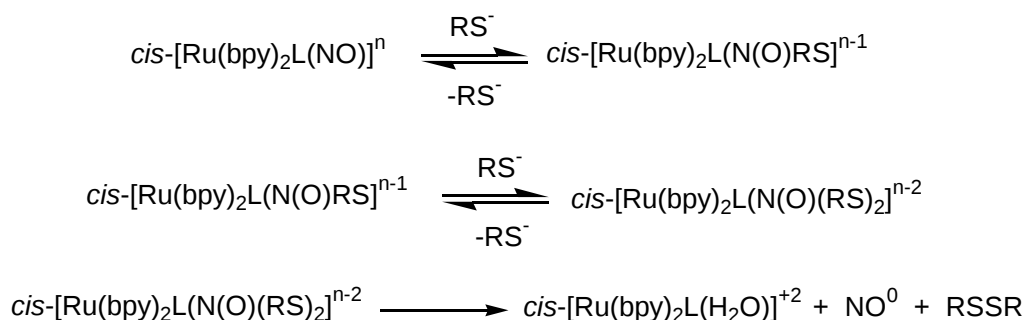
The reactions with methionine and histidine show that there are not the intermediates, due to the absence of the group SH in the amino acids.

The monitoring accomplished with HPLC reveal the existence of the same mechanism among the compounds *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}](\text{PF}_6)$ and *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})](\text{PF}_6)_3$ with cysteine and glutathione. In the case of the interaction with methionine and histidine, occurs the decrease of the peak

regarding the nitrosyl complex and the appearance of the peak attributed to the aqua complex.

The obtained results with the NO sensor, of electron paramagnetic resonance and RMN, they showed that the nitric oxide is reduced and release in the complex without there is the formation of the nitrosothiol.

Based on kinetic studies and in the spectrum of EPR, the reaction of the nitrosyl complex with cysteine and glutathione presents the following reduction scheme and liberation of the nitric oxide:



Sumário

Lista de Abreviaturas.....	i
Índice de Figura.....	iv
Índice de Tabela.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características e síntese do NO	2
1.2. Aspectos Fisiológicos do NO	4
1.2.1. Relaxação muscular e funções vasodilatadoras	4
1.2.2. Ação no sistema imunológico.....	7
1.2.3. Mensageiro no sistema nervoso central.....	9
1.3. Doadores e Transportadores de NO ⁰ in Vivo.....	11
1.4. Aplicações Farmacêuticas de Complexos Metálicos	12
1.4.1. Nitrosilo Complexos de Rutênio	14
1.4.2. Nitrosilo complexos de Ferro.....	15
1.5. A Importância Biológica dos aminoácidos	19
2. OBJETIVOS	24
3. Parte Experimental.....	25
3.1. Reagentes e soluções	25
3.2. Aparelhos e Técnicas Experimentais.....	28
3.3. Soluções	30
3.4. Tratamento dos Dados Experimentais.....	32
3.4.1. Medidas Cinéticas	32
3.4.2. Parâmetros de Ativação	32
3.5. Sínteses.....	34
3.5.1. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ Cl ₂].....	34

3.5.2. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)](PF ₆) ₃	34
3.5.3. Síntese do complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO](PF ₆)	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Acompanhamento espectrofotométrico da reação de decaimento de primeiro intermediário e formação do segundo.....	37
4.2. Decomposição do intermediário II e formação dos produtos	46
4.2.1. Com cisteína e glutatona.....	46
4.2.2. Metionina e histidina.....	62
4.2.3. Reação com NADH	73
4.3. Acompanhamento da reação dos nitrosilo complexos com redutores biológicos, utilizando-se técnicas eletroquímicas	75
4.3.1. Cisteína e glutatona.....	75
4.3.2. Metionina e Histidina	79
4.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons	83
4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	85
4.5.1. Cisteína e glutatona.....	85
4.5.2. Metionina e histidina.....	98
4.6. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho.....	106
4.7. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H	110
4.7.1. Cisteína e glutatona.....	110
4.7.2. Metionina.....	117
4.7.2. Metionina.....	123
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
6. REFERÊNCIAS.....	127
Anexo	136

Lista de Abreviaturas

NADPH – Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

GTP- Guanosina trifosfato

ATP – Adenosina trifosfatp

cGMP – Guanisina monofosfato cíclico

EDRF – endothelium-derived relaxing factor

AcH – Acetilcolina

GC – Guanilato ciclase

eNOS – enzima NO sintetase endotelial

iNOS - enzima NO sintetase induzida

cNOS - enzima NO sintetase endotelial constutiva

O₂⁻ - Íon peróxido

O₂ – Oxigênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

NO₂⁻ - íon nitrito

NaNO₂ – nitrito de sódio

N₂O – Óxido nitroso

KMO₄ – Permagnato de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

NG – Nitroglicerina

SNP – S-nitroso-N-acetil-penicilamina

RSH – Tióis

RSNO – Nitrosotióis

GSNO – S-nitrosoglutationa

GSH - Glutationa

Hedta – ácido etilenodiaminotetraacético

Ttha – trietilenotetraminahexaacetato

NPS – Nitroprussiato de sódio

GSSG – Glutationa oxidado

CF₃COOH – Ácido trifluoracético

NaTFA – Trifluoracetato de sódio

CH₃COOH – Ácido acético

CH₃COONa – Acetato de sódio

BTP – Bis-trispropano

NH₄PF₆ – Hexafluorofosfato de amônio

CaF₂ – Fluoreto de cálcio

Na₂HPO₄ – Fosfato de Sódio dibásico

KH₂PO₄ – Fosfato de Potássio monobásico

Isn – Isonicotinamida

ImN – Imidazol

SO₃⁻² – íon sulfito

Bpy – bipyridina

D₂O – óxido de deutério

DFT - Density Functional Theory

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPE – Ressonância Paramagnética de Elétrons

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ATR - Attenuated Total Reflection

TCML – Transferência de carga do metal para o ligante

t_r – Tempo de retenção

k_{Obs} – constante de velocidade observada

T – temperatura em Kelvin

k_b – Constante de Boltzmann

h – Constante de Planck

$\Delta H^\#$ - Entalpia de ativação

$\Delta S^\#$ - Entropia de ativação

$\Delta S^\#$ - Volume de ativação

$\Delta G^\#$ - Energia livre de ativação

R – constantes dos gases

s - segundo

Índice de Figura

Figura 1. Reação química de formação do NO[18].	4
Figura 2. Estrutura química do GTP e cGMP.	5
Figura 3. Esquema geral de produção de NO e relaxamento das células[30]. ..	7
Figura 4. Esquema geral da reação do NO com espécies radicalares[15].	9
Figura 5. Função do óxido nítrico com neurotransmissor[15].	10
Figura 6. Estrutura química do íon nitroprussiato.	15
Figura 7. Mecanismo proposto para a dissociação do óxido nítrico no tecido vascular pelo nitroprussiato de sódio[81].	17
Figura 8. Estrutura química da L-cisteína.	20
Figura 9. Estrutura química da glutatona (GSH).	21
Figura 10. Estrutura química da metionina.	22
Figura 11. Estrutura química da histidina.	23
Figura 12. Estrutura química do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³	35
Figura 13. Estrutura química do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)] ⁺	36
Figura 14. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)] ⁺ com cisteína em pH = 6,5. Temperatura = 25 °C.	37
Figura 15. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 380 e 450 nm, para a reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)] ⁺ com cisteína.	39
Figura 16. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína em pH = 3,2. Temperatura = 37 °C.	42
Figura 17. <i>k</i> _{obs} versus concentração de cisteína, em CH ₃ COOH/CH ₃ COONa 0,1 mol L ⁻¹ pH = 3,2 e T = 37 °C.	43

Figura 18. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína (A) e glutathione (B) em pH = 3,2. Temperatura = 37 °C.....	45
Figura 19. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com cisteína (A) e glutathione (B), em BTP 0,01 mol L ⁻¹ pH = 7,05 e T = 37 °C.....	47
Figura 20. k _{obs} , para a redução e liberação de NO ⁰ em função do pH, na presença de 2,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de [RuNO], 7,6 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de cisteína.	51
Figura 21. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com cisteína.....	52
Figura 22. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com glutathione.....	53
Figura 23. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com glutathione (A) e cisteína (B) , em CH ₃ COOH/CH ₃ COONa 0,1 mol L ⁻¹ pH = 3,0 e T = 37 °C.	56
Figura 24. k _{obs} , para a redução e liberação de NO ⁰ em função do pH, para o íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ na presença de 7,6 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ de cisteína.....	58
Figura 25. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína (A) e glutathione (B).	60
Figura 26. Estrutura química da metionina.....	62
Figura 27. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com histidina (B) e metionina (A), em BTP 0,01 mol L ⁻¹ e NaTFA 0,1 Mol L ⁻¹ pH = 7,0 e T = 37 °C.	63
Figura 28. Estrutura química da histidina.....	64
Figura 29. Dependência de k _{obs} com a temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com metionina.....	66

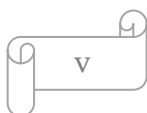


Figura 30. Dependência de k_{obs} com a temperatura para a interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com histidina.	66
Figura 31. Variação de absorbância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com histidina (A) e metionina (B), em CH_3COOH/CH_3COONa $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 3,0 e $T = 37^\circ C$	68
Figura 32. Dependência de k_{obs} com a temperatura para a interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com metionina (A) e histidina (B).	71
Figura 33. Variação de absorbância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação nos íons complexos: $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com NADH (A) em CH_3COOH/CH_3COONa $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 3,5; $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com NADH(B) em NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0 e $T = 37^\circ C$	74
Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada referente à reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com glutathiona (A) e cisteína (B), em NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,05 e $T = 37^\circ C$	76
Figura 35. Voltamogramas de onda quadrada referente à redução e liberação de NO do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com glutathiona (A) e cisteína (B) em CH_3COOH/CH_3COONa $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 3,5, e $T = 37^\circ C$	78
Figura 36. Voltamogramas cíclicos referente à redução e liberação de NO, no íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ em $NaCF_3COO$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,05 e $T = 37^\circ C$	80
Figura 37. Voltamogramas cíclicos referente à interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com histidina (A) e metionina (B), em CH_3COOH/H_3COONa $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH = 3,5, e $T = 37^\circ C$	82
Figura 38. Espectro de EPR da interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com cisteína.	83
Figura 39. Espectro de EPR da interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com cisteína.	84
Figura 40. Cromatograma da interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com cisteína $\lambda_{analítico} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min	86

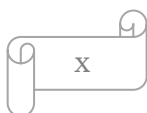
Figura 41. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com cisteína: Espectro A - referente à espécie com t _r = 8,40 min; Espectro B – espécie com t _r = 3,38 min; Espectro C – Espécie com t _r = 4,70 min.	88
Figura 42. Cromatograma da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com glutathione λ _{analítico} = 300 nm, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	89
Figura 43. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com glutathione: Espectro A - referente à espécie com t _r = 2,15 min; Espectro B – espécie com t _r = 3,35 min; Espectro C – Espécie com t _r = 3,52 min.	91
Figura 44. Cromatograma da interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína λ _{analítico} = 300 nm, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	92
Figura 45. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína: Espectro A - referente a espécie com t _r = 2,75 min; Espectro B – espécie com t _r = 3,35 min; Espectro C – Espécie com t _r = 4,15 min.	94
Figura 46. Cromatograma da interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com glutathione λ _{analítico} = 300 nm, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	96
Figura 47. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com glutathione: Espectro A - referente a espécie com t _r = 2,48 min; Espectro B – espécie com t _r = 4,04 min; Espectro C – Espécie com t _r = 4,64 min.	97
Figura 48. Cromatograma da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com metionina λ _{analítico} = 300 nm, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	98
Figura 49. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com metionina: Espectro A - referente à espécie com t _r = 2,52 min; Espectro B – espécie com t _r = 3,05 min.	99

Figura 50. Cromatograma da interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com histidina $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	100
Figura 51. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com histidina: Espectro A - referente a espécie com $t_r = 2,50 \text{ min}$; Espectro B – espécie com $t_r = 3,05 \text{ min}$	101
Figura 52. Cromatograma da interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com metionina $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	102
Figura 53. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com metionina: Espectro A - referente a espécie com $t_r = 2,31 \text{ min}$; Espectro B – espécie com $t_r = 3,67 \text{ min}$	103
Figura 54. Cromatograma referente à interação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com histidina $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.	104
Figura 55. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com histidina: Espectro A - referente a espécie com $t_r = 2,50 \text{ min}$; Espectro B – espécie com $t_r = 4,17 \text{ min}$	105
Figura 56. Variações espectrais na região do infravermelho, para as reações do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com cisteína, glutathiona, metionina e histidina, respectivamente. Espectros obtidos em solução aquosa, em Temperatura = 25 °C.	107
Figura 57. Variações espectrais na região do infravermelho, para as reações do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)] ⁺³ com cisteína, glutathiona, metionina e histidina, respectivamente. Espectros obtidos em solução aquosa, em T = 25 °C.	109
Figura 58. Espectros de ressonância magnética nuclear de ¹ H da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com cisteína, obtidos em D ₂ O.	111
Figura 59. Espectros de ressonância magnética nuclear de ¹ H da reação do íon complexo <i>cis</i> -[Ru(bpy) ₂ SO ₃ NO] ⁺ com glutathiona, obtidos em D ₂ O.	112

Figura 60. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, obtidos em D_2O	114
Figura 61. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com glutathione, obtidos em D_2O	116
Figura 62. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da interação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com metionina, obtidos em D_2O	117
Figura 63. Cronoamperograma da liberação de NO através da reação em solução aquosa do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com glutathione (A) e cisteína (B).	120
Figura 64. Cronoamperograma da liberação de NO através da reação em solução aquosa do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína (A) e glutathione (B).	122
Figura 65. Cronoamperograma da liberação de NO através da reação em solução aquosa dos íons complexos $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ (A) e $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ (B) com metionina.	124

Índice de Tabela

Tabela 1. Tabela de solução tampão de Sörensen ($\text{NaHPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$)	30
Tabela 2. Tabela de solução tampão ($\text{H}_3\text{CCOOH/H}_3\text{CCOONa}$)	31
Tabela 3. Valores de constantes de velocidade para reação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3(\text{NO})]^+$ com variação na concentração cisteína.	41
Tabela 4. Valores de constantes de velocidade para reação do complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3(\text{NO})]^+$ com variação na concentração de H^+	41
Tabela 5. Valores de constantes de velocidade para reação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com a variação na concentração cisteína.	44
Tabela 6. Constante de velocidade em função do pH da interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína, a 37 °C e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	50
Tabela 7. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína e glutatona.	52
Tabela 8. Constante de velocidade em função do pH da interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, a 37 °C e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	58
Tabela 9. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína.	59
Tabela 10. Valores da constante de velocidade em função da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com metionina e histidina.	65
Tabela 11. Valores de k_{obs} em função da temperatura para a interação do íon complexo <i>cis</i> - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com metionina e histidina.	70
Tabela 12. Parâmetros de ativação, a 25 °C, para reação dos nitrosilo complexos com redutores biológicos.	72



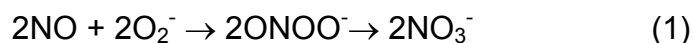
Introdução

1. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico é um gás incolor à temperatura ambiente, pouco solúvel em água, com uma concentração em uma solução saturada (1 atm de NO) de $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (25°C), sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tal como o n-hexano, onde apresenta uma concentração na saturação de 0,13 mol L⁻¹. Assim, esta molécula tende a dissolver-se seletivamente na membrana e fases lipídicas das células [1, 2].

O óxido nítrico é uma molécula neutra com configuração eletrônica $(\sigma 2s)^2 (\sigma 2s^*)^2 (\sigma 2p_z)^2 (\pi 2p)^4 (\pi 2p^*)^1$, que apresenta um elétron desemparelhado e é, portanto, paramagnética. Esta propriedade é de grande relevância, uma vez que a maioria das interações químicas do óxido nítrico em sistemas biológicos é caracterizada como estabilizações do elétron desemparelhado. Em geral isto acontece através da reação do óxido nítrico com outra espécie paramagnética ou pela sua complexação a um metal [3].

Sendo uma espécie radicalar, o óxido nítrico é capaz de reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, tais como oxigênio molecular e íon superóxido (O_2^-). O significado químico e biológico da oxidação do óxido nítrico pela molécula do oxigênio é objeto de numerosas investigações, e é certo que tais reações são importantes para a sua toxicologia e fisiologia. Uma das mais significantes reações do óxido nítrico é com o O_2^- , sendo o peroxinitrito ($ONOO^-$), o produto desta reação[4]. Tais espécies são potentes oxidantes, capazes de oxidar tióis e bases do DNA [3]. A meia-vida do $ONOO^-$, sob condições fisiológicas, é aproximadamente 1 segundo, decompondo-se espontaneamente para produzir nitrato (NO_3^-)[4], conforme ilustra a equação 1:



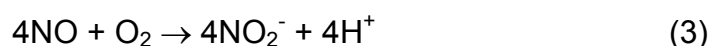
A possível importância biológica desta reação foi primeiramente apontada por Beckman e colaboradores [5], que observaram que o peroxinitrito podia ser formado sob condições fisiopatológicas (onde o NO e O_2^- são

produzidos por células fagocíticas, tais como macrófagos) e que o $\cdot\text{OONO}$ é um forte oxidante com potencial para destruir componentes celulares críticos.

Uma reação do óxido nítrico também muito conhecida, e talvez a mais exaustivamente investigada, é a sua oxidação para dióxido de nitrogênio que pode, naturalmente, ocorrer *in vivo* [1]. Nesta reação, na fase gasosa, duas moléculas de NO reagem com uma molécula de O_2 para produzir duas moléculas de outro radical paramagnético (Equação 2), dióxido de nitrogênio (NO_2)[3]:



Esta oxidação foi também estudada em solução aquosa e a reação ocorre de acordo com a equação não balanceada 3:



Um intermediário é formado (N_2O_3 ou uma espécie relacionada) que pode eficientemente reagir com tióis formando nitrotióis. Isto pode, em princípio, representar um importante passo na citotoxicidade do NO. Porém, a reação é de segunda ordem com relação ao NO e, portanto, extremamente lenta em concentrações fisiológicas micromolares de NO [6-8].

1.1. Características e síntese do NO

Apesar das diversas aplicações do óxido nítrico em vários campos, são suas funções e aplicações biológicas que tem despertado grande interesse [9-13]. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração. O NO é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é, em geral, realizado através de receptores de membrana celular na célula alvo; estes receptores são, habitualmente, transmembranosos tendo contato com citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula. Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO

é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos [12].

Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida. O NO atua sempre como mensageiro biológico em grande variedade de processos fisiológicos [9, 10, 12, 14, 15]. Esta função é destacada pelo fato desta molécula ser um tipo de mensageiro cujo trânsito no organismo é, em larga extensão, independente de transportadores específicos ou canais utilizados por outros mensageiros químicos.

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme levando ao término de sua atividade biológica [16, 17]. A Figura 1 indica a clássica reação química de formação do NO, em que a L-arginina é transformada em um intermediário, a N^G-hidroxi-L-arginina com a presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH) e Ca²⁺ sendo necessário mais NADPH e O₂ para a formação de L-citrulina e NO. O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina pela sintetase do óxido nítrico [16].

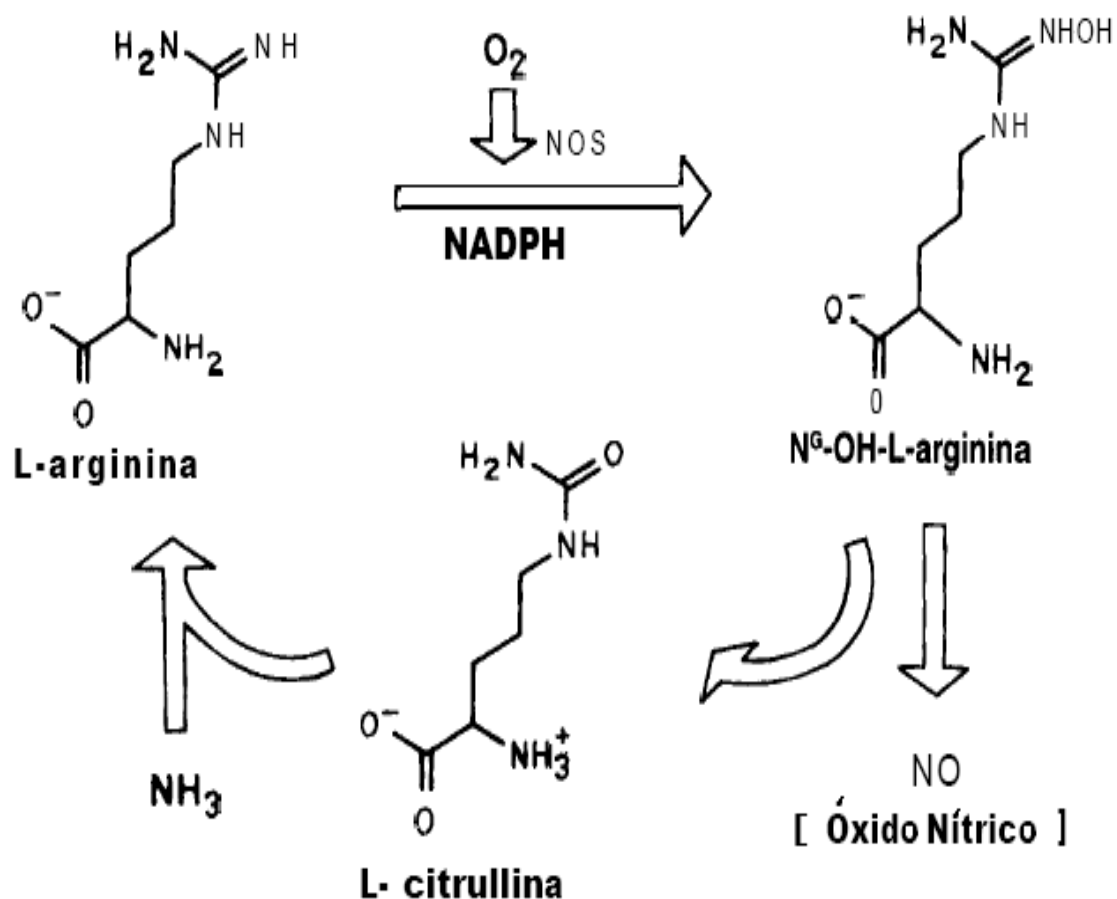


Figura 1. Reação química de formação do NO[18].

1.2. Aspectos Fisiológicos do NO

1.2.1. Relaxação muscular e funções vasodilatadoras

De acordo como a estrutura, propriedades de contração e mecanismo de controle, existem três tipos de músculos: músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso. Os músculos lisos são involuntários e encontram-se envolvendo a parede de órgãos. São responsáveis, dentre outros fenômenos, pelas contrações que empurram os alimentos ao longo do tubo digestivo e que diminuem o calibre das artérias, aumentando a pressão do sangue. Murad e colaboradores sugeriram, no início dos anos oitenta, que a relaxação no músculo liso requer a ativação da enzima guanilato ciclase e seria

acompanhada pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Figura 2), sendo este processo de relaxação desencadeado por mensageiros químicos, tal como a acetilcolina, que atuam diretamente nas células musculares do sistema vascular [1].

Porém, em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que, na realidade, os mensageiros químicos responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos agem na camada celular, chamada endotélio, que reveste o interior do vaso sanguíneo. Em reação ao estímulo do mensageiro químico, o endotélio produz uma molécula mensageira que se difunde pelas células musculares situadas sobre ele, que em seguida se relaxam. Furchott e Zawadzki chamaram essa misteriosa molécula de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*) [19].

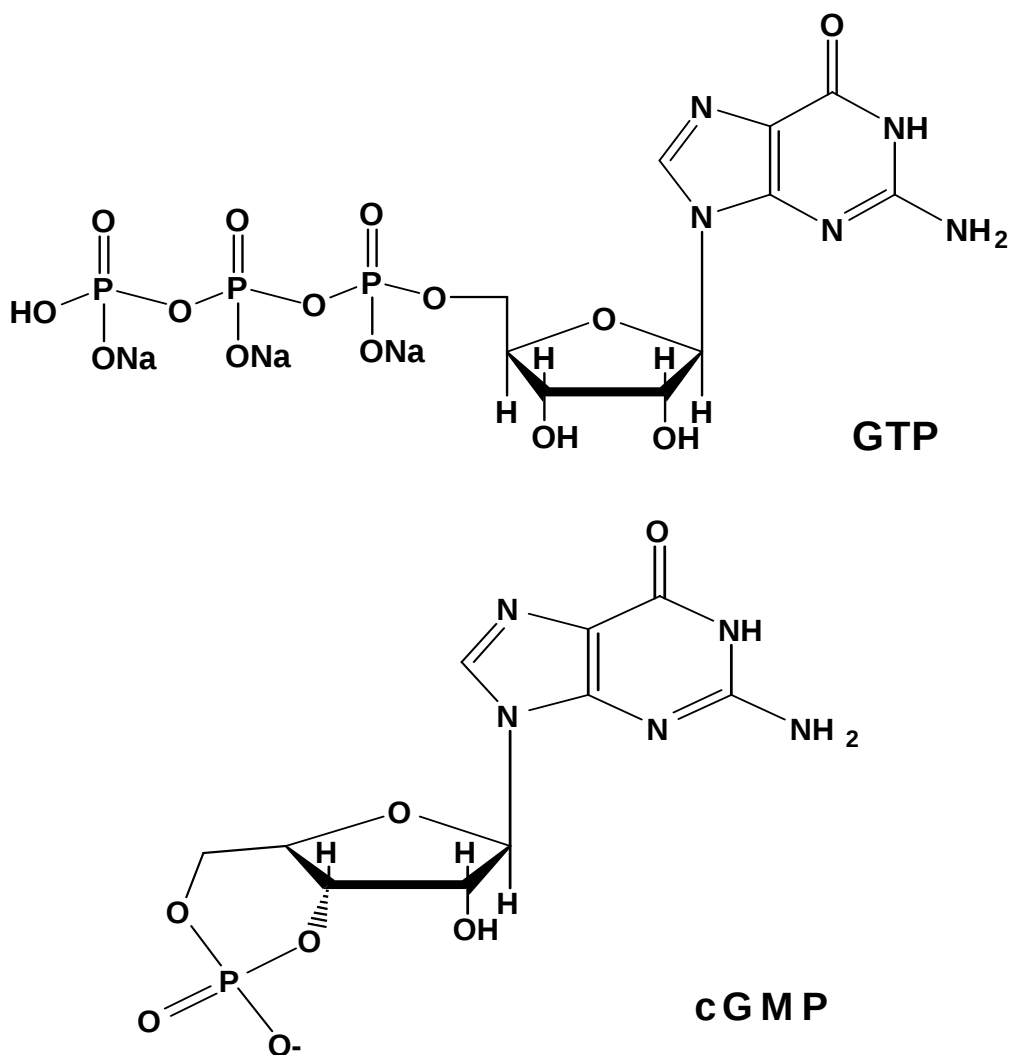


Figura 2. Estrutura química do GTP e cGMP.

Vários grupos de pesquisa tentaram isolar o EDRF e muitas hipóteses sobre a sua identidade química foram levantadas nos anos seguintes [20-22]. Porém, apenas em 1988 Furchott e Ignarro sugeriram, simultaneamente, que o EDRF e o óxido nítrico eram a mesma molécula [23, 24]. Uma série de experimentos realizados independentemente por Moncada e Ignarro deram respaldo a esta proposta. Estes pesquisadores observaram que, assim como o óxido nítrico, o EDRF apresenta uma meia vida extremamente curta na presença de oxigênio. Além disso, o EDRF reage com o ozônio produzindo um produto quimioluminescente, cujas propriedades químicas são idênticas ao produto da reação do ozônio com o óxido nítrico. Porém, a mais convincente evidência da identidade do EDRF como sendo o óxido nítrico originou-se de trabalhos realizados por Moncada e colaboradores [25], que usaram quimiluminescência para mostrar que as células endoteliais, de fato, liberam NO [26].

Atualmente, há evidências de que o NO é o principal regulador da pressão sanguínea e este controle é efetuado a partir da produção de óxido nítrico nas células endoteliais [27]. Neste processo observa-se que vários mensageiros químicos, incluindo alguns hormônios e acetilcolina (ACh), podem ativar a enzima NO sintetase endotelial (eNOS), ligando-se a receptores apropriados na membrana da célula endotelial. Estas ligações provocam a abertura de canais, que permitem que o cálcio penetre na célula, levando a um aumento na concentração de cálcio dentro da mesma, e ativando a enzima eNOS. O óxido nítrico produzido difunde-se da célula endotelial para a célula muscular, onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC), causando aumento dos níveis de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Esse aumento diminui a quantidade de Ca^{2+} livre na célula muscular, causando sua relaxação. Ou seja, a contração muscular requer Ca^{2+} , e a força de contração é reduzida quando o nível de Ca^{2+} diminui [16, 28, 29].

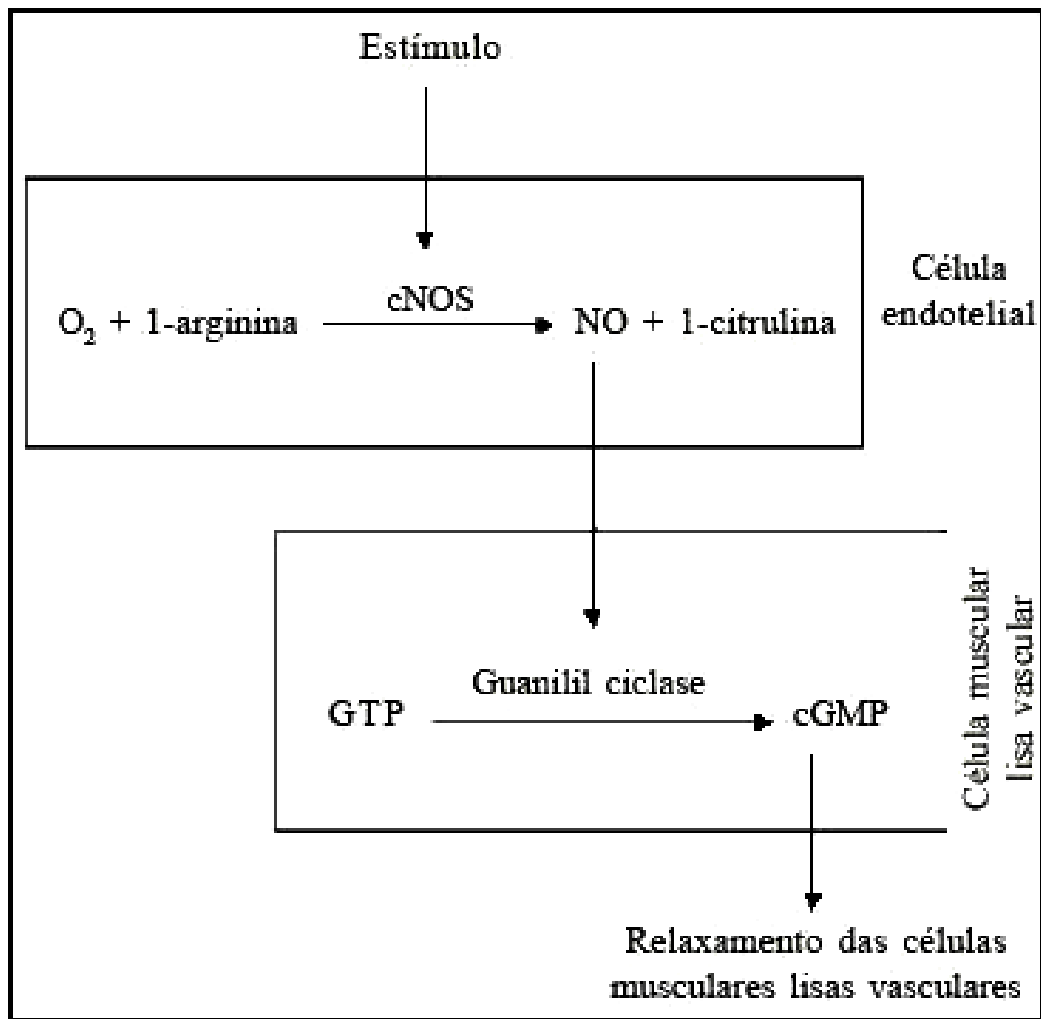


Figura 3. Esquema geral de produção de NO e relaxamento das células[30].

A manutenção da pressão sangüínea normal requer que as células endoteliais sintetizem constantemente NO. Quando este nível não é atingido, seja porque a produção é bloqueada pela administração de um inibidor eNOS ou em estados patológicos como a arteriosclerose, o músculo não relaxa apropriadamente. Então, a vasoconstrição resultante, aumenta a pressão sangüínea e pode ser responsável por algumas formas de hipertensão [27].

1.2.2. Ação no sistema imunológico

A resposta imunológica é a reação do corpo através da quais materiais estranhos são neutralizados ou destruídos e os macrófagos e as células

brancas do sangue, que são ativos no processo inflamatório, apresentam-se como elementos-chave para o sucesso desta resposta, uma vez que é capaz de engolfar e matar células de tumores e de bactérias. Para que um macrófago atue, ele precisa ser ativado por moléculas conhecidas como citocinas, que são liberadas por algumas células do sistema imunológico [31].

A descoberta de que o óxido nítrico também está envolvido nas atividades do sistema imunológico baseou-se em estudos iniciados na década de oitenta, quando se observou que existe uma correlação entre as atividades deste sistema e níveis elevados de nitrato na urina, de tal forma que a formação de nitratos aumenta de maneira acentuada durante o processo inflamatório. Alguns trabalhos mostraram que a citotoxicidade dos macrófagos contra células tumorais depende da presença da L-arginina e que a sua atividade é acompanhada pela formação de nitrito e citrulina. Assim, conhecendo-se de antemão a produção de NO a partir da L-arginina nas células endoteliais, fez-se possível concluir que um processo similar ocorre nos macrófagos ativados, e que o nitrito formado é proveniente do precursor, NO.

Deduziu-se, portanto, que os macrófagos constituem uma fonte de óxido nítrico no corpo e que as funções por eles desempenhadas são devidas à sua capacidade de formar NO, que por sua vez é convertido nos nitratos [26, 27, 32]. Os macrófagos apresentam a forma da enzima NO sintetase induzida (iNOS), cuja síntese é estimulada por citocinas. Uma vez iniciada a produção de óxido nítrico pela iNOS, ela se prolonga por várias horas e em concentrações altas o suficiente (da ordem de μM) para se mostrarem tóxicas à célula alvo [33]. O NO produzido pela iNOS difunde-se para fora dos macrófagos e penetra na célula tumoral, destruindo-a através da inibição de centros Fe-S em várias enzimas, incluindo a aconitase, uma enzima envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico. A Figura 4 ilustra a produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase induzida (iNOS) e seu mecanismo da atuação na destruição de células.

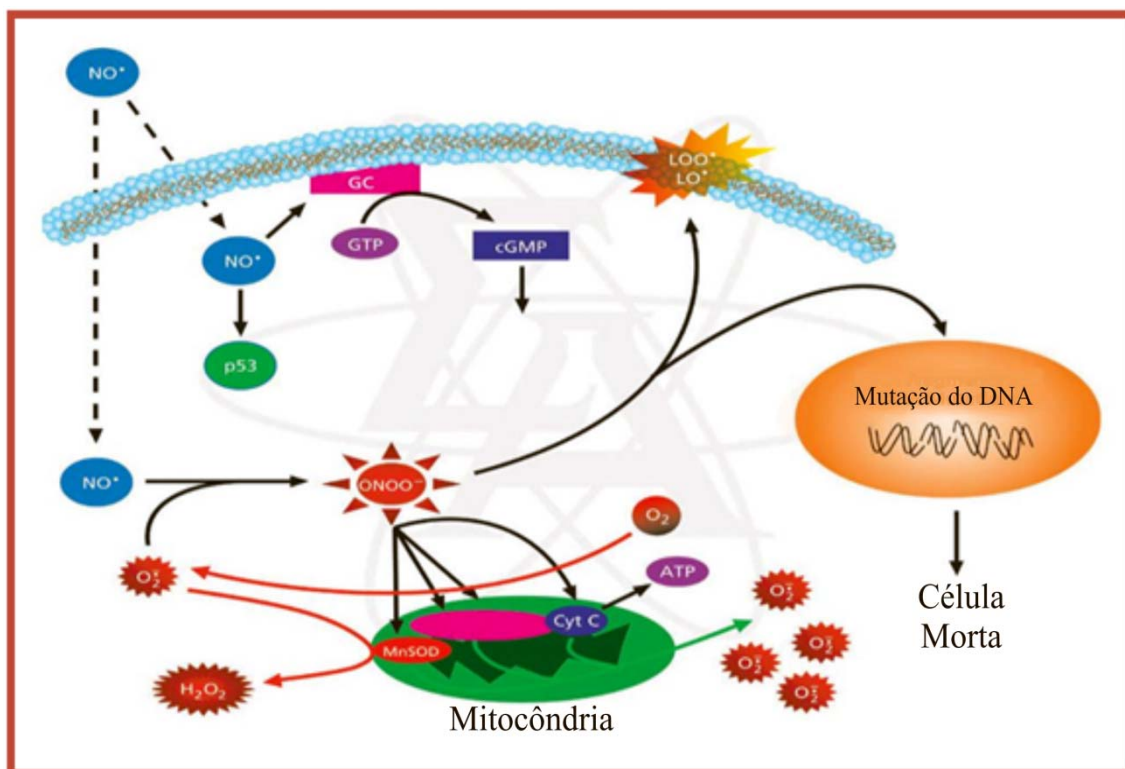


Figura 4. Esquema geral da reação do NO com espécies radicalares[15].

A liberação descontrolada de NO dentro das células é acompanhada por uma série de eventos, onde, após o NO em excesso reagir com as espécies O_2^- , O_2 ou H_2O_2 , ocorre à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), NO_2 , N_2O_3 e $HO^\bullet$. Estes radicais livres podem ocasionar clivagem do DNA ou até mesmo a morte celular [34, 35]. Por outro lado, a liberação controlada do NO dentro de uma célula alvo pode ser uma maneira de destruir células de tumores malignos.

1.2.3. Mensageiro no sistema nervoso central

Os primeiros neurotransmissores conhecidos, descobertos entre 1930 e 1960, eram todas aminas, moléculas orgânicas derivadas da amônia (NH_3), e que têm no grupo do nitrogênio seu principal mecanismo de sinalização. Na década de 1960, os pesquisadores começaram a perceber que também aminoácidos eram neurotransmissores. Nos últimos anos, o trabalho em diversos laboratórios de pesquisa [36], levou ao reconhecimento de uma quarta

e extraordinária classe de neurotransmissores, que inclui o óxido nítrico e o monóxido de carbono.

De fato, observou-se que o NO muitas vezes funciona como um neurotransmissor, porém, não se assemelha ou age como qualquer outro neurotransmissor conhecido [36-38]. Quando um neurônio é ativado, libera neurotransmissores que se encontram armazenados em vesículas especiais, em uma região de contato entre os neurônios, chamada sinapse. A célula receptora capta o neurotransmissor e é ativada. O NO não é armazenado em vesículas e não apresenta mecanismos especiais de liberação, sendo produzido onde e quando se faz necessário [37, 38].

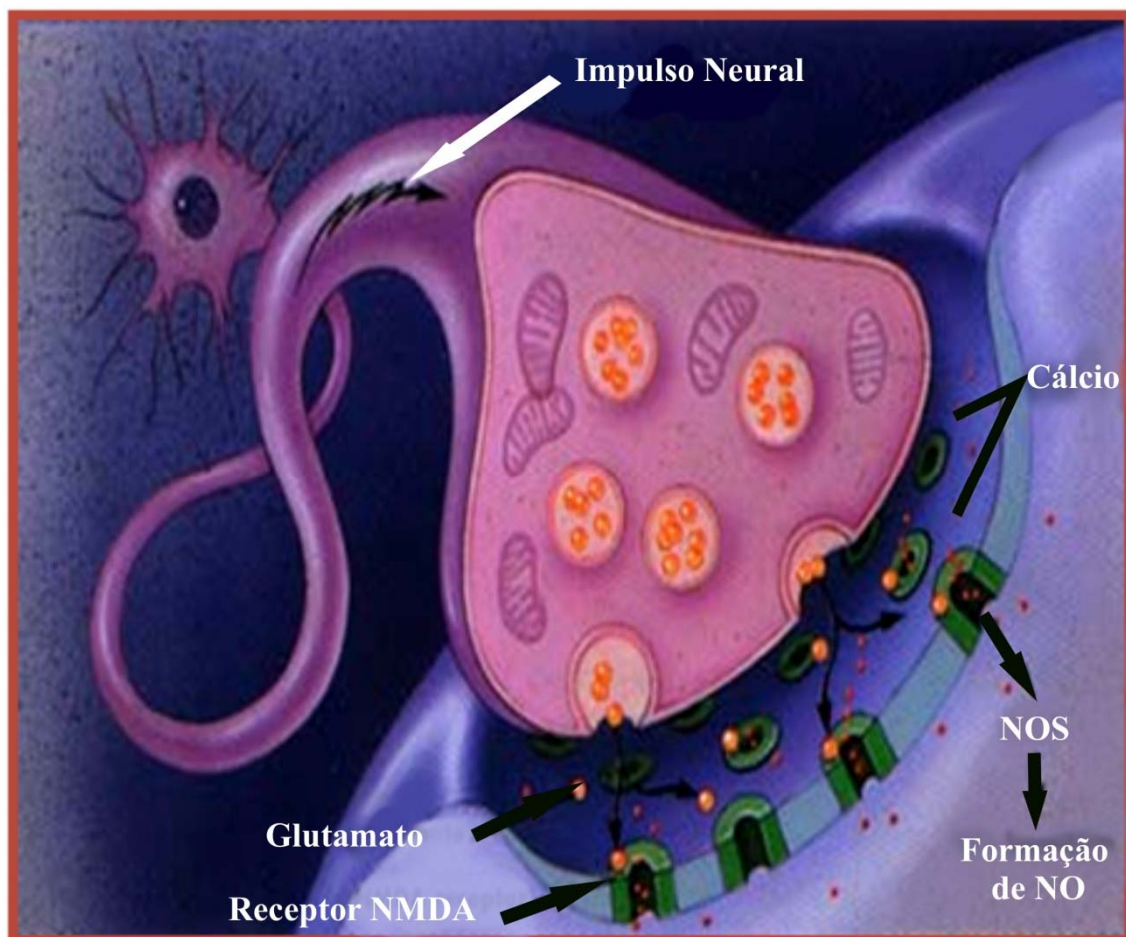


Figura 5. Função do óxido nítrico com neurotransmissor[15].

Além disso, enquanto a maioria dos neurotransmissores acopla-se precisamente a um receptor específico na superfície da célula, o NO não necessita de receptores específicos para penetrar nos mesmos e é capaz de

difundir-se livremente do ponto onde foi sintetizado até sítios intracelulares em células vizinhas [39, 40].

Supõe-se que o NO atue como mensageiro entre neurônios, coordenando a memória e as funções motoras [41]. Os neurônios produtores de NO também foram encontrados em muitos tecidos periféricos, incluindo os sistemas cardiovasculares, respiratórios e digestivos.

1.3. Doadores e Transportadores de NO in Vivo

Os reagentes químicos mais utilizados como doadores contínuos de NO em condições fisiológicas são: a nitroglicerina (NG), o nitroprussiato de sódio (NPS) e a S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) [42]. Além destes compostos existem outros doadores de NO e que podem ser classificados nas seguintes classes: nitratos orgânicos, nitritos orgânicos, derivados floxanos, complexos ferro-nitrosila e nitrosotiois.

Os floxanos, nitratos e nitritos orgânicos reagem com os tióis endógenos para formar intermediários RSNO que são responsáveis pela liberação de óxido nítrico. A ação destas classes de doadores de NO depende da presença de RSH. Quando este é consumido em grandes quantidades, sua disponibilidade diminui, causando tolerância a estes medicamentos. Os nitratos e nitritos mais comuns são o dinitrito de isosorbida, tetranitrato de pentaeritritol, nitrito de amila e a NG [43]. A NG foi utilizada durante mais de 100 anos para tratamento de angina e outros problemas de circulação [44].

O óxido nítrico produzido pela mediação da enzima NOSc é responsável pela vasodilatação. Essa função biológica do NO⁰ implica no estímulo da guanilato ciclase, causando a relaxação da musculatura lisa. Isso significa que o NO⁰ deve ser transportado da NOSc até a guanilato ciclase. Entretanto, no meio celular e no plasma há muitas espécies capazes de desativar imediatamente o NO, como por exemplo, O₂, O₂⁻ e grupos heme de proteínas. Dessa forma, o NO *in vivo* apresenta uma meia vida (t_{1/2}) de aproximadamente 0,1 s. Portanto, o NO deve ser estabilizado por uma molécula transportadora que prolonga a sua meia vida, mantendo sua atividade biológica [45].

Tióis (RSHs) de baixo peso molecular, encontrados no plasma humano [8], representam uma importante classe de moléculas biológicas, sendo facilmente nitrosados e geram os nitrosotióis (RSNOs) que são mais estáveis que o NO. Os RSNOs são metabólicos endógenos de NO⁰ detectados no meio intra e extracelulares e apresentam muitas das propriedades biológicas atribuídas ao NO, como a vasodilatação de veias e artérias e a inibição da agregação plaquetária [46]. RSHs e RSNOs são considerados espécies fundamentais no mecanismo de transferência de NO, *in vivo* [47].

A S-nitrosoglutationa (GSNO) [47] juntamente com S-nitrosoproteínas [48], e S-nitroso-derivados de hemoglobina [49] já foram identificados como compostos endógenos fundamentais no armazenamento e transporte de NO [48, 50]. A GSNO e outros RSNOs, já foram identificados nos eritrócitos, leucócitos, nos tecidos cerebrais e no plasma [51-57]. Pode-se observar que a molécula é um tripeptídeo com o grupo SNO ligado ao resíduo da cisteína.

Os RSNOs apresentam um grande potencial de aplicação como drogas terapêuticas no tratamento de angina e outros problemas circulatório, devido à sua habilidade de liberar NO⁰, *in vivo* [47]. Além de vasodiladores, os RSNOs endógenos atuam como broncodiladores [58], e sua deficiência é observada em processos asmáticos. Já foi demonstrado que a GSNO protege o epitélio pulmonar contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade [59]. De maneira geral, considera-se que os RSNOs protegem as células contra a toxicidade gerada nos processos de stress oxidativo [60].

1.4. Aplicações Farmacêuticas de Complexos Metálicos

A atividade farmacológica dos complexos metálicos, em geral, depende do metal, do ligante, ou de ambos. Porém, o mecanismo de ação de certos fármacos envolvendo metais é complexo, e a maioria ainda necessita de melhor entendimento. É importante que esses mecanismos sejam bem esclarecidos para que seja aumentado a eficiência dos fármacos e diminuídos seus efeitos colaterais.

A modelagem molecular de complexos metálicos para fins terapêuticos envolve o delineamento de algumas etapas que possibilitam a absorção do

fármaco pelo organismo: hidrólise do composto, ligação em sítio protéico, transporte pela membrana celular e interação com alvo molecular[61]. O desenvolvimento dessas etapas possibilitou a aplicação de uma série de compostos em que geralmente o metal está associado a substâncias orgânicas, tais como certos suplementos minerais como: manganês, cromo, ferro, cobalto, níquel e cobre[62-64].

O nitroprussiato de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, vasodilatador útil no controle da pressão arterial, especialmente em casos de emergência, é um exemplo de complexo metálico que carrega um ligante ativo (ligante nitrosilo) [41, 65]. O uso desses compostos encontra, às vezes, limitação devido às reações secundária indesejadas. No caso dos nitrosilo compostos, a reação desejada é a liberação de óxido nítrico.

Algumas alternativas para controle da liberação seletiva de NO a partir de compostos de coordenação são viáveis clinicamente, como a indução luminosa (terapia fotodinâmica) e a redução monoelétrica do NO^+ coordenado. Ambas levam em consideração a baixa afinidade observada entre o ligante NO e alguns íons metálicos. Tal fato mostra que a fotoquímica e os processos eletroquímicos podem ser utilizados para modelar diferentes processos bioquímicos [65].

Fármacos, cujo centro metálico é o rutênio, possuem boa aplicação clínica, principalmente por ser baixa a toxicidade do íon metálico quando coordenado [66]. Isto se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas desse íon metálico com as do íon ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por excesso de ferro, como a transferrina e a albumina. Alguns autores acreditam que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo [66].

Lembrando que a toxicidade do metal também está relacionada ao estado de oxidação, pode-se afirmar que outro fator da baixa toxicidade do rutênio é sua habilidade de atingir vários estados de oxidação (II, III e IV) em meio fisiológico. Talvez o envolvimento de complexos de rutênio em reações redox ocorra de maneira similar às dos compostos de ferro, ou seja, na enzima citocromo oxidase, ou pela participação da glutatona ou pelo ascorbato, entre outros [66].

1.4.1. Nitrosilo Complexos de Rutênio

Nitrosilo complexos de Rutênio formam uma classe de compostos que podem ser utilizados como agentes potencialmente capazes de capturar ou liberar NO *in vivo* [66, 67]. Entre estes, o composto *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺, onde ([15]aneN₄)=1,4,8,12-tetraazaciclotetradecano [68], é um exemplo de espécie que libera NO quando reduzido pela norepinefrina, induzindo o relaxamento da artéria aorta. Além disso, esse macrocíclico também libera NO fotoquimicamente, apresentando igualmente capacidade vasodilatadora, quando irradiado com luz ($\lambda_{\text{irradiação}} = 355 \text{ nm}$). O rendimento quântico para esta fotoreação é cerca de 0,60 mol/einstein.

Os compostos K₂[RuCl₅NO] e [RuCl₃NO] são também exemplos de espécies que liberam NO após irradiação e sua capacidade como agentes vasodilatadores vem sendo explorada [69, 70], embora apresentem rendimento quântico menor que o complexo *trans*-[RuCl([15]aneN₄)NO]²⁺. Em 2000, Lang e colaboradores reportaram que a redução do composto *trans*-[Ru(cyclam)(NO)Cl]²⁺ (cyclam = 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano) leva à liberação de óxido nítrico vagarosamente, sugerindo que esse tipo de composto possa ser utilizado como um vasodilatador de longa duração [71].

Estudos recentes envolvendo o composto *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ com respeito à liberação de NO [72, 73], mostraram que o mesmo apresenta baixa toxicidade bem como seus prováveis metabólitos [74]. Testes em hipocampo de cérebro de rato [75], demonstraram a capacidade de esse complexo liberar NO em cultura. O complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ também exibe uma capacidade vasodilatadora semelhante a do nitroprussiato de sódio, um vasodilatador de emergência utilizado clinicamente.

Clarke e Gaul mostraram que, em sistemas do tipo *trans*-[Ru(NH₃)₄L(NO)]³⁺, a liberação de NO após redução pode ser modulada variando-se o ligante L na posição *trans* ao óxido nítrico [76]. Assim, a facilidade de liberação do NO pelo composto *trans*-[Ru(NH₃)₄P(OEt)₃(NO)]³⁺ após redução, pode ser atribuída ao efeito *trans*-labilizante do trietilfosfito, sendo responsável pela atividade biológica desse complexo. Infelizmente, a forte natureza π -receptora deste ligante, também facilita o ataque do íon OH⁻ ao NO coordenado, levando à formação de NO₂⁻ em pH fisiológico.

A diminuição da concentração de óxido nítrico no organismo pode levar a uma crise hipertensiva. Por outro lado, a superprodução de NO é um fator agravante em doenças como diabetes, artrite, epilepsia e choque séptico. A produção excessiva de NO ocorre, por exemplo, quando o nível de bactérias circulando no sangue está alto, estimulando a enzima i-NOS (óxido nítrico sintetase induzida) a produzir NO [28].

Ainda não existem drogas disponíveis comercialmente para o tratamento dos casos em que ocorre produção excessiva de NO. Entretanto, em 1995, Johnson e Mathey divulgaram resultados de testes utilizando os complexos de rutênio $K[Ru(Hedta)Cl]$ (Hedta = ácido etilenodiaminotetraacético) e $[Ru_2(ttha)(H_2O)_2]^{2-}$ (ttha = trietilenotetraminahexaacetato), como potenciais e eficientes capturadores de NO em sistemas biológicos [77].

1.4.2. Nitrosilo complexos de Ferro

Os diferentes doadores de NO utilizados, o nitroprussiato de sódio (Figura 6) é o único complexo metal-nitrosilo usado clinicamente em emergências cardíacas. Comercialmente é conhecido como Nipride® ou Nitropress® [78, 79].

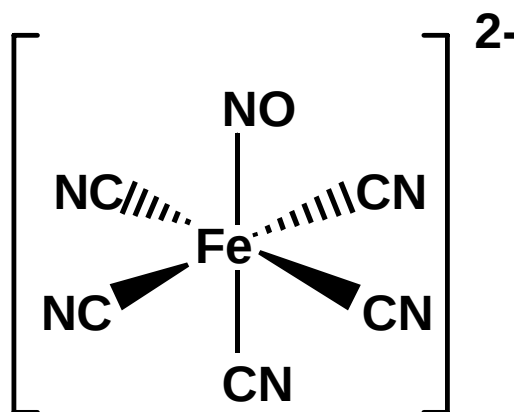
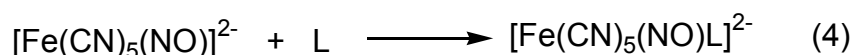


Figura 6. Estrutura química do íon nitroprussiato.

A liberação de NO por este composto, têm sido postulada ocorrer através de uma transferência de elétron do Fe^{2+} ou CN^- para o íon nitrosônio (NO^+), com posterior liberação de NO, o que fornece imediato alívio da alta

pressão sangüínea, por relaxamento da musculatura vascular constrita. A redução do $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ leva à formação do $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{3-}$, que libera CN^- levando ao pentacoordenado $[\text{Fe}(\text{CN})_4(\text{NO})]^{2-}$, a qual é a espécie libertadora do NO [80].

A reação do nitroprussiato com nucleófilos (L) tais como aminas, mono e di-aminoácidos, carbânions, tióis e acetona tem sido relacionada à atividade biológica deste íon [81]. Essa reação se processa via ataque inicial do nucleófilo no átomo de nitrogênio (Equação 4), isto é,



O grupo $\text{N}(\text{O})\text{L}$ pode então ser removido da esfera de coordenação do metal. Algumas vezes o ânion tiolato, por exemplo, de uma cisteína localizada na parte exposta de uma proteína endógena ou peptídeo, reage com o NO deste ânion para formar um intermediário reativo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\{\text{N}(\text{O})\text{SR}\}]^{3-}$. O esquema mostrado na Figura 7 ilustra estes dois possíveis caminhos[80].

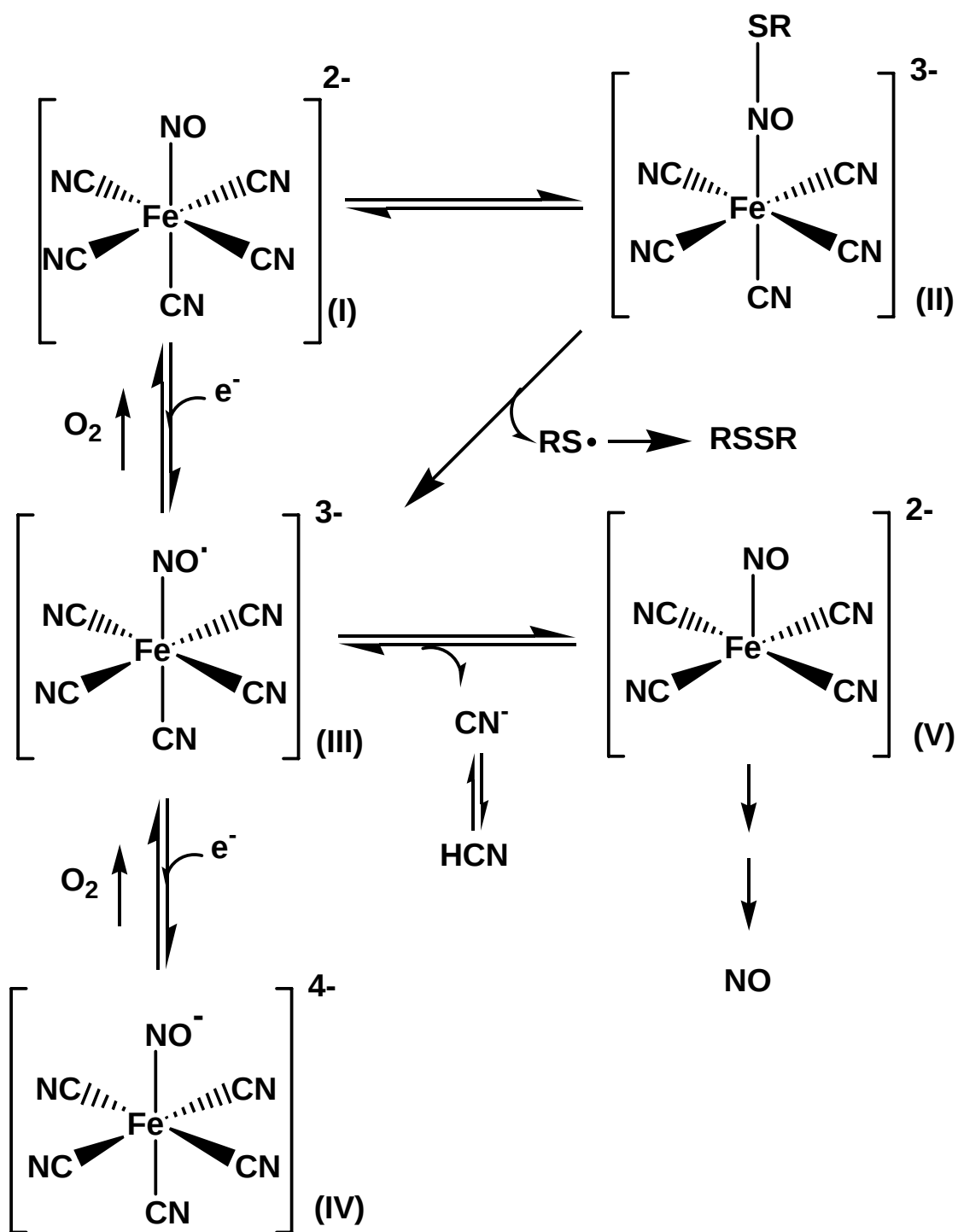


Figura 7. Mecanismo proposto para a dissociação do óxido nítrico no tecido vascular pelo nitroprussiato de sódio[82].

Sabe-se que o NPS induz uma resposta fisiológica de vasodilatação muito rápida, que fica evidente após alguns segundos da administração; sendo que o efeito de vasorelaxação é atribuído à liberação de NO do complexo. O NPS pode reagir com vários compostos presentes nas células de mamíferos, porém, muitos desses processos são lentos demais. O único processo rápido o suficiente para ser responsável por uma ação vasodilatadora tão rápida é a reação entre o complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ e o ânion tiolato que pode estar ligado à membrana da parede celular ou estar livre no plasma sanguíneo. Vários compostos do meio celular contêm tióis (RSH), sendo a mais importante a L-cisteína, a homocisteína e a glutatona.

Estudos fotoquímicos têm revelado que a luz é responsável pela liberação de íons cianeto [83-85]. Além disso, o relaxamento de aortas de coelhos, alcançado com a administração de solução aquosa irradiada do $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ ou do seu análogo $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{3-}$ é consideravelmente menor do que o efeito causado pela solução não irradiada. A fotoquímica do $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ e do $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2]^{3-}$ tem sido alvo de inúmeras investigações. A foto-oxidação do centro metálico e a solvatação do ligante NO é entendida como sendo a reação primária para as soluções tanto aquosas quanto não aquosas de NPS ($\lambda_1 = 436 \text{ nm}$), onde a foto-redução seguida de uma rápida liberação do ligante CN^- é a reação induzida somente por radiações mais energéticas ($\lambda_1 = 313 \text{ nm}$) [86-88].

Em 2000, Hauser e colaboradores reportaram as propriedades do *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{Cl}](\text{ClO}_4)$ e *trans*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})(\text{NO})\text{I}]\text{I}$, que foram isolados pela reação do complexo *cis*- $[\text{Fe}(\text{cyclam})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ e hidroxilamina. Ambas as espécies são classificadas como do tipo $\{\text{Fe-NO}\}^7$ e o óxido nítrico está coordenado ao metal na sua forma angular, formando um ângulo Fe-NO de $144.0(4)^\circ$ [89]. Em 2003 Siri e colaboradores [90] decidiram explorar a reatividade de nitrosilo complexos de Ferro ligados ao cyclam e concluíram que somente o isômero *cis* estava apto a liberar NO sob condições brandas, porque o efeito π -backbonding era mais pronunciado para o *cis*, correspondendo a um grupo FeNO quase linear. O isômero *trans* é estável sob as mesmas condições e pode oxidar sob atmosfera de oxigênio.

Recentemente, um interessante estudo com o composto $\text{Na}[\text{Fe}_4\text{S}_3(\text{NO})_7]$, conhecido como RBS (Roussin's Black Salt) [91], demonstrou que o mesmo apresenta liberação fotoquímica de NO quando irradiado com luz ($\lambda = 354 \text{ nm}$, solução aquosa $\text{pH} = 5,0$). Além disso, o composto RSB pode liberar NO efetivamente em culturas de células após irradiação, causando a morte dessas células e, em baixas concentrações (10 nM) apresenta atividade fotocitotóxica, causando a morte de células de melanoma (câncer de pele). Entretanto, a toxicidade dos subprodutos da fotorreação indica que tal composto não seria um bom candidato a ser utilizado como um medicamento de uso sistêmico, não sendo descartada, entretanto, a sua aplicação tópica [91].

1.5. A Importância Biológica dos aminoácidos

Todos os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α). Eles diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam a solubilidade do aminoácido em água [92].

Todos os aminoácidos são derivados de intermediários da glicólise, do ciclo do ácido cítrico ou da via das pentoses fosfato. O nitrogênio entra nestas vias através do glutamato e da glutamina. Algumas vias são simples, outras não. Dez dos aminoácidos estão distantes dos seus precursores iniciais por apenas um ou poucos passos enzimáticos. Para os demais, como para os aminoácidos aromáticos, as vias biossintéticas são mais complexas.

A cisteína é um aminoácido (Figura 8) que pode ser encontrada em várias proteínas por todo corpo. O seu nome tem origem na palavra grega *kustis*, significando "bexiga", pois foi isolada inicialmente a partir de cálculos renais (sob a forma de cistina RSSR). A cisteína possui um grupo tiol na sua cadeia lateral e é principalmente encontrado em proteínas e no tripeptídeo glutathione. Quando exposto ao ar, e sob determinadas condições fisiológicas (incluindo no interior de proteínas), a cisteína oxida-se formando cistina, composta por duas cisteínas unidas por uma ligação dissulfureto [92].

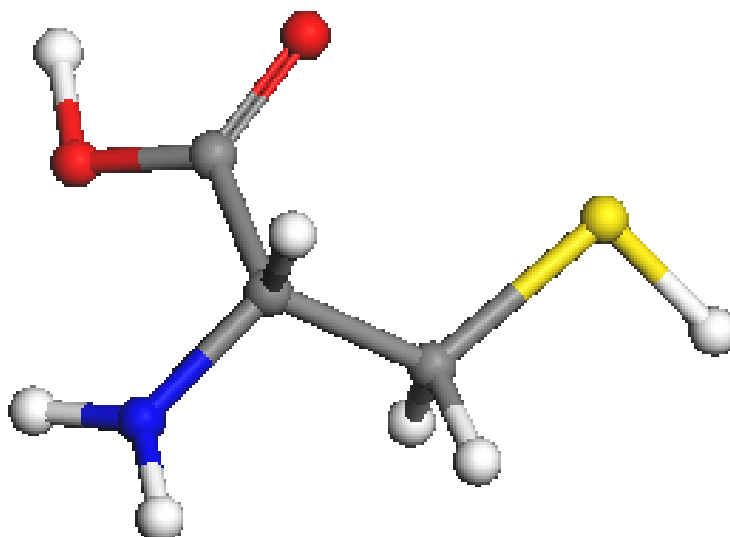
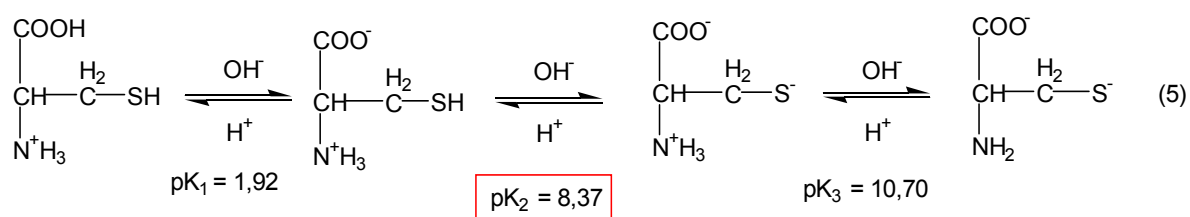


Figura 8. Estrutura química da L-cisteína.

A cisteína tem um papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas. Ao formarem ligações dissulfeto entre os seus grupos tiol, aumentam a estabilidade molecular. A insulina é um exemplo deste tipo de ligações, pois é formada por dois péptidos ligados por duas destas ligações dissulfeto [92].

Como o pKa deste grupo é de 8,37 a sua atividade química pode ser regulada pelo ambiente em que se enquadra (Equação 5) [92].



O tripeptídeo glutathione, (GSH) Figura 9, é o tiol presente em maior quantidade no meio intracelular, estando envolvido direta e indiretamente em vários fenômenos biológicos de importância fundamental. As múltiplas funções da GSH se refletem no interesse crescente por essa molécula em diversas áreas de estudo como, por exemplo, as que envolvem mecanismos enzimáticos, biosíntese de macromoléculas e os sistemas imunológico e endócrino, entre outras.

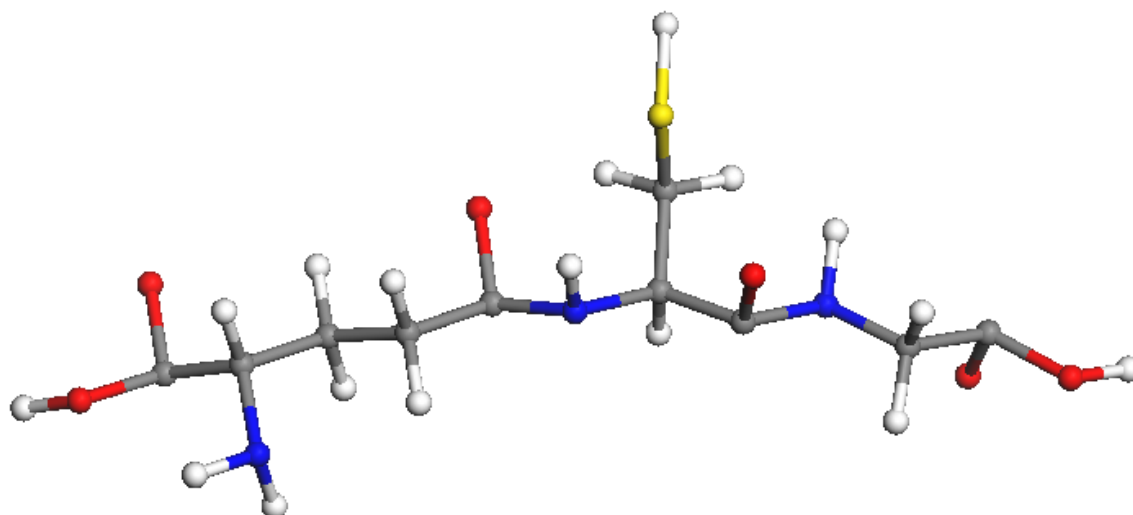


Figura 9. Estrutura química da glutathiona (GSH).

A glutathiona atua como coenzima em várias reações, pois se conjuga com compostos exógenos e com compostos gerados no metabolismo, como os estrógenos [93, 94]. Compostos com centros eletrofílicos podem se conjugar com a GSH, que é excretada com diferentes espécies [94]. Da mesma forma, a atividade de várias enzimas é influenciada pela GSH e outros RSHs, o que reflete a importância fisiológica deste tiol.

A irradiação de tecidos biológicos com radiação ultravioleta produz uma diminuição da concentração celular de GSH levando a um aumento da concentração de GSSG. Verificou-se que a administração de vários tióis protege as células da radiação nos níveis intracelulares [95]. Esse feito de proteção da GSH pode ser explicado considerando-se a competição entre tiol e O_2 pelos produtos de irradiação [95].

Dessa forma, formam-se os radicais tiolato, $RS^\bullet$, os quais reagem entre si formando o dímero RSSR. Entretanto, se os radicais $RS^\bullet$ reagem com oxigênio molecular levando à formação de radicais superóxido, os quais oxidam outras moléculas, formando outros radicais no meio celular. Dessa forma, a reação se propaga e existe uma grande possibilidade de destruição de várias moléculas, incluindo o material genético.

A metionina é o segundo aminoácido geneticamente codificado que contém um átomo de enxofre (Figura 10). Este aminoácido pode ser classificado como glicogênico porque é metabolizada via ácido pirúvico através da succinil-CoA. A metionina é convertida em S-adenosil metionina por uma

reação dependente de ATP. Ela funciona como um importante doador de grupo metil no organismo [92].

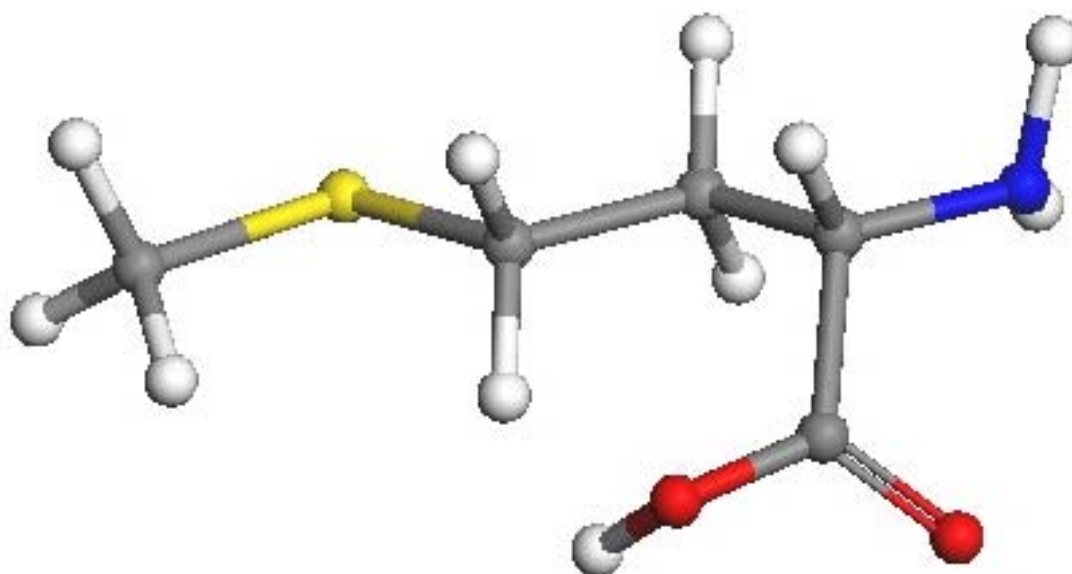


Figura 10. Estrutura química da metionina.

A Histidina (Figura 11) é um dos aminoácidos codificados pelo código genético, sendo, portanto um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Foi descoberto em 1896 (KOSSEL, HEDIN). A histidina tem um grupamento imidazol ligado à alanina. O grupamento R da histidina possui um valor de pK próximo de 7, sendo único aminoácido com esta propriedade [92].

Em pH fisiológico, parte da cadeia lateral está carregada, e parte não está carregada. A histidina é hidrofílica e tende a se situar na superfície de proteínas. Os nitrogênios do anel imidazol são bons nucleófilos e bons receptores de prótons. Devido a sua reatividade favorável, a histidina ocorre no centro ativo de muitas enzimas, sendo particularmente útil em reações ácido-base [92].

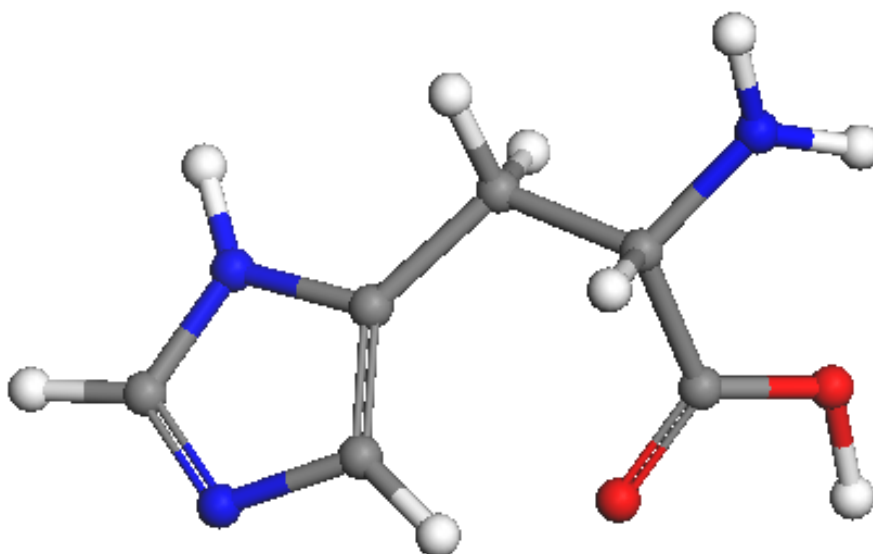
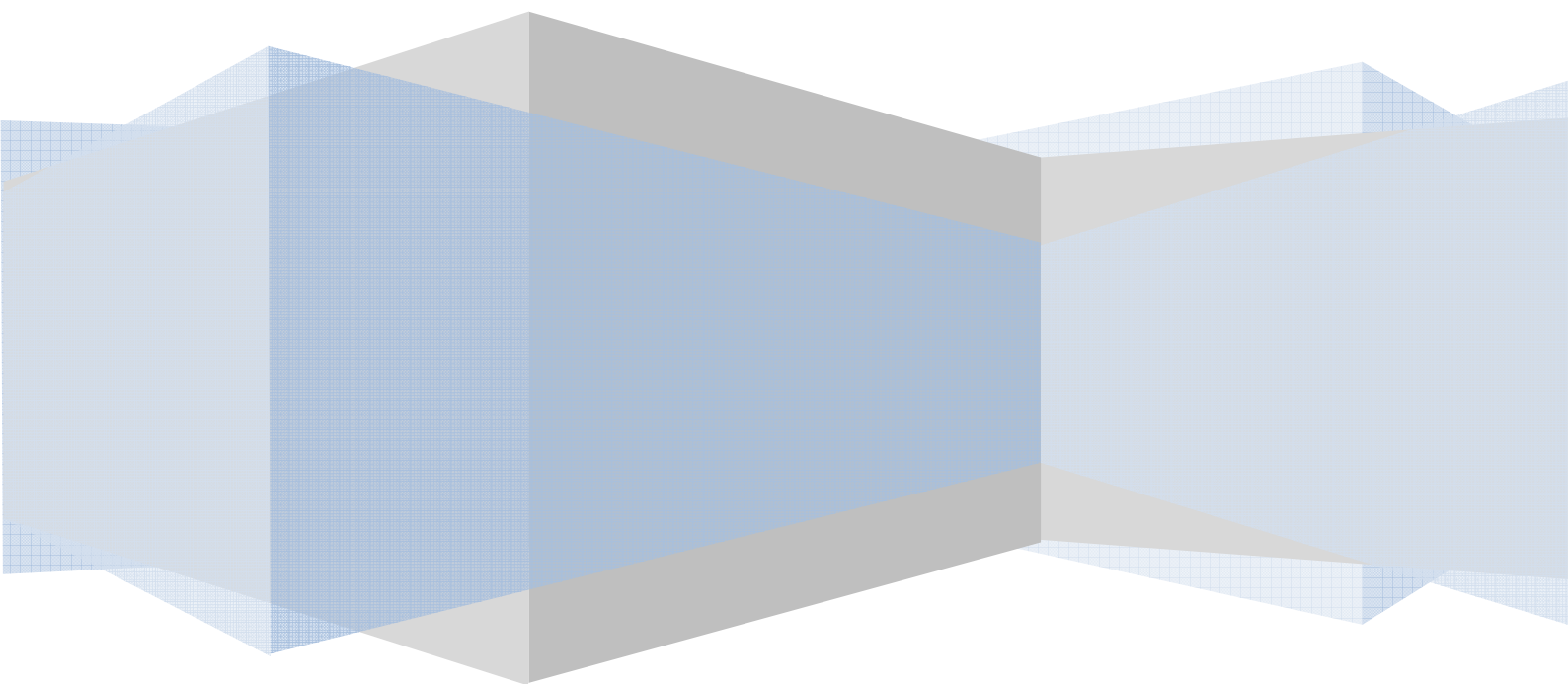


Figura 11. Estrutura química da histidina.

Objetivos



2. OBJETIVOS

Doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam espontaneamente ou são metabolizadas. Nitroprussiato de sódio, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, faz parte de uma classe de compostos que liberam NO espontaneamente e é o único complexo metálico usado clinicamente[82]. Problemas associados com o uso de nitroprussiato incluem suscetibilidade a fotólise e ação oxidativa do sistema imune, no qual conduz à liberação de cianeto. As reações com redutores biológicos, tais como os tiolatos, são muito importantes para que possa entender a liberação de NO a partir dos nitrosilo complexos no meio biológico. Por isso, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar e monitorar as reações dos íons complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ e *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, glutathiona, metionina e histidina, através de técnicas espectroscópicas e cinéticas para a elaboração de uma proposta de mecanismo de reação.
- Analisar a diferença de reatividade dos nitrosilo complexos frente aos redutores utilizados.

Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e soluções

Argônio

Argônio comercial, de procedência WHITE MARTINS (Fortaleza, CE), foi utilizado nos experimentos à atmosfera inerte. Possíveis traços de oxigênio foram eliminados da presença do gás, conduzindo o mesmo através de frascos lavadores contendo íons Cr^{II} em meio ácido e aquoso. Em seguida, o fluxo de gás foi conduzido por frascos borbulhadores, nos quais foram realizados os experimentos, através de conexões e torneiras adequadas a uma linha de vidro, com juntas esféricas.

Água

A água utilizada em todos os experimentos foi previamente bidestilada com KMO_4 e KOH , com o objetivo de remover traços de íons e eliminar qualquer tipo de matéria orgânica.

Ácido Trifluoracético

CF_3COOH , 99 % de pureza, de procedência Merck, foi utilizado nas alterações dos valores de pH das soluções empregadas nos experimentos eletroquímicos.

Ácido Acético

CH_3COOH , 99,7 % de pureza, de procedência Synth, foi utilizado na preparação dos tampões e nas alterações dos valores de pH das soluções empregadas nos experimentos cinéticos e eletroquímicos.

bis-tris-propano

$\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$, 99 % de pureza, de procedência Aldrich, foi utilizado na preparação dos tampões.

Solventes Orgânicos

Etanol absoluto, de procedência Synth, e Metanol, de procedência Merck, foram utilizados sem purificação prévia.

Tricloreto de Rutênio Hidratado

$\text{RuCl}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$, de procedência Aldrich, 99 % de pureza, foi utilizado na síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$.

Hexafluorofosfato de Amônio

NH_4PF_6 , de procedência Aldrich, foi utilizado como agente precipitante na síntese dos complexos.

Nitrito de Sódio

NaNO_2 , de procedência Merck, foi utilizado na síntese dos complexos *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ (onde L = Imidazol e Sulfito).

Ligantes

$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$ (2,2' bipyridina), de procedência Aldrich, 99 % de pureza, foi utilizado na síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$.

$\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ (Imidazol), de procedência Aldrich, 99 % de pureza, foi utilizado na síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ (onde L = Imidazol).

Na_2SO_3 (Sulfito de Sódio), de procedência Vetec, 98 % de pureza, foi utilizado na síntese do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}(\text{NO})](\text{PF}_6)_n$ (onde L = Sulfito).

Tiois

$C_3H_7NO_2S$ (L-cisteína), de procedência Aldrich, 97 % de pureza, foi utilizado na interação dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO)](PF₆)_n (onde L = Imidazol e sulfito).

$C_{10}H_{17}N_3O_6S$ (L-glutathiona), de procedência Acros, 98 % de pureza, foi utilizado na interação dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO)](PF₆)_n (onde L = Imidazol e sulfito).

$C_5H_{11}NO_2S$ (metionina), de procedência Aldrich, 98 % de pureza, foi utilizada nos experimentos cinéticos dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO)](PF₆)_n (onde L = Imidazol e sulfito).

$C_6H_9N_3O_2$ (L-Histidina), de procedência Aldrich, 98 % de pureza, foi utilizada na interação dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂L(NO)](PF₆)_n (onde L = Imidazol e sulfito).

$C_{21}H_{27}N_7Na_2O_{14}$ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida) de procedência Acros, 98 % de pureza, foi utilizada na reação dos nitrosilo complexos.

3.2. Aparelhos e Técnicas Experimentais

MEDIDAS CINÉTICAS

ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DAS REAÇÕES – UV-VISÍVEL

A caracterização espectroscópica na região do UV-visível foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo 8453 Diode-Array, acoplado a um banho termostatizado. As cinéticas de reação foram caracterizadas através do monitoramento das variações espectrais na faixa de 200-900 nm. Os intervalos de leitura variaram em um ciclo 2 em 2 s até 200 e 200 s.

As amostras foram analisadas em solução utilizando célula de quartzo retangular de caminho óptico de 1,0 cm. Adicionou-se 2,0 mL de nitrosilo complexo a 0,2 mL da solução de tiól previamente deaeradas já na cubeta. A concentração dos nitrosilo complexos das soluções variou-se de 1×10^{-5} a 1×10^{-3} mol L⁻¹. A homogeneização foi feita manualmente através de duas inversões rápidas na cubeta que foi posicionada imediatamente no espectrofotômetro para iniciar as medidas.

As medidas realizadas para identificação dos intermediários foram realizadas em um Stopped-flow modelo SX.18MV-R (Applied Photophysics). As cinéticas foram caracterizadas através do acompanhamento em 380 e 450 nm, em NaTFA 0,1 mol L⁻¹, pH = 3,5 e 7,0 e T = 25 e 37 °C.

ACOMPANHAMENTO CINÉTICO DAS REAÇÕES – INFRAVERMELHO

As medidas na região do infravermelho foram realizadas em um espectrofotômetro FT-IR Shimadzu, modelo IR-prestige, com intervalos de leitura de 60 s. Adicionou-se 1 mL de uma solução 0,01 mol L⁻¹ dos nitrosilo complexos em um cristal de CaF₂. Em seguida foram adicionados os tióis com excesso de 30 vezes. A obtenção dos espectros foi feita utilizando-se um acessório chamado de refletância difusa atenuada, na faixa de 1800 a 2100 cm⁻¹.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As medidas cromatográficas foram obtidas através de um sistema cromatográfico, HPLC Shimadzu, consistindo de duas bombas modelo LC -10AD, operando isocraticamente, detector de arranjo de diodos modelo SPD – M10A Shimadzu. Uma coluna c-18 Supelcosil LC-18 (5 μ m; 4,6 mm x 250 mm) ou coluna c-18 μ Bondapak Waters foi utilizada sob fluxo de 1 mL/min. Todas as fases móveis foram filtradas e deaeradas antes de uso.

ELETROQUÍMICA

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando-se um sistema eletroquímico da Bioanalytical System Inc., Modelo BAS100Bw. Empregou-se para tanto uma cela convencional de três eletrodos: platina, carbono vítreo e prata/cloreto de prata como eletrodos auxiliar, de trabalho e de referência, respectivamente. As análises foram realizadas usando H₃CCOOH/ H₃CCOONa 0,1 mol L⁻¹ e NaTFA 1,0 Mol L⁻¹ pH = 7 como eletrólito suporte.

ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

As medidas de RPE foram efetuadas utilizando-se um espectrofotômetro BRUKER ESR 300E a 77 K, operando na banda-X.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de, ¹H, foram obtidos em um espectrômetro AVANCE DPX 500 Bruker, a 500 MHz. Utilizou-se como padrão interno o composto 2,2'-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio.

ELETRODO DE NO

O eletrodo de NO mede a quantidade de óxido nítrico liberado, através de um sensor desenvolvido pela Amino-700 acoplado a um inNO-T, baseado na

determinação amperométrica direta do NO. As medidas foram efetuadas em solução de trifluoracetato de sódio (NaTFA) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi mantido em 3,5 para o complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃, e em 7,0 para o *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆).

3.3. Soluções

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE SÖRENSEN (Na₂HPO₄ / KH₂PO₄)

Inicialmente prepararam-se as soluções dos sais Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ utilizando as quantidades citadas abaixo:

Na₂HPO₄ $8,36 \times 10^{-2} \text{ Mol L}^{-1}$: Dissolvem-se 11,87 g de Na₂HPO₄ em água e completa-se até o volume igual a 1 litro.

KH₂PO₄ $5,7 \times 10^{-4} \text{ Mol L}^{-1}$: Seca-se o cristal de KH₂PO₄ a 110 °C, dissolve-se 0,07g em água e completa-se até o volume igual a 1 litro.

As soluções do ácido e da sua base conjugada foram misturadas, utilizando o volume apropriado para se obter o pH desejado, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Tabela de solução tampão de Sørensen (NaHPO₄-KH₂PO₄)

pH	Na ₂ HPO ₄ $8,36 \times 10^{-2} \text{ Mol L}^{-1}$ (mL)	KH ₂ PO ₄ $5,7 \times 10^{-4} \text{ Mol L}^{-1}$ (mL)
6,81	5,0	5,0
6,97	6,0	4,0
7,16	7,0	3,0
7,31	8,0	2,0
7,73	9,0	1,0
8,04	9,5	0,5

MÉTODO DE PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO $\text{H}_3\text{CCOOH}/\text{H}_3\text{CCOONa}$

Inicialmente prepararam-se as soluções de ácido acético e acetato de sódio utilizando as quantidades citadas abaixo:

H_3CCOOH 2 Mol L^{-1} : Dissolvem-se 121 mL de ácido acético glacial em 1 litro de água.

H_3CCOONa 2 Mol L^{-1} : Dissolvem-se 164,08 g de acetato de sódio anidro em 1 litro de água.

As soluções do ácido e da sua base conjugada foram misturadas, utilizando o volume apropriado para se obter o pH desejado, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Tabela de solução tampão ($\text{H}_3\text{CCOOH}/\text{H}_3\text{CCOONa}$)

pH	Acetato de sódio 2 Mol L^{-1} (ml)	Ácido acético 2 Mol L^{-1} (mL)
3,5	6,4	93,6
4,5	43,0	57,0

Volume total= 1 litro.

3.4. Tratamento dos Dados Experimentais

3.4.1. Medidas Cinéticas

As constantes de velocidades foram obtidas através da técnica espectrofotométrica convencional para reações lentas visto que as reações apresentaram-se com tempo de meia vida superior a 1 minuto.

Os dados experimentais de variação de absorbância em função do tempo para a reação em condições de pseudo-primeira ordem, e as constantes de velocidade observadas foram calculadas pela Equação 6;

$$A = A_0 \cdot \exp(-kt) + c \quad (6)$$

Onde:

A é a absorbância medida em cada tempo t;

A₀ é a absorbância no início da reação;

e k a constante de velocidade.

As constantes de velocidade observadas (*k*_{obs}) foram então estimadas pela correlação linear de ln (A_t–A_{inf}) contra o tempo para toda a extensão da reação, usando um programa iterativo de mínimos-quadrados do software Microcal Origin 5.0. Os coeficientes de correlação, *r*, foram sempre maiores do que 0,995.

3.4.2. Parâmetros de Ativação

Os parâmetros de ativação foram avaliados graficamente com base na expressão derivada da teoria do estado de transição (Equação 7) [96].

$$k_{\text{obs}} = \frac{kT}{h} \exp \left(\frac{-\Delta H^\#}{RT} \right) \exp \left(\frac{\Delta S^\#}{R} \right) \quad (7)$$

Desenvolvendo-se a equação 7 pode-se obtê-la em forma mais operacional (Equação 8) [96].

$$\ln \frac{k_{\text{obs}}}{T} = \ln \frac{k_b}{h} + \frac{\Delta S^\#}{R} - \frac{\Delta H^\#}{RT} \quad (8)$$

Onde:

k = Constante de velocidade;

T = Temperatura (K);

k_b = Constante de Boltzmann ($3,3 \times 10^{-24}$ cal K⁻¹);

h = Constante de Planck ($1,58 \times 10^{-34}$ cal s);

$\Delta S^\#$ = Entropia de ativação;

R = constante dos gases (8,314 J Mol⁻¹ K⁻¹);

$\Delta H^\#$ = entalpia de ativação.

Efetuada-se medidas em várias temperaturas e determinando-se as respectivas constantes de velocidade (k_{obs}) podem-se calcular os valores correspondentes a $\ln k_{\text{obs}}/T$.

Os valores de $-\Delta H^\#/R$ são obtidos dos coeficientes angulares originadas dos gráficos de $\ln k_{\text{obs}}/T$ versus $1/T$. Conhecendo-se os valores de $\Delta H^\#$, pode-se então aplicá-los na equação acima e determinarem-se os valores de $\Delta S^\#$.

A partir dos valores de $\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$, a energia livre de ativação, $\Delta G^\#$, pode ser diretamente calculada, conforme equação 9:

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\# \quad (9)$$

3.5. Sínteses

3.5.1. Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]

O complexo foi sintetizado de acordo com método citado na literatura [97].

3.5.2. Síntese dos complexos *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO₂)](PF₆) e *cis*-Na[Ru(bpy)₂SO₃NO₂]

Os complexos foram sintetizados de acordo com método citado na literatura [98].

3.5.3. Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃

150 mg (0,22 mmol) de *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO₂)](PF₆) foram dissolvidos em 15 mL de metanol sob fluxo de argônio e agitação. Em seguida adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de CF₃COOH 70%, deixando reagir por 1 hora. Após este tempo coletou-se o precipitado pela adição de uma solução aquosa (1 mL) saturada com NH₄PF₆. O sólido foi filtrado e estocado sob vácuo (Figura 12).

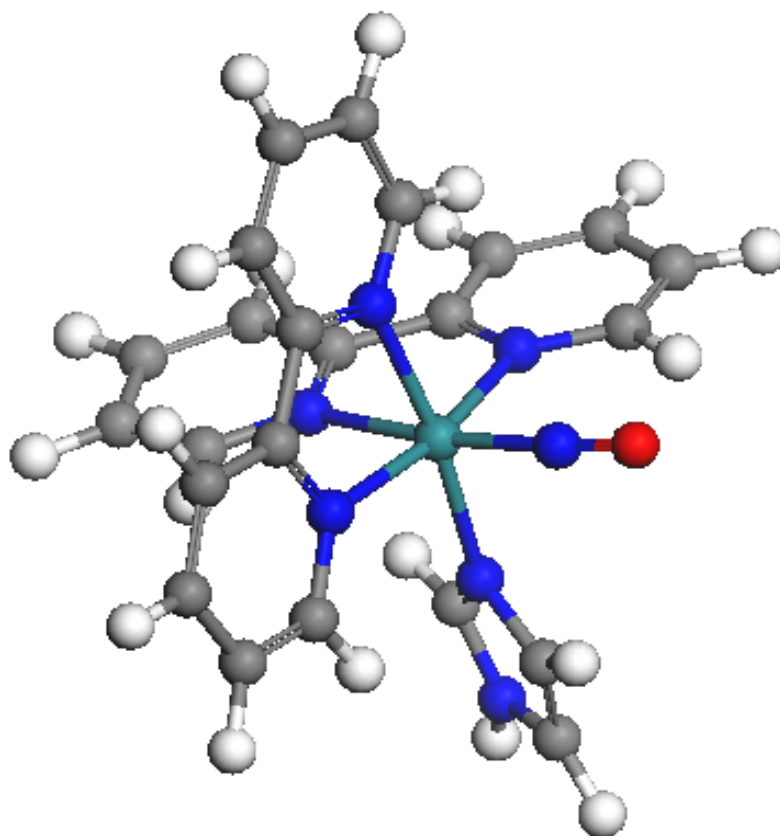


Figura 12. Estrutura química do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³.

3.5.3. Síntese do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆)

150 mg (0,27 mmol) de *cis*-Na[Ru(bpy)₂SO₃(NO₂)] foram dissolvidos em 15 mL de metanol sob fluxo de argônio e agitação. Em seguida adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de CF₃COOH 70%, deixando reagir por 1 hora. Após este tempo coletou-se o precipitado pela adição de uma solução aquosa (1 mL) saturada com NH₄PF₆. O sólido foi filtrado e estocado sob vácuo (Figura 13).

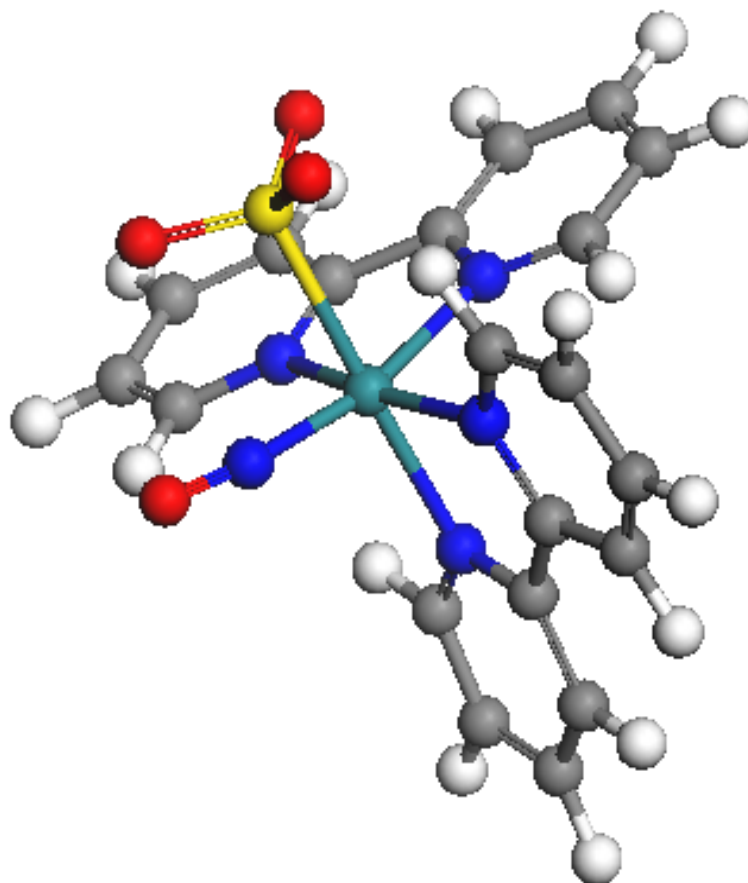
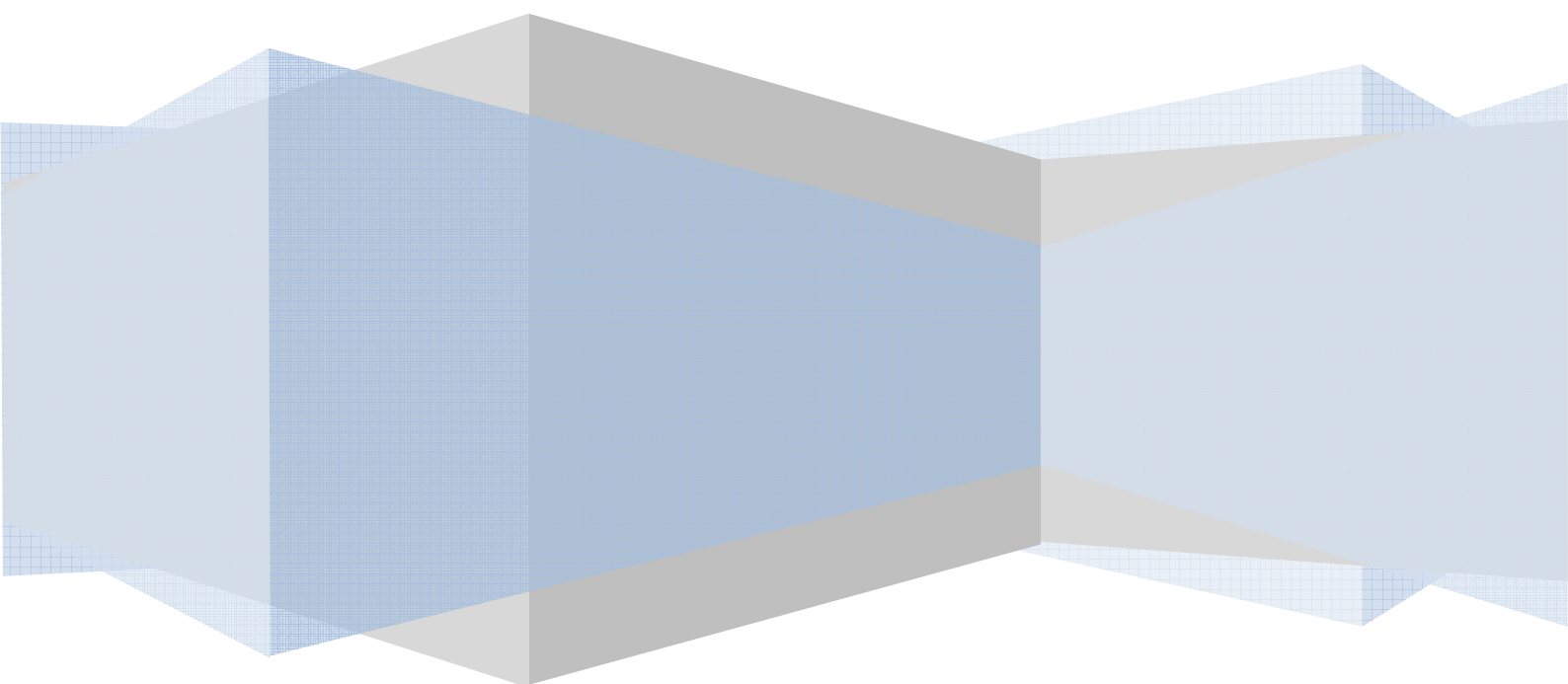


Figura 13. Estrutura química do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺.

Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Acompanhamento espectrofotométrico da reação de decaimento do primeiro intermediário e formação do segundo.

A Figura 14 mostra a variação espectral referente às reações do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)]^+$ com cisteína obtida através da técnica de stopped-flow. Os experimentos foram realizados em meio tamponado, a 25 e 37 °C, com a finalidade de investigar as reações em condições próximas as fisiológica (pH ~ 7,0). Foi observado que logo após adição dos tióis ocorre o aparecimento do primeiro intermediário com uma banda de absorção em torno de 450 nm, referente à formação do aduto entre o enxofre da cisteína e óxido nítrico. Devido a uma velocidade de reação muito rápida não foi possível acompanhar a formação dessa espécie, mesmo utilizando a temperatura de 25 °C e escala de tempo de milissegundos entre as medidas.

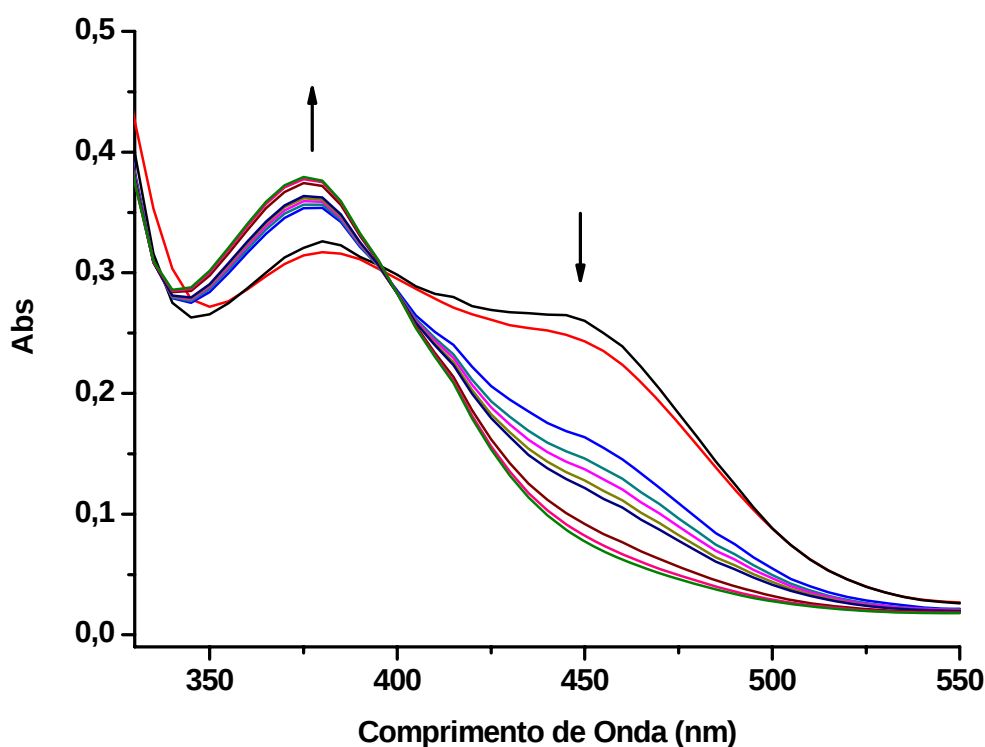
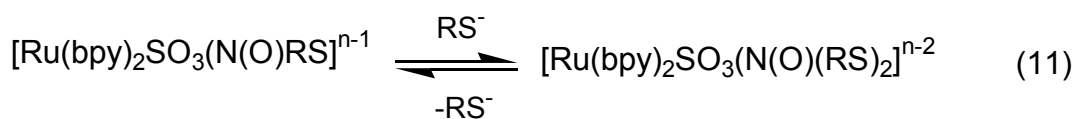
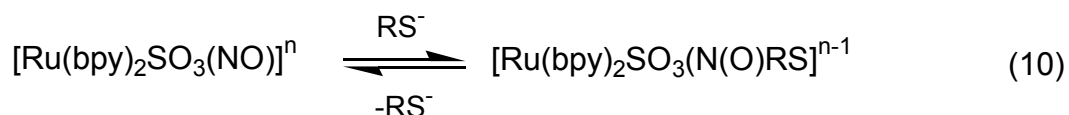


Figura 14. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)]^+$ com cisteína em pH = 6,5. Temperatura = 25 °C.

Com o desaparecimento da primeira espécie ocorre a formação do segundo intermediário com uma banda característica em 380 nm atribuída ao ataque da segunda molécula de RS^- ao aduto. Além disso, esta espécie é mais estável do que a primeira, visto que a velocidade de decaimento deste intermediário é menor do que o primeiro (Equações 10 e 11).



O estudo mecanístico da reação do nitroprussiato com OH^- esteve recentemente estendido a uma grande variedade de nitrosilo complexos com a fórmula $\{(\text{X})_5\text{MNO}\}^n$, onde X inclui ligantes de diferentes habilidades doadores ou receptor, como aminas, polipiridinas, cianeto, e assim sucessivamente [99, 100]. A maioria destes estudos foi realizada com rutênio, mas um quadro semelhante emerge com outros metais do tipo d^6 como Fe(II), Os(II), e Ir(III). As reações com OH^- são mecanisticamente simples; elas podem ser consideradas como reações do tipo ácido-base que envolve os seguintes passos: primeiro, OH^- forma o intermediário $\{(\text{X})_5\text{MN}(\text{O})\text{OH}\}$ que pode voltar para forma $\text{M}(\text{NO}^+)$ ou subsequente perder o próton rapidamente devido ao ataque de outro OH^- gerando o nitro complexo como produto final [100].

As reações com tiolatos são mais complicadas que as com OH^- , porque processos irreversíveis (isto é, processos redox intramolecular) operam subsequente para formação do aduto. As reações com nucleófilos que se ligam pelo átomo de nitrogênio (tais como: amônio e aminas, hidrazina, hidroxilamina, e azida) ligando a diferentes centros metálicos foram estudados, o qual conduz a evolução de gás (N_2 ou N_2O) como resultado das decomposições do aduto, mostrando que o mecanismo depende da estrutura do aduto metalonitrosil-nucleófilo [100, 101].

Na Figura 15 são apresentadas as curvas cinéticas do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3(\text{NO})]^+$ com quatro concentrações de cisteína, no qual mostra uma

constante rápida e outra lenta. O ajuste das curvas cinéticas foi feito utilizando uma equação de primeira ordem, pois o decaimento da banda em 450 nm corresponde à decomposição da espécie intermediária, tratando-se de um processo unimolecular. A formação do segundo intermediário com banda em 380 nm depende da decomposição da primeira espécie sendo um processo bimolecular e, portanto, ajustável a uma equação de crescimento exponencial dupla de primeira ordem.

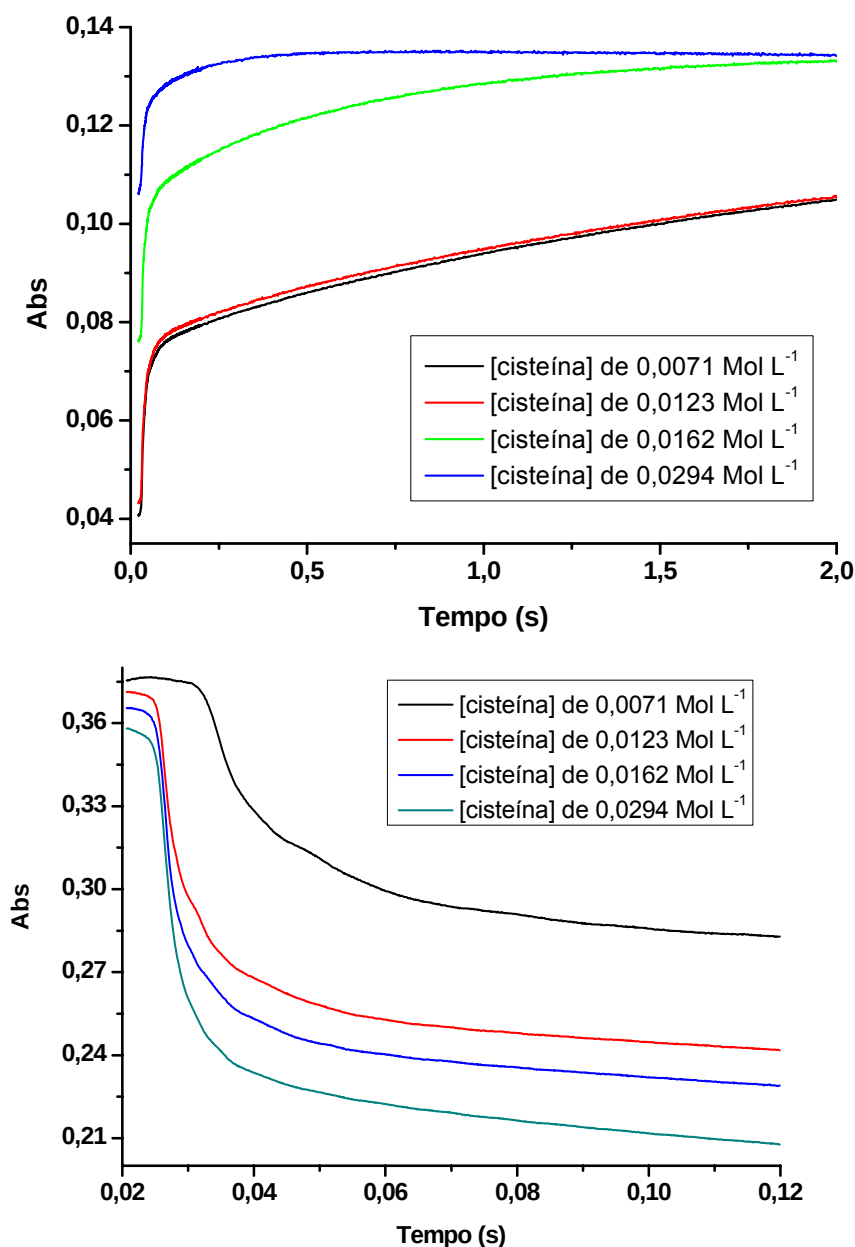
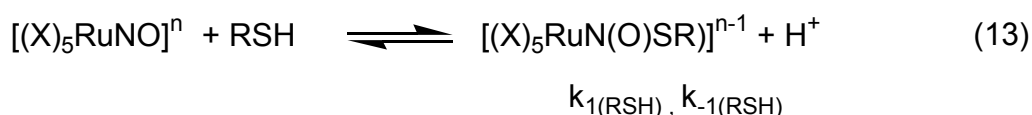
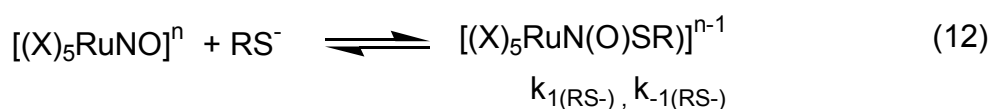


Figura 15. Curvas cinéticas correspondentes às variações espectrais das bandas em 380 e 450 nm, para a reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺ com cisteína.

Os valores de k_{obs} encontrados para o crescimento da banda em 380 nm são maiores do que os valores de decaimentos da banda em 450 nm, indicando que o crescimento desta banda não está relacionado somente à decomposição do intermediário $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3(\text{NO})\text{SR}]^{+n}$. Deve haver outras reações que estão ocorrendo em paralelo, como por exemplo, a formação da espécie $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3(\text{NO}^0)]^{+2}$. Além disso, a influência do pH tem que ser levado em consideração, visto que no meio haverá tanto RS^- como RSH .

De acordo com a literatura[100], reações deste tipo podem ocorrer de duas maneiras (Equações 12 e 13):



$$k_i = \frac{k_{1(\text{RS}^-)} k_a + k_{1(\text{RSH})} [\text{H}^+]}{k_a + [\text{H}^+]}$$

Considerando os valores de pK_a dos tióis [102], nota-se que o pH utilizado nesta reação encontra-se abaixo de 8,3 no qual vai existir a presença das duas espécies do tiol: RS^- e RSH . Nas tabelas 3 e 4 encontra-se as constantes de velocidade em função da concentração de cisteína e do pH, onde foi observado um aumento na velocidade em função da elevação do pH. A constante de velocidade no pH de 8,2 foi consideravelmente maior do que a k_{obs} realizado em $\text{pH} = 6,5$, mostrando que a reação do nitrosilo complexo com a espécie RS^- é mais favorecida.

Tabela 3. Valores de constantes de velocidade para reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺ com variação na concentração cisteína.

[RS] mol L ⁻¹	380 nm		450 nm
	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
7,10 x 10 ⁻³	6,77 x 10 ¹	4,60 x 10 ⁻¹	5,77 x 10 ¹
1,23 x 10 ⁻²	7,56 x 10 ¹	9,10 x 10 ⁻¹	6,31 x 10 ¹
1,62 x 10 ⁻²	8,60 x 10 ¹	1,29	7,16 x 10 ¹
2,94 x 10 ⁻²	1,06 x 10 ²	2,63	9,44 x 10 ¹

Tabela 4. Valores de constantes de velocidade para reação do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺ com variação na concentração de H⁺.

pH	380 nm	
	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)
6,5	4,04 x 10 ¹	5,3 x 10 ²
7,3	1,02 x 10 ²	4,38
8,2	2,18 x 10 ²	1,78 x 10 ¹

A reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína foi realizada em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH = 3,2 e T = 37 °C. Na Figura 16 encontra-se a variação espectral no qual ocorre a formação muito rápida de uma espécie com banda em torno de 450 nm. Com o decorrer do tempo, ocorre o desaparecimento deste primeiro intermediário e o aparecimento de outro com uma banda característica em 380 nm.

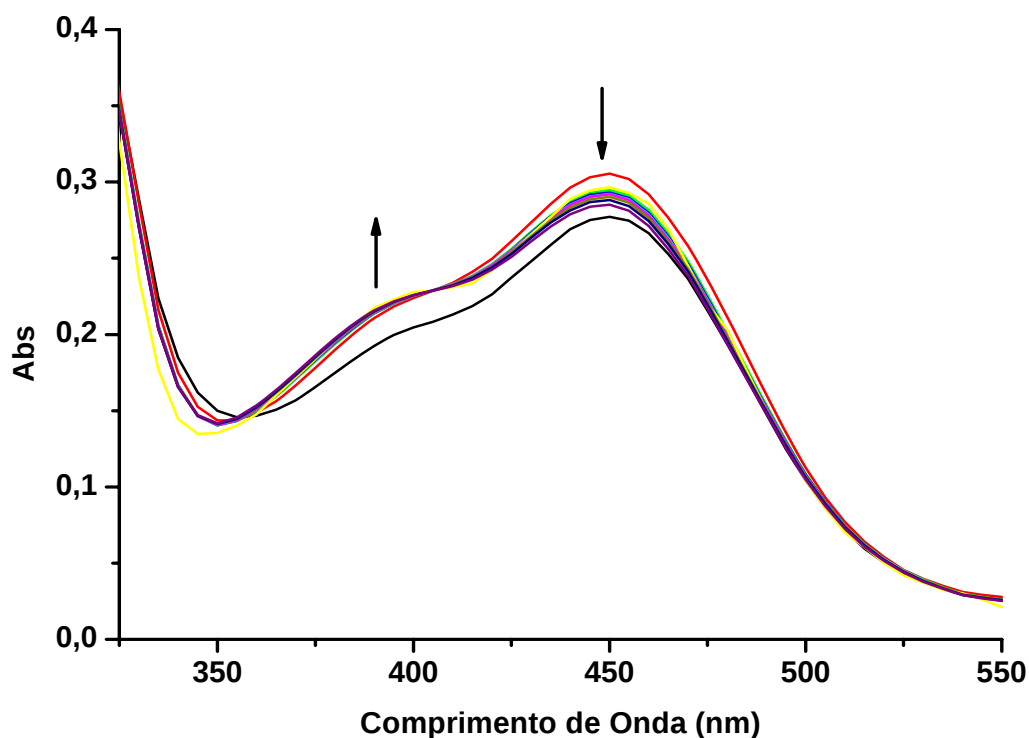
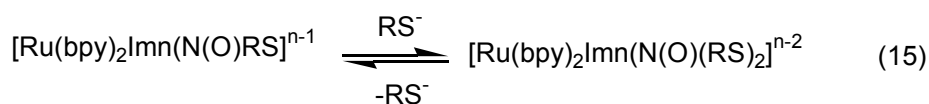
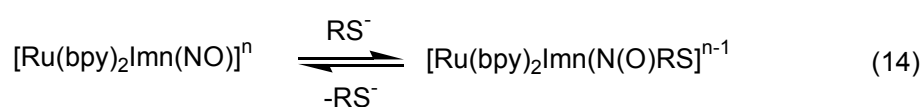


Figura 16. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína em pH = 3,2. Temperatura = 37 °C.

Mais uma vez nota-se que esta cinética segue o mesmo mecanismo proposto para a reação dos tióis com o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺ (Equações 14 e 15), ou seja:



Analisando os resultados obtidos na reação do nitrosilo complexo com diferentes concentrações do tiol, observou-se que o crescimento da banda em 380 nm permitiu o ajuste de uma equação de crescimento exponencial, porém os valores de k_{obs} encontrados para o crescimento dessa banda são maiores que os valores de decaimento da banda em 450 nm. Isso indica que o crescimento da

banda com absorção em 380 nm não está relacionado somente á decomposição do primeiro intermediário com absorção em 450 nm.

Além disso, a variação espectral mostra que o intervalo de tempo não foi suficiente para o desaparecimento da espécie com banda em 450 nm, o que contribui para discrepância entre os valores das constantes de decaimento e crescimento. Assim como foi observado para a reação com sulfito complexo, o pH utilizado contribui para esta diferença nas constantes de velocidade. Na Figura 17 encontra-se o gráfico referente à variação da k_{obs} em função da concentração de cisteína.

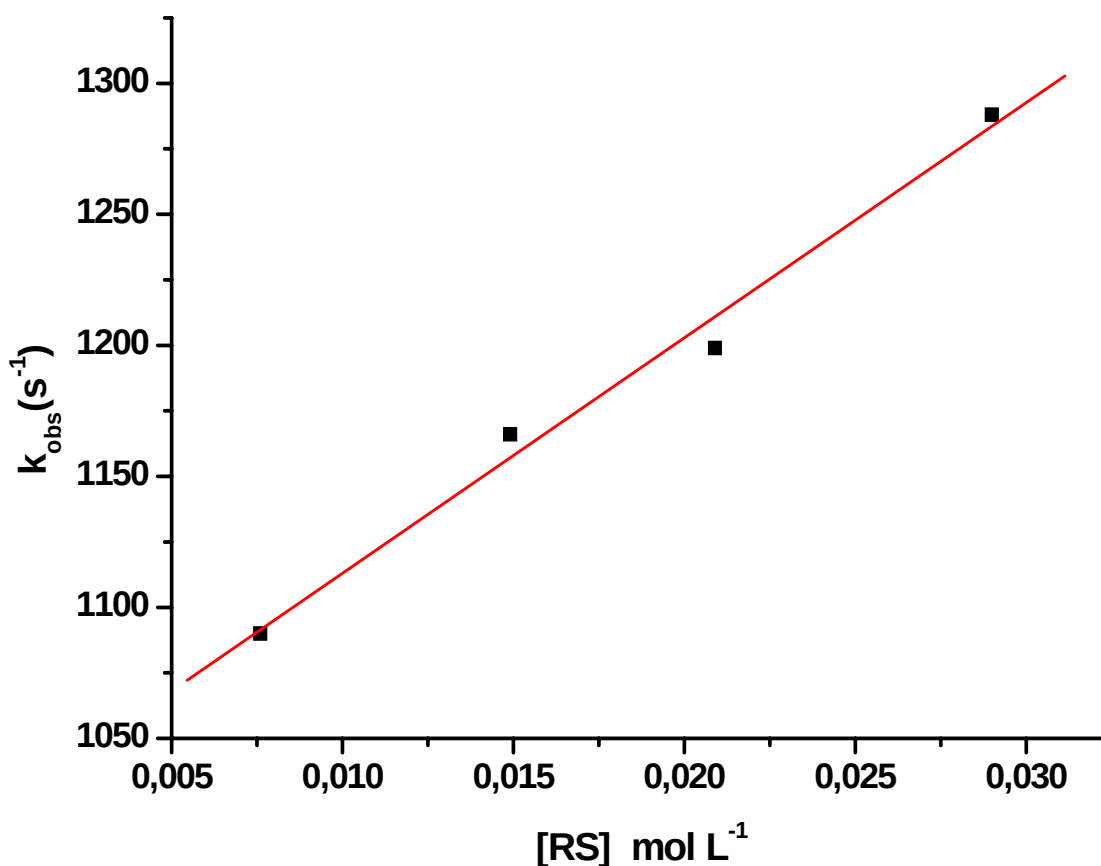


Figura 17. k_{obs} versus concentração de cisteína, em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,2 e T = 37 °C.

Na Tabela 5 encontra-se as constantes de velocidade para a reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ em função da concentração cisteína.

Tabela 5. Valores de constantes de velocidade para reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com a variação na concentração cisteína.

[RS] mol L ⁻¹	380 nm		450 nm
	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻¹)	k ₁ (s ⁻¹)
7,6 x 10 ⁻³	1,09 x 10 ³	7,63 x 10 ¹	1,02 x 10 ²
1,49 x 10 ⁻²	1,16 x 10 ³	5,45 x 10 ¹	1,99 x 10 ²
2,09 x 10 ⁻²	1,19 x 10 ³	3,60 x 10 ¹	2,19 x 10 ²
2,90 x 10 ⁻²	1,28 x 10 ³	2,68 x 10 ¹	-

Na tentativa de resolver a discrepância nos valores das constantes de velocidade obtido no stopped-flow, foi realizado um experimento em que a reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína e glutatona com resolução temporal de 1 segundo entre a obtenção dos espectros. Na Figura 18 encontram-se as variações espectrais desta reação onde se observa claramente o desaparecimento da espécie com banda de absorção em 450 nm e o surgimento de outra em 380 nm.

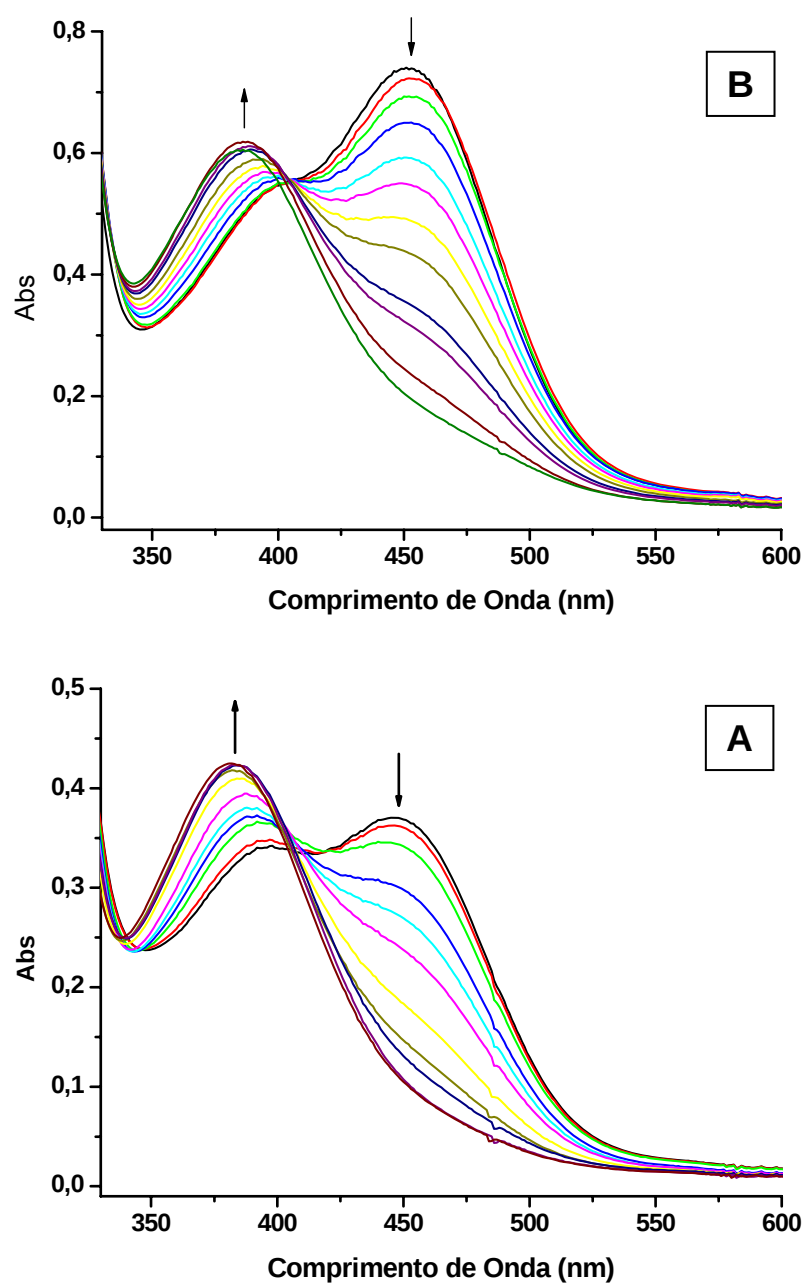
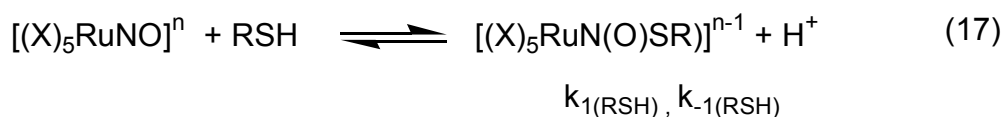
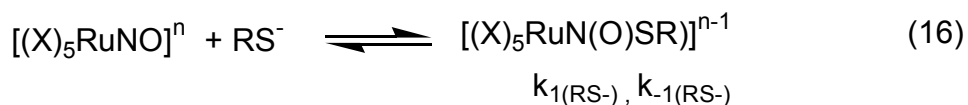


Figura 18. Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂ImN(NO)]³⁺ com cisteína (A) e glutathione (B) em pH = 3,2. Temperatura = 37 °C.

Os valores das constantes de decaimento em 460 nm são maiores do que as constantes em 380 nm. No entanto esta discrepância nas constantes mostra coerência com os resultados obtidos com o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]⁺. Isto se deve a formação de outras reações que ocorrem paralelamente e da influencia do pH, no qual contribui para a interação entre o nitrosilo complexo e as espécies RSH e RS⁻ (Equações 16 e 17)[100]:



4.2. Decomposição do intermediário II e formação dos produtos

4.2.1. Com cisteína e glutathione

A Figura 19A ilustra o acompanhamento espectrofotométrico da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína. Durante a reação observou-se a existência de um ponto isobésticos em 405 nm, o qual permaneceu inalterado durante todo o processo. Baixas concentrações de cisteína não causaram a liberação do óxido nítrico.

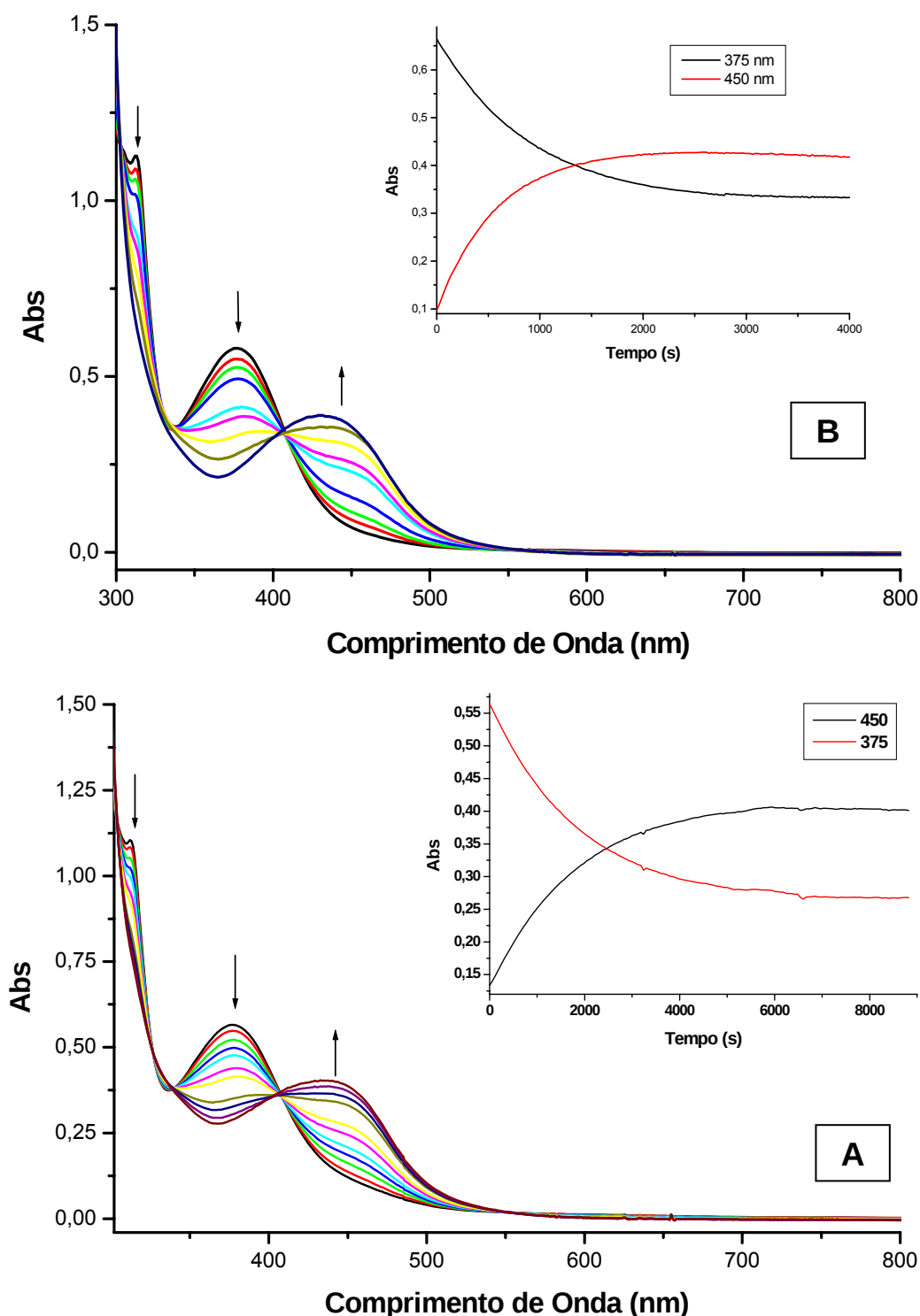
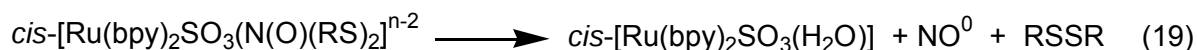
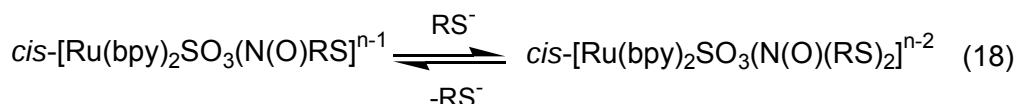


Figura 19. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína (A) e glutatona (B), em BTP $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,05 e T = 37 °C.

Ao utilizar um excesso acima de 20 vezes verificou-se a reação do tiól com o nitrosilo complexo, através da formação do segundo intermediário com uma banda de absorção em torno de 380 nm, seguido pela diminuição desta banda e formação de outra banda em torno de 450 nm, atribuído a uma transferência de carga do metal para o ligante do aqua complexo gerado (Equações 18 e 19).



O aparecimento deste intermediário se deve, provavelmente, a formação de um aduto entre o enxofre da cisteína e o óxido nítrico coordenado ao centro metálico. Com isso, ocorre um processo de oxiredução fazendo com que se forme um radical $RS^\bullet$ e NO^0 coordenado ao rutênio. Estudo realizado com o nitroprussiato de sódio [80, 82] mostra que ocorre a formação de um aduto entre o íon complexo e a cisteína. Além disso, o mecanismo proposto para esta reação revela a existência de um processo de oxiredução em que a cisteína é oxidada e o óxido nítrico reduzido, sem que haja o aparecimento do nitrosotiol.

Uma semelhança na estrutura eletrônica do aduto $[(X)_5MN-(O)L]$, onde L é um nucleófilo pode ser proposto com base na seguinte evidência experimental e teórica [100]. De um modo geral, os processos de adição envolvem uma mudança na geometria, de uma forma linear $[(X)_5M(NO^+)]$ para angular $[(X)_5MN(O)L]$. Evidência para esta conversão de linear para angular vem da estrutura sólida do $[Ru(bpy)_2ClN(O)SO_3]$ [103] na qual a espécie de $RuN(O)S$ angular é identificado claramente, e também pelos cálculos de DFT [99] relativo ao progresso da reação de NP com íons OH^- .

A conversão envolve a ligação tripla do NO^+ no qual se torna dupla na espécie $[(X)_5MN(O)L]$. Isto foi demonstrado pelas medidas de infravermelho na reação do nitroprussiato de sódio com EtS^- , mostrando o aparecimento de um pico em 1380 cm^{-1} , característico do aduto vermelho [104]. Todas estas evidências apontam à existência de características gerais em comuns, na

geometria e estrutura eletrônica do aduto $\{(X)_5MN(O)L\}$, até mesmo se mudamos o centro metálico, o co-ligantes (X), ou o nucleófilo (L) [100].

Na Figura 19B encontra-se a variação espectral referente à reação do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO](PF₆) com glutathione, onde as medidas para esse sistema foram feitas em 380 e 450 nm, sob força iônica 0,01 mol L⁻¹ BTP. Assim como observado na reação com cisteína, houve a formação do intermediário com uma banda em torno de 380 nm, referente ao aduto gerado entre o enxofre da glutathione e o óxido nítrico. Com o passar do tempo da reação, verifica-se o aparecimento de outra espécie com uma banda em torno de 450 nm, atribuída a uma transferência de carga do metal para o ligante bipyridina do tipo $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(bpy)$ do aqua complexo gerado [98] a partir da labilização do óxido nítrico.

Ao contrário da cisteína, a cinética de interação da glutathione não apresenta dependência com a faixa de pH em estudo. Isto foi verificado através de medidas em diferentes pH, não havendo alteração nas constantes de velocidade. Com isso, o pH fisiológico foi escolhido para as medidas.

Estudo realizado com nitrosotióis mostra que essas combinações são estáveis em temperatura de 37 °C e pH 7.4. Mas isso não ocorre na presença de metais de transição, onde há um estímulo na quebra catalítica do S-nitrosotiól para formar NO⁰ e disulfito [105]. Além disso, metais de transição na sua forma reduzida (por exemplo, Cu^I) decompõem os nitrosotióis mais rápido do que a sua forma oxidada, como por exemplo, Cu^{II}, indicando que agentes redutores como glutathione e ascorbato podem estimular a decomposição dessas substâncias por reações químicas [105].

Os valores encontrados para as constantes de velocidade em função do pH para os processos de interação e liberação do óxido nítrico do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína estão relacionados na Tabela 6. O comportamento cinético das reações de interação e redução do NO pela cisteína mostra uma dependência na velocidade das reações em função do pH, o qual apresenta um comportamento semelhante à curva de titulação ácido base, com um pK cinético de 7,94 próximo do pK de protonação e desprotonação do SH da cisteína.

Tabela 6. Constante de velocidade em função do pH da interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína, a 37 °C e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

k_{obs}/s	pH
$6,60 \times 10^{-4}$	6,27
$9,73 \times 10^{-4}$	6,67
$1,20 \times 10^{-3}$	7,00
$2,20 \times 10^{-3}$	7,53
$3,01 \times 10^{-3}$	7,88
$4,68 \times 10^{-3}$	8,14
$6,39 \times 10^{-3}$	8,36
$7,02 \times 10^{-3}$	8,70
$7,58 \times 10^{-3}$	9,00

Considerando o valor de pK da cisteína em 8,3 [102], nota-se que em pH nesta região encontra-se no equilíbrio as formas referentes a dissociação do tiól (Equação 20).



A Figura 20 mostra o gráfico obtido de constante de velocidade observada em função do pH, para a reação entre o nitrosilo complexo e cisteína. A velocidade da reação, na presença de cisteína é fortemente favorecida em valores de pH alcalinos. Com uma mudança de apenas uma unidade de pH, 7,25 a 8,25, a velocidade aumenta por um fator de 4. Isto ocorre devido à desprotonação no enxofre da cisteína, facilitando a interação deste tiol com o óxido nítrico coordenado ao rutênio(II). Observa-se, portanto um aumento na constante de velocidade quando aproximamos do pK_a referente ao grupo SH da cisteína.

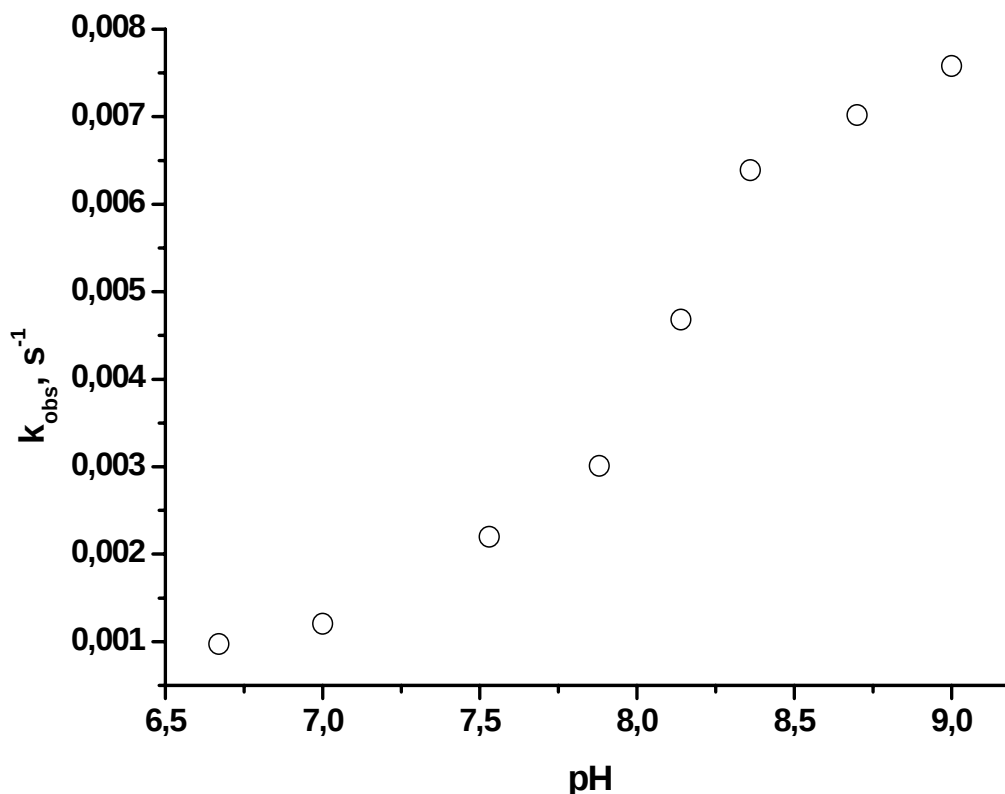


Figura 20. k_{obs} , para a redução e liberação de NO^0 em função do pH, na presença de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de $[RuNO]$, $7,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína.

A dependência da temperatura em que a reação se processa foi verificada em condições de pseudo primeira ordem. Os resultados do estudo da reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com cisteína e glutathiona encontram-se na Tabela 7 e sua análise gráfica é ilustrada nas Figuras 21 e 22. Os parâmetros de ativação mostraram-se iguais a: $\Delta H^\ddagger = 21,79 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -217,36 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para cisteína, e os dados obtidos a partir da reação com glutathiona, apresentaram os seguintes valores: $\Delta H^\ddagger = 31,73 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -230,11 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Tabela 7. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína e glutatona.

Temperatura K	Cisteína	Glutatona
	K _{obs} (s ⁻¹)	K _{obs} (s ⁻¹)
298	2,85 x 10 ⁻³	5,01 x 10 ⁻⁴
303	3,59 x 10 ⁻³	5,59 x 10 ⁻⁴
310	4,25 x 10 ⁻³	7,39 x 10 ⁻⁴
316	4,80 x 10 ⁻³	8,33 x 10 ⁻⁴
323	5,90 x 10 ⁻³	1,03 x 10 ⁻³

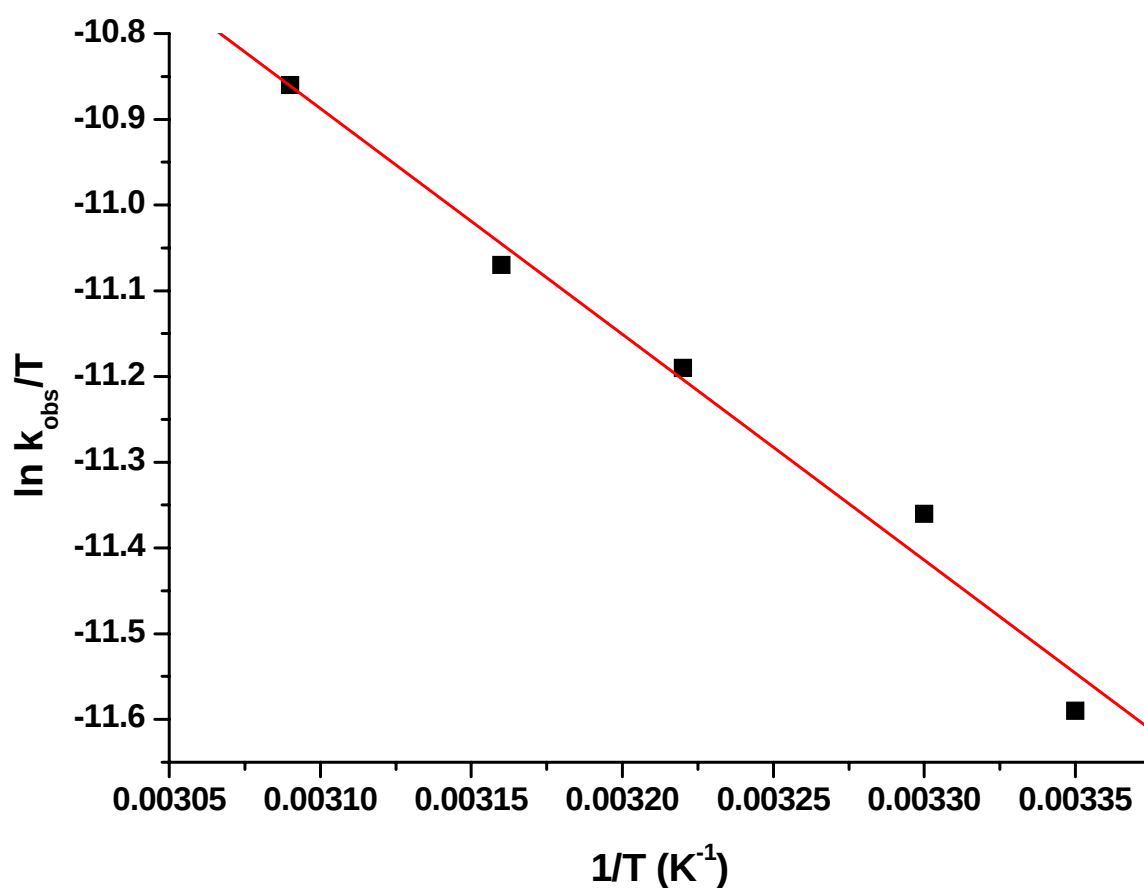


Figura 21. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína.

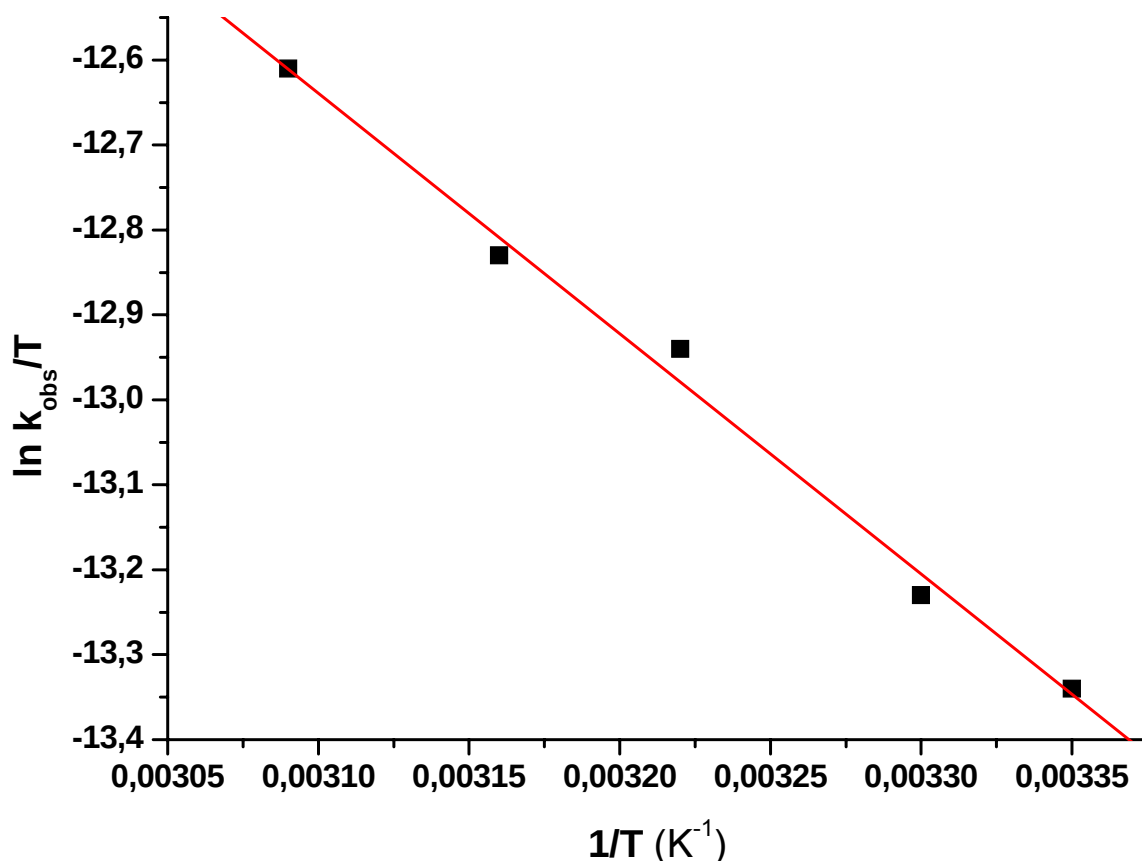
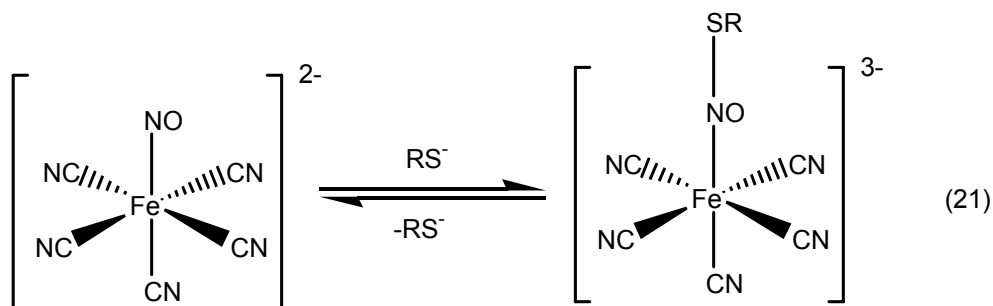


Figura 22. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com glutatona.

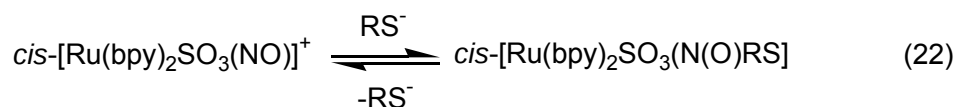
O valor negativo para a variação na entropia demonstra uma espécie de associação entre o enxofre da cisteína e nitrogênio do óxido nítrico. Dados da literatura [80, 82] mostram que a reação do nitroprussiato de sódio com tióis gera um intermediário que se caracteriza pelo ataque do grupo RS⁻ do tiol ao nitrogênio do NO (Equação 21):



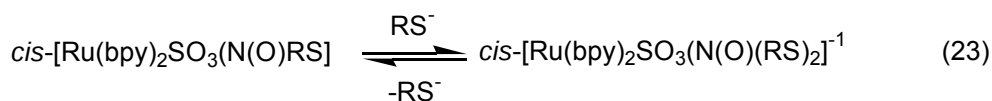
Analisando os resultados obtidos nas reações com cisteína e glutatona e comparando com alguns dados da literatura foi possível propor um mecanismo de

formação e decomposição do aduto intermediário. Na elaboração desse mecanismo, foi importante considerar a presença de NO livre já que foi detectada, após a redução do nitrosilo complexo pelo tiol, utilizando um detector seletivo de NO.

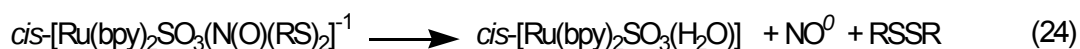
No mecanismo proposto, inicialmente ocorre o ataque do tiolato ao íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ formando um aduto intermediário com uma constante de velocidade rápida, o qual possui banda de absorção característica em 450 nm (Equação 22).



Estes intermediários por sua vez reagem com outra molécula de RS produzindo o segundo intermediário com banda de absorção característica em 380 nm (Equação 23):



Este segundo intermediário contendo dois tióis se decompõe, dando origem a espécie ativa do óxido nítrico assim como a forma oxidada da cisteína e glutathiona (Equação 24):



Comparando a constante de velocidade de queda da banda correspondente ao segundo intermediário, observa-se que a espécie mais instável é aquele formado pelo nitrosilo complexo ligado à cisteína, com velocidade de decomposição maior quando comparado com a glutathiona.

Ao contrário do que foi obtido na reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ClNO]⁺² com cisteína em que houve a produção de N₂O como um dos produtos[100], os compostos estudados neste trabalho apresentam resultados

interessantes no que diz respeito a formação dos produtos, visto que nesta reação o óxido nítrico foi liberado na sua forma biologicamente ativa (NO^0).

A cinética da reação no íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com a cisteína foram estudadas entre o $\text{pH} = 3,0 - 4,3$, $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$. O comportamento cinético desta interação é semelhante ao complexo com o ligante sulfito. A reação foi acompanhada fixando-se os comprimentos de onda analíticos, no $\lambda_{\text{máximo}}$ característicos da banda de absorção em 380 nm referente ao segundo intermediário formado após adição da cisteína e na banda de absorção em 470 nm atribuída a uma transferência de carga metal-ligante do aqua complexo formado. As medidas foram feitas a 37 °C e sob condições de pseudo-primeira ordem. Na Figura 23A encontra-se o acompanhamento desta interação.

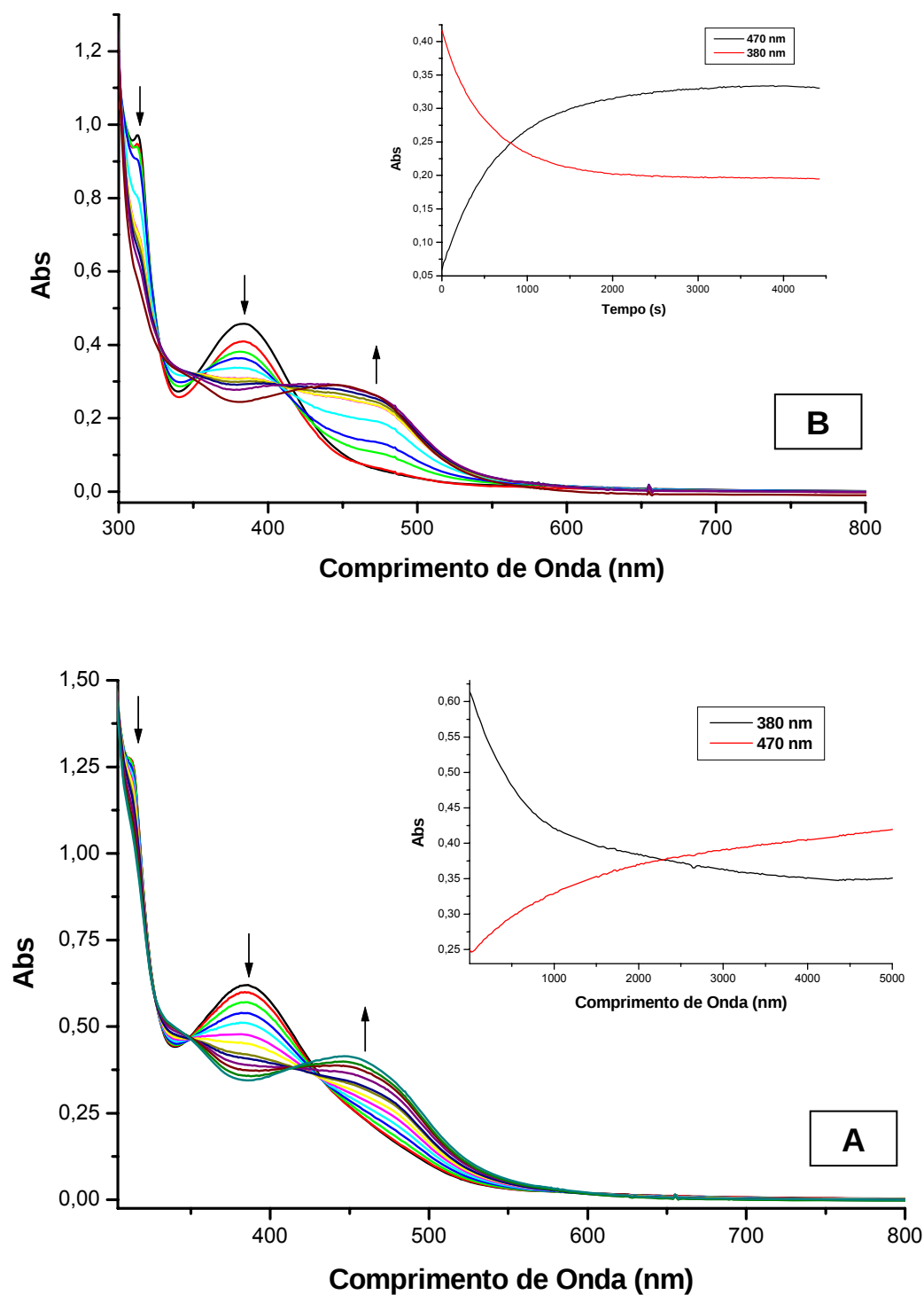


Figura 23. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com glutathione (A) e cisteína (B), em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 3,0$ e $T = 37^\circ\text{C}$.

O espectro do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ em meio aquoso é caracterizado pela presença de uma banda de absorção em 296 nm e um ombro em 325 nm. A banda de absorção em 298 nm é atribuída a uma transição intraligante da bipyridina do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ [106, 107]. O ombro na região de 325 nm foi atribuído à transferência de carga do metal ligante (TCML), devido à transição $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{NO})$ e $d\pi(\text{Ru}^{\text{II}}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ [107, 108].

O deslocamento destas bandas de absorção para a região de menor energia evidencia que óxido nítrico sofreu redução e labilização do centro metálico visto que o NO^+ é um ligante que se caracteriza por uma ligação sigma e π muito forte, causando assim uma estabilização nos orbitais $d\pi$ do rutênio[109]. Com isso, as absorções das bandas de transferências de carga sofrem uma diminuição no valor de comprimento de onda.

A partir da análise dos resultados, verifica-se que mesmo muito abaixo do pKa de desprotonação do átomo de enxofre da cisteína a reação com o nitrosilo complexo acontece com uma constante de velocidade relativamente rápida. Isto se deve, provavelmente, em decorrência de um maior caráter eletrofílico no ligante NO^+ , o que facilita o ataque de um nucleófilo.

A reação com glutatona foi realizada tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1 mol L⁻¹ fixando-se os mesmos comprimentos de onda do sulfito complexo. Na Figura 23B encontra-se a variação espectral desta reação, no qual foi observado comportamento semelhante ao estudo realizado com a cisteína. Ou seja, o desaparecimento do intermediário com banda de absorção em torno de 380 nm, seguido pelo surgimento de outra em torno de 470 atribuída a banda de transferência de carga do metal para o ligante, do tipo TCML, do aqua-complexo formado [98].

Sabe-se que os nitrosotíóis apresentam duas bandas de absorção características em 336 e 550 nm [110]. A banda de absorção em 336 nm é atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e a banda em 550 nm refere-se a uma transição $n \rightarrow \pi^*$ [110]. A observação da banda referente ao aduto em 380 nm é uma evidência de que não há formação desta espécie.

Em virtude do pH de equilíbrio NO/NO_2^- em torno de 5,5 [108] não foi possível aumentar o pH para valores acima de 4,5 para este íon complexo. Na Tabela 8 encontram-se os valores referentes às constantes de velocidade em

função do pH. O gráfico de k_{obs} versus pH (Figura 24), nesta faixa de pH, mostra um comportamento linear. Isto indica que quanto mais próximo do pK do grupo SH da cisteína maior será a quantidade RS^- presente no meio da reação, facilitando reatividade desta espécie.

Tabela 8. Constante de velocidade em função do pH da interação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, a 37 °C e $\mu = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

K_{obs}/s	pH
$1,23 \times 10^{-4}$	3,08
$2,88 \times 10^{-4}$	3,50
$4,66 \times 10^{-3}$	3,90
$7,53 \times 10^{-3}$	4,37

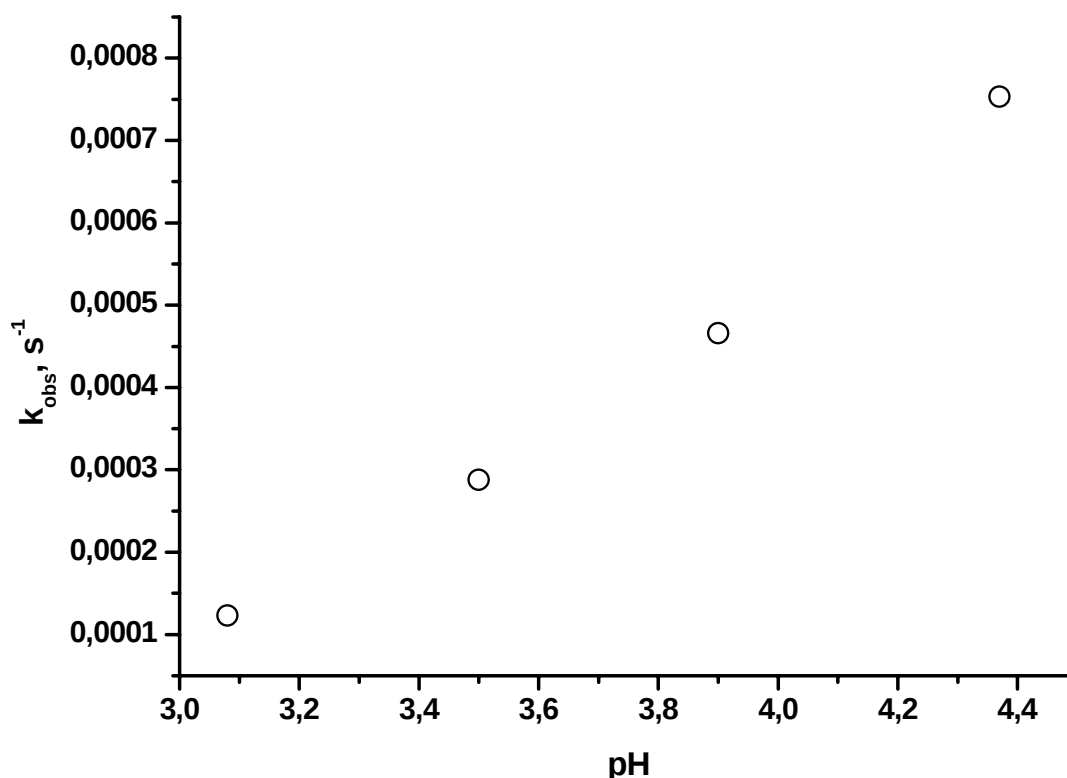


Figura 24. k_{obs} , para a redução e liberação de NO^0 em função do pH, para o íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ na presença de $7,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína.

A dependência com a temperatura em que a reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína e glutathiona ocorre foi verificada em condições de pseudo primeira ordem. Os resultados desse estudo encontram-se na tabela 9 e sua análise gráfica é ilustrada na Figura 25. Os parâmetros de ativação mostraram-se iguais a: $\Delta H^\ddagger = 53,87 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -139,02 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para cisteína, e para a reação com glutathiona os valores obtidos foram os seguintes: $\Delta H^\ddagger = 59,25 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -114,95 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Tabela 9. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína.

Temperatura K	Cisteína	Glutathiona
	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
298	$1,37 \times 10^{-4}$	$2,93 \times 10^{-4}$
303	$1,81 \times 10^{-4}$	$3,69 \times 10^{-4}$
310	$3,19 \times 10^{-4}$	$6,88 \times 10^{-4}$
316	$5,11 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-3}$
323	$7,64 \times 10^{-4}$	$1,91 \times 10^{-3}$

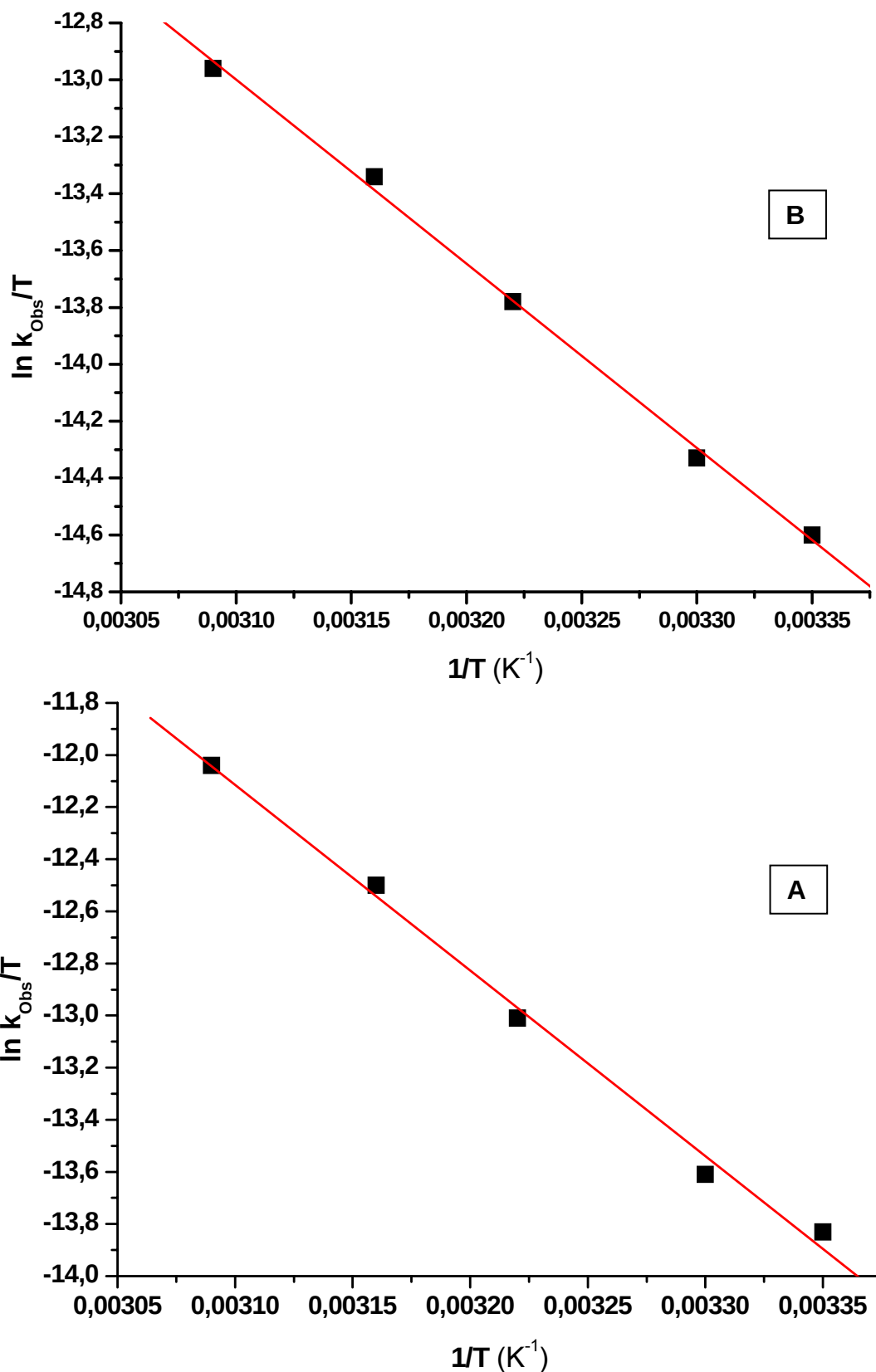
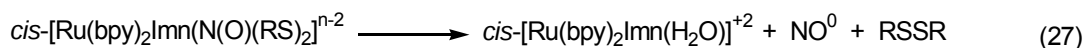
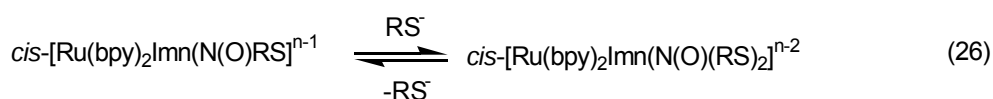
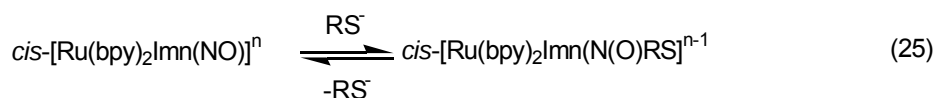


Figura 25. Dependência da temperatura para a interação do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂ImN(NO)]³⁺ com cisteína (A) e glutatona (B).

O valor negativo para $\Delta S^\ddagger$ nos evidencia que ocorre um mecanismo associativo no que se refere à reação entre a cisteína e o óxido nítrico coordenado ao centro metálico. Este resultado vem para contribuir com os resultados cinéticos obtidos, onde foi observada a formação de um aduto entre o enxofre da cisteína e o NO.

Dados da literatura[111] mostram que complexos com porfirina de ferro e tiolatos coordenados a este centro metálico apresentam valores de entropia de ativação negativo quando este reage com NO, indicando um mecanismo associativo.

De acordo com os resultados obtidos verifica-se a reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com cisteína e glutatona apresenta o mesmo mecanismo proposto para a cinética com sulfito complexo (Equações 25, 26 e 27):



4.2.2. Metionina e histidina

A metionina (Figura 26) também é um agente redutor e pode ser encontrado em condições fisiológicas. O interesse em reagir este aminoácido com os nitrosilo complexo vem da existência do átomo de enxofre na sua estrutura o que viabiliza realizar uma comparação com os tióis. Outro fato interessante nesta molécula é o grupo metil ligado ao enxofre, fazendo não existir o pK_a referente à protonação e desprotonação do S:

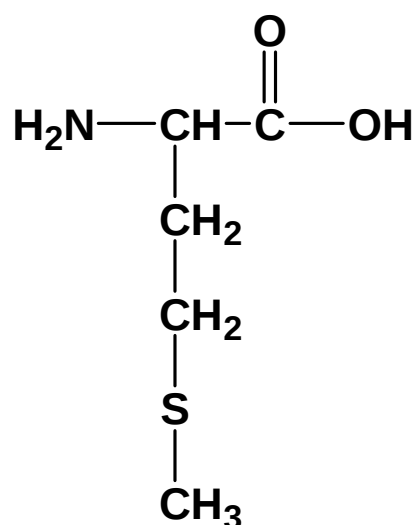


Figura 26. Estrutura química da metionina.

Na Figura 27 encontra-se a cinética de interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com a metionina, o qual foi realizado em solução aquosa de BTP 0,01 mol L⁻¹. A partir dos resultados observa-se o aparecimento de uma banda de absorção em 450 nm atribuída ao uma transição do tipo TCML dos orbitais d π (Ru⁺²) para os orbitais de caráter π^* (bipiridina) referente ao complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃H₂O] [98]. A reação não apresenta evidências da existência de intermediários durante o acompanhamento espectrofotométrico. Isto se deve, provavelmente, a ausência do grupo SH fazendo com que não haja a formação do aduto entre o enxofre dos tióis e o óxido nítrico.

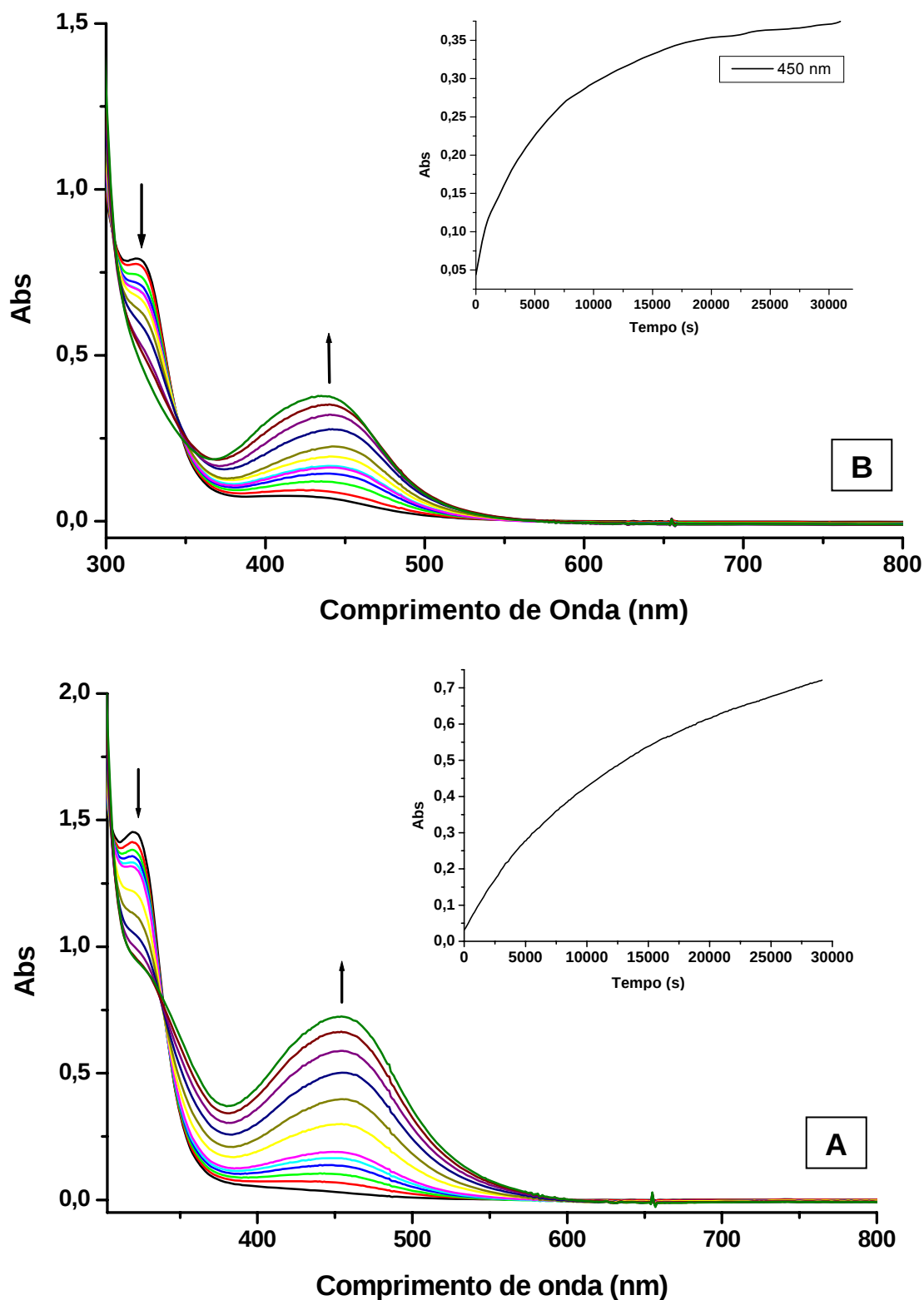


Figura 27. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com histidina (B) e metionina (A), em BTP $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e NaTFA $0,1 \text{ Mol L}^{-1}$ pH = 7,0 e $T = 37^\circ\text{C}$.

A reação não apresenta influência do pH, visto que foram realizadas cinéticas em diferentes valores de pH sendo que não houve alteração nas constantes de velocidade. Isto já era esperado em decorrência da falta do pK_a no enxofre da metionina.

A Figura 27A ilustra o acompanhamento cinético da reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com histidina, no qual foi realizado em NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em $pH = 7,05$ e $T = 37^\circ C$. A partir dos resultados obtidos, verifica-se o aparecimento de uma banda de absorção em 450 nm , referente ao aqua complexo gerado a partir da liberação do óxido nítrico [98]. O comportamento desta reação foi semelhante ao realizado com a metionina, ou seja, não houve a formação do intermediário com um máximo de absorbância em 380 nm . Isto reforça o mecanismo proposto para a reação com cisteína e glutatona, no qual o intermediário com banda de absorção em 380 nm é atribuído a espécie $cis-[Ru(bpy)_2SO_3N(O)(RS)_2]^{-1}$.

A histidina (Figura 28) foi escolhida primeiro, pelo fato da reação deste aminoácido proporcionar a redução e liberação do óxido nítrico nos nitrosilo complexos estudados neste trabalho, e em segundo pela não existência de enxofre na sua estrutura:

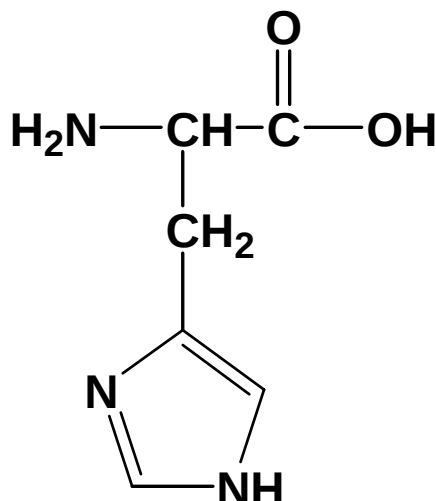


Figura 28. Estrutura química da histidina.

Com isso, verifica-se que a redução monoelétrica do NO^+ nesta reação não está relacionado com a formação do aduto, e sim no processo de oxiredução entre o ligante nitrosilo e o aminoácido.

A cinética de interação da histidina não apresenta dependência com a faixa de pH em estudo. Isto foi verificado através de medidas em diferentes pH, não havendo alteração significativas nas constantes de velocidade. Com isso, o pH fisiológico foi escolhido para as medidas.

A dependência da constante de velocidade com a temperatura em que a reação se processa foi verificada em condições de pseudo-primeira ordem. Os resultados deste estudo encontram-se na tabela 10 e sua interpretação gráfica é ilustrada nas figuras 29 e 30. Os parâmetros de ativação, calculados a partir desses dados, apresentam-se com os valores: $\Delta H^\ddagger = 45,3 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -177,16 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para a metionina; $\Delta H^\ddagger = 66,42 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -116,81 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para a histidina.

Tabela 10. Valores da constante de velocidade em função da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com metionina e histidina.

Temperatura K	Metionina	Histidina
	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$
298	$4,38 \times 10^{-5}$	$8,95 \times 10^{-6}$
303	$5,71 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-5}$
310	$8,10 \times 10^{-5}$	$2,85 \times 10^{-5}$
316	$1,20 \times 10^{-4}$	$4,89 \times 10^{-5}$
323	$1,97 \times 10^{-4}$	$8,18 \times 10^{-5}$

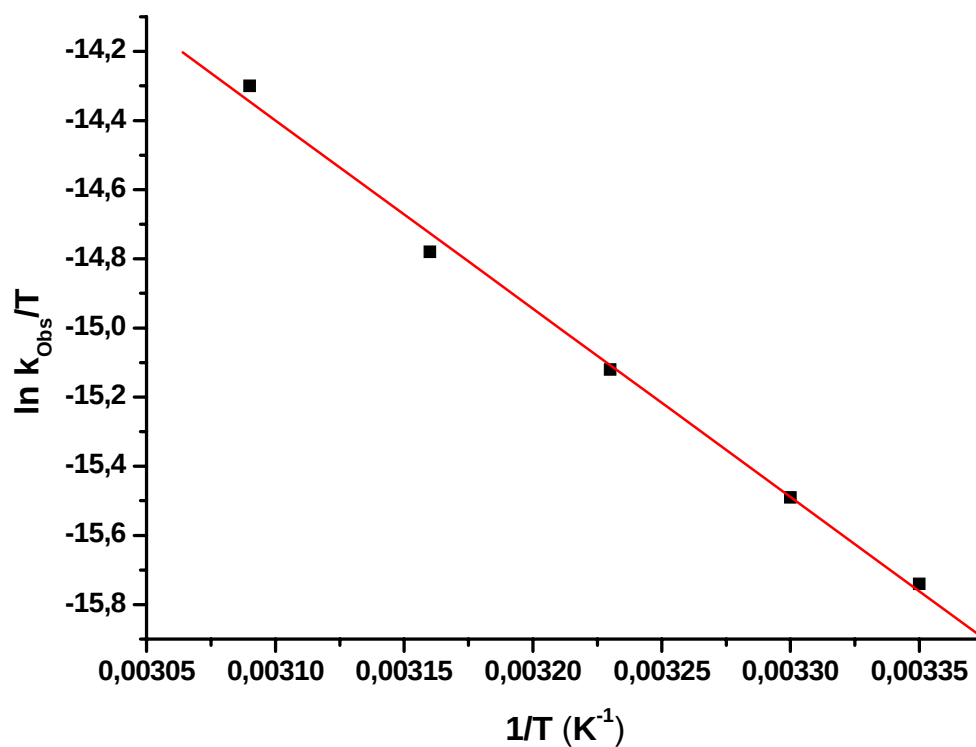


Figura 29. Dependência de k_{obs} com a temperatura para a interação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com metionina.

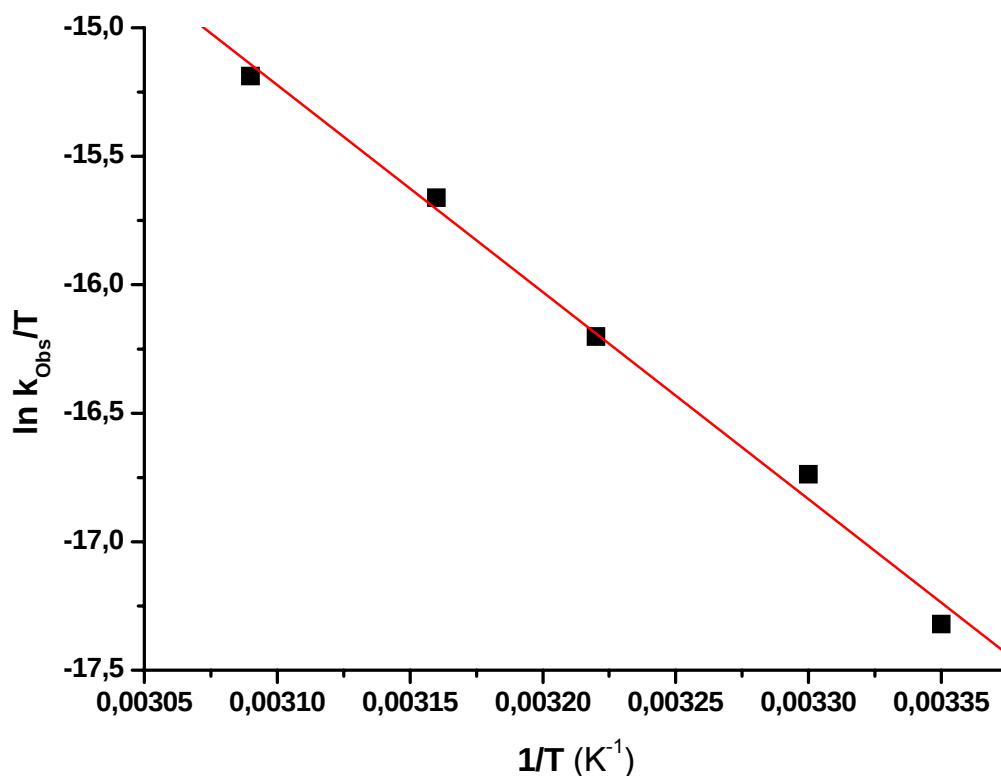


Figura 30. Dependência de k_{obs} com a temperatura para a interação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com histidina.

O valor negativo da entropia de ativação apresentado nesta reação sugere que o mecanismo proposto desta reação seja o mesmo que ocorre com os tióis (cisteína e glutatona). Para propor um mecanismo com a utilização do estado de ativação é necessário que se calcule além do $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$, o $\Delta V^\ddagger$ pois o valor encontrado para este parâmetro vai fornecer um dado mais conclusivo com relação ao mecanismo ser associativo ou dissociativo. Como não foi possível o cálculo do valor de $\Delta V^\ddagger$ devido a questões experimentais, não se pode concluir que o mecanismo proposto para esta reação é associativo.

Já com relação o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ o meio utilizado foi o tampão CH₃COOH/CH₃COONa 0,01 mol L⁻¹ e pH = 3,5. Na Figura 31 (A e B) encontram-se o comportamento cinético referente à reação do complexo com metionina e histidina. O comportamento cinético desta reação é semelhante ao complexo com o ligante sulfito. A reação foi acompanhada em 470 nm. A partir da análise destes resultados verifica-se um comportamento diferente ao estudo realizado com a cisteína, isto é, observa-se apenas o aparecimento da banda em torno de 470 nm característica do aqua complexo formado [98, 108]. Isto se deve, provavelmente, pelo o fato da metionina apresentar um grupamento metila ligado ao átomo de enxofre, impedindo assim que este tiol interaja diretamente com óxido nítrico.

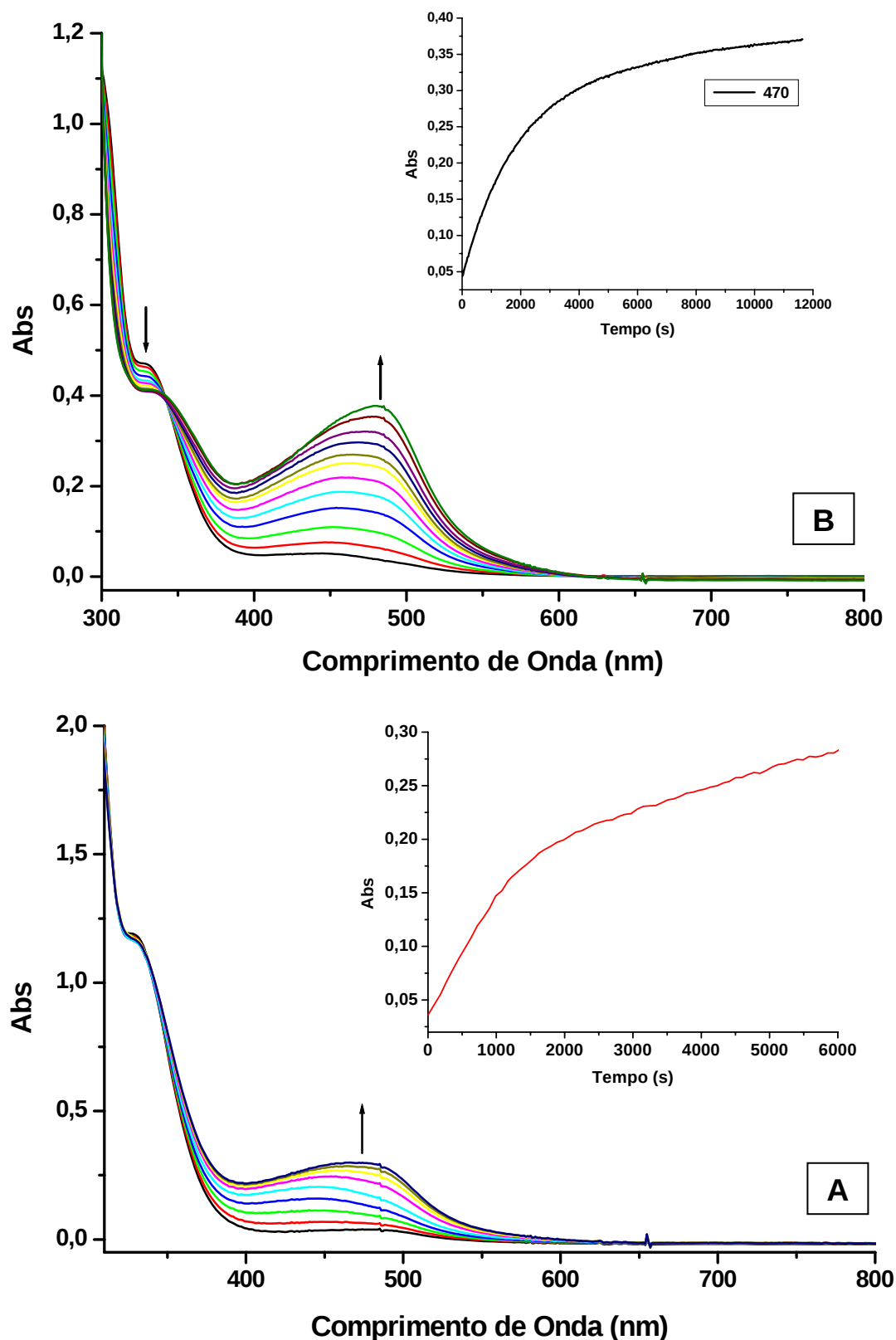


Figura 31. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação no íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com histidina (A) e metionina (B), em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 3,0$ e $T = 37^\circ\text{C}$.

A partir dos resultados obtidos para esta reação, observa-se a que constante de velocidade é mais rápida do que a reação no sulfito complexo. Isto se deve provavelmente a uma maior capacidade deste ligante de realizar uma ligação π , se comparado com o sulfito fazendo com que haja um aumento no caráter eletrofílico do ligante nitrosilo e conseqüentemente, facilitando a reação com substâncias redutoras. Com isso, a reação do complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ com os redutores apresentam valores de constantes de velocidades mais elevado do que a reação com sulfito complexo.

O estudo realizado da interconversão nitrosilo-nitrito para os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂LNO](PF₆)_n onde L = Isn, ImN e SO₃⁻² e o cálculo da constante de equilíbrio mostraram que o ligante isonicotinamida (Isn) apresentou um menor valor de pH para este equilíbrio do que os complexos com os ligantes imidazol e sulfito [98]. Isto ocorre, porque este ligante apresenta uma ligação π mais forte, fazendo com que haja um enfraquecimento na transferência de carga do metal para o NO⁺ [67]. Com isso, há um aumento no caráter eletrofílico do ligante NO, devido à diminuição da densidade eletrônica sobre este ligante, o que torna a reação com a hidroxila mais favorável [67, 98].

Os resultados da literatura demonstram que quanto mais eletrofílico esteja o óxido nítrico, mais fácil será a reação desta substância com um nucleófilo [67]. Como o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ possui um potencial redox do NO mais elevado do que o composto com sulfito, a reação com substâncias redutoras será facilitado.

O estudo da dependência de k_{obs} com a temperatura foi realizado em condições de pseudo primeira ordem. Os resultados deste estudo encontram-se na Tabela 11 e sua interpretação gráfica é ilustrada na Figura 32. Os parâmetros de ativação, determinados com a utilização destes dados, apresentaram-se com os valores $\Delta H^\ddagger = 59,243 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = - 114,94 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para metionina, e $\Delta H^\ddagger = 47,43 \text{ KJ mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = - 160,21 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ para a histidina.

Tabela 11. Valores de k_{obs} em função da temperatura para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com metionina e histidina.

Temperatura K	Metionina	Histidina
	k_{obs}/s	k_{obs}/s
298	$1,70 \times 10^{-4}$	$1,32 \times 10^{-4}$
303	$2,67 \times 10^{-4}$	$2,05 \times 10^{-4}$
310	$4,78 \times 10^{-4}$	$2,93 \times 10^{-4}$
316	$9,33 \times 10^{-4}$	$4,78 \times 10^{-4}$
323	$1,56 \times 10^{-3}$	$6,19 \times 10^{-4}$

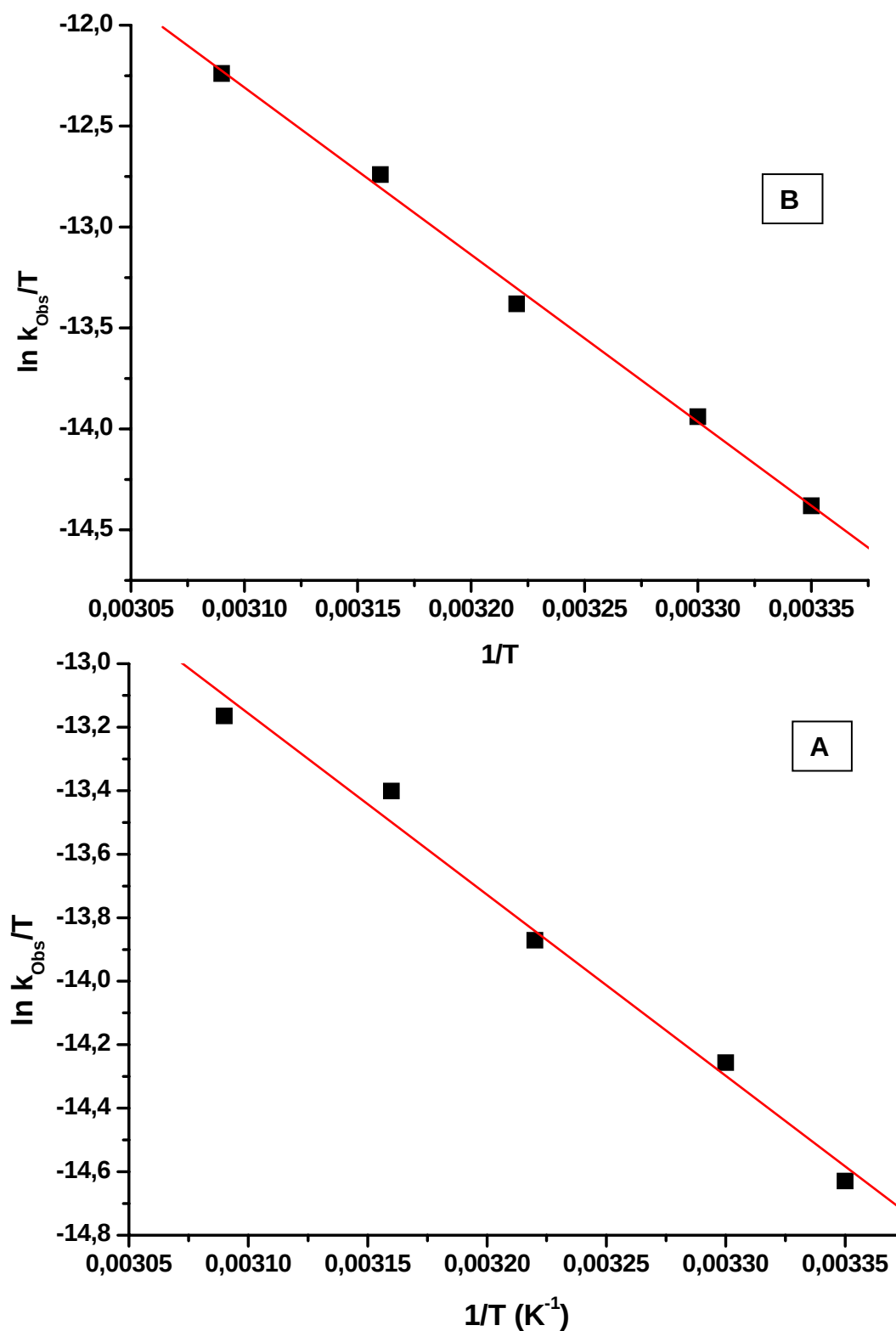


Figura 32. Dependência de k_{Obs} com a temperatura para a interação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com metionina (A) e histidina (B).

Na tabela 12 encontram-se condensados os dados obtidos a partir da reação dos íons complexos *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ e *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com os redutores biológicos.

Tabela 12. Parâmetros de ativação, a 25 °C, para reação dos nitrosilo complexos com redutores biológicos.

<i>cis</i>-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺				
	Cisteína	Glutathiona	Metionina	Histidina
$\Delta H^\# \text{ KJ mol}^{-1}$	21,79	31,73	45,30	66,42
$\Delta S^\# \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	- 217,36	- 230,11	- 177,16	- 116,81
$\Delta G^\# \text{ KJ Mol}^{-1}$	86,56	100,30	98,09	101,22
<i>cis</i>-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³				
	Cisteína	Glutathiona	Metionina	Histidina
$\Delta H^\# \text{ KJ mol}^{-1}$	53,87	59,25	68,89	47,43
$\Delta S^\# \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$	- 139,02	- 114,95	- 86,71	- 160,21
$\Delta G^\# \text{ KJ Mol}^{-1}$	95,29	93,50	94,73	95,17

4.2.3. Reação com NADH

NAD é uma coenzima que apresenta dois estados de oxidação: NAD^+ (oxidado) e NADH (reduzido). A forma NADH é obtida pela redução do NAD^+ com dois elétrons e adição de um próton (H^+). Quimicamente, é um composto orgânico encontrado nas células de todos os seres vivos, usado como "transportador de elétrons" nas reações metabólicas de oxiredução, tendo um papel preponderante na produção de energia para a célula.

O acompanhamento da reação dos nitrosilo complexos com a NADH encontra-se ilustrado na Figura 33, no qual foi realizado em NaTFA e $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3,5$ e $7,0$ e $T = 37^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos mostram o aparecimento de uma banda de absorção em torno de 450 nm atribuída à transferência de carga do metal para o ligante do aqua complexo formado após a redução e liberação do óxido nítrico. Não foi possível observar se nesta reação houve formação de intermediário, devido presença de duas bandas de absorção em 260 e 340 nm referente a transições que ocorre neste redutor [112].

As constantes de velocidades para esta reação apresentam valores semelhantes ao obtido com os aminoácidos, tornado-se coerente com a redução e liberação do óxido nítrico. Ao se pensar na utilização destes nitrosilo complexos com doadores de NO, os resultados obtidos torna-se interessante visto que a NADH é um redutor biológico encontrado em todos os seres vivo.

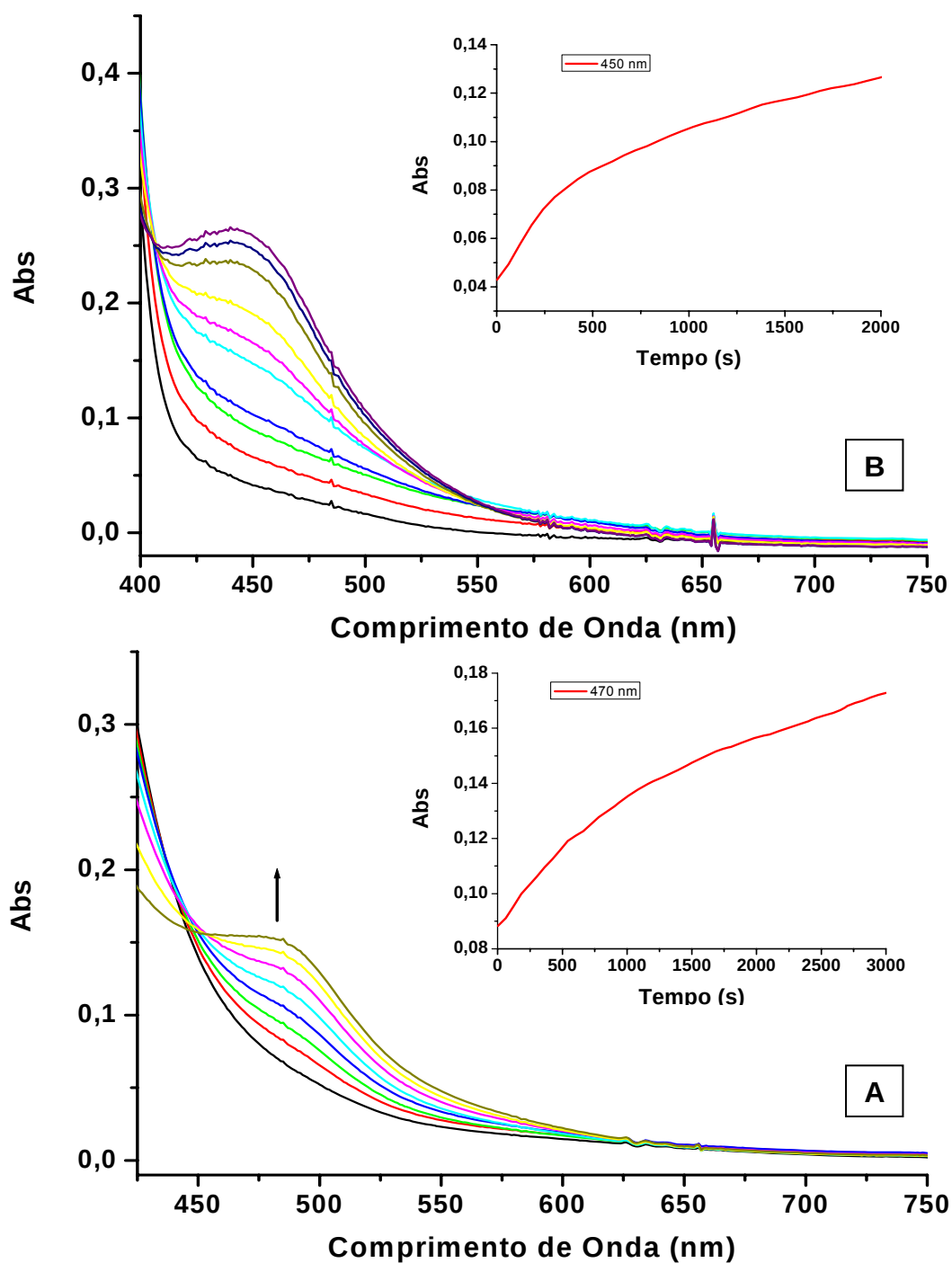


Figura 33. Variação de absorvância versus comprimento de onda, em função do tempo, da reação nos íons complexos: $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com NADH (A) em CH_3COOH/CH_3COONa 0,1 mol L⁻¹ pH = 3,5; $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com NADH(B) em NaTFA 0,1 mol L⁻¹ pH = 7,0 e T = 37 °C.

4.3. Acompanhamento da reação dos nitrosilo complexos com redutores biológicos, utilizando-se técnicas eletroquímicas

4.3.1. Cisteína e glutathione

A eletroquímica é uma técnica bastante utilizada na química inorgânica, físico-química e bioquímica para propostas analíticas, incluindo estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios. Especificamente, no estudo dos compostos de coordenação, o uso dessa técnica permite a avaliação dos potenciais formais de redução das espécies metálicas, os quais podem ser correlacionados com os tipos de interação metal-ligante (π e σ) [113, 114]. Além disso, diversas outras aplicações tais como monitoramento de reações de isomerização, de transferências de elétrons [115, 116] e de substituição [117, 118], na avaliação do grau de acoplamento entre centros metálicos de espécies polinucleares [119], medidas de pKa e determinação de constantes de equilíbrio [71, 120].

O acompanhamento eletroquímico da redução e liberação do óxido nítrico no íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ pela cisteína e glutathione foi realizado em NATFA 0,1 mol L⁻¹ e pH = 7,0. Nos voltamogramas de onda quadrada (Figura 34), observa-se uma diminuição de corrente no processo em torno de -100 mV versus Ag/AgCl e o aparecimento de um processo em 615 mV. Esta observação é concordante com a liberação do NO, uma vez que o produto gerado apresenta potencial na mesma região do aqua-complexo [98, 108]. Além disso, ocorre o aparecimento de um potencial na região mais positiva. Isto se deve ao processo de oxidação da cisteína, no qual é gerada cistina como produto deste processo eletroquímico [121].

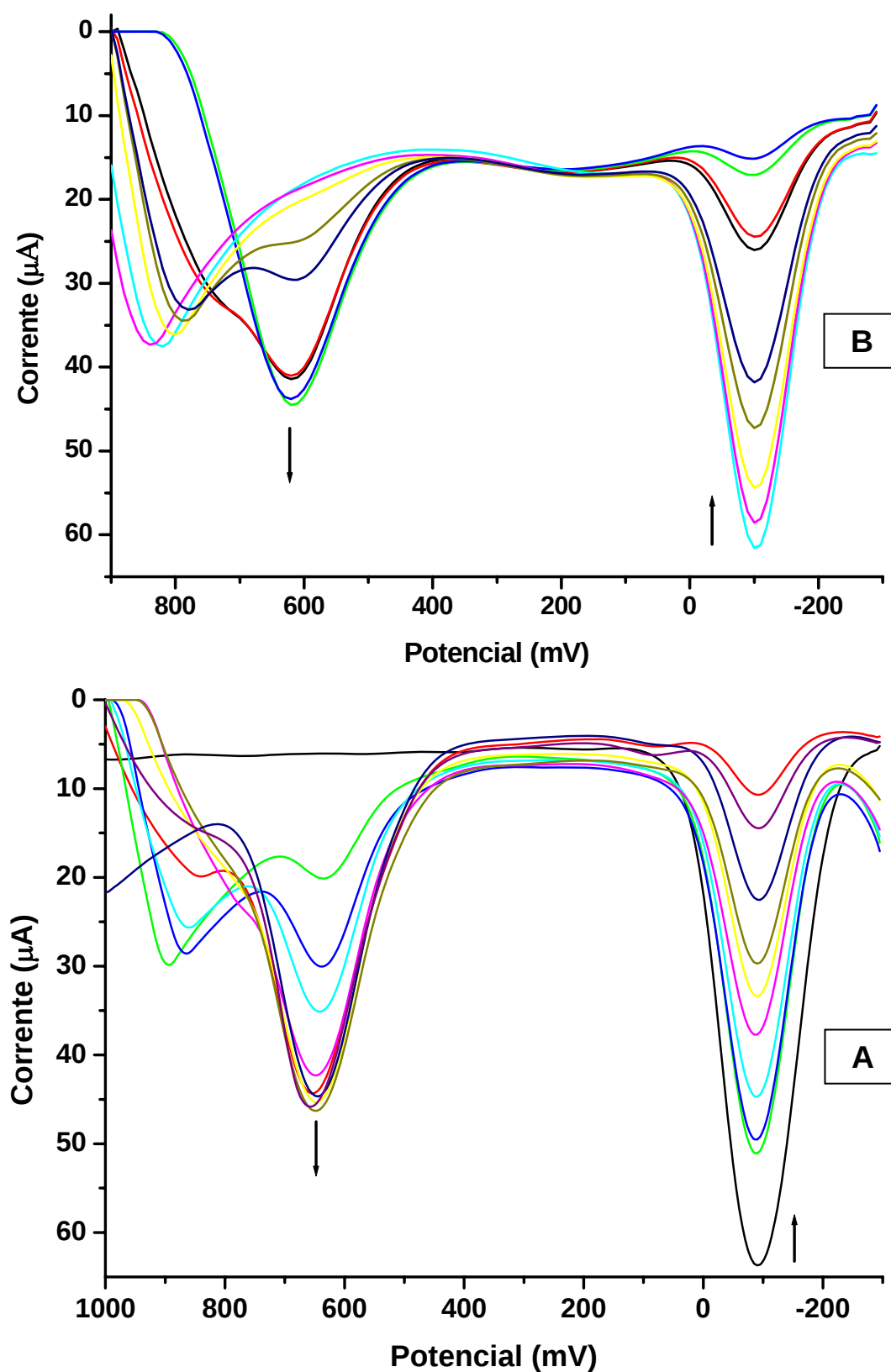


Figura 34. Voltamogramas de onda quadrada referente à reação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com glutathiona (A) e cisteína (B), em NaTFA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,05 e $T = 37^\circ\text{C}$.

Em concordância com os experimentos espectrofotométricos, os resultados encontrados neste acompanhamento eletroquímico mostram que o mecanismo da reação do tiol com nitrosilo complexo envolve um processo de oxiredução, visto que a cisteína possui o potencial de oxidação [121] capaz de reduzir o óxido nítrico no íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺.

O comportamento eletroquímico referente à reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína e glutatona foi realizado em tampão CH₃COOH/CH₃COONa 0,1 mol L⁻¹ e pH = 3,5. Ao contrário do experimento realizado com sulfito complexo em que o pH fisiológico foi utilizado, nesta análise o pH ácido foi necessário em virtude do equilíbrio NO⁺/NO₂⁻ no íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ que ocorre em pH em torno de 5 [98].

Nos voltamogramas de onda quadrada (Figura 35) verificou-se a diminuição de corrente no processo de oxidação do óxido nítrico, em torno de 200 mV versus Ag/AgCl, e o aparecimento de um processo em 600 mV referente à oxidação do rutênio no aqua complexo [98] formado após a redução e labilização do NO, provocada pela cisteína e glutatona respectivamente.

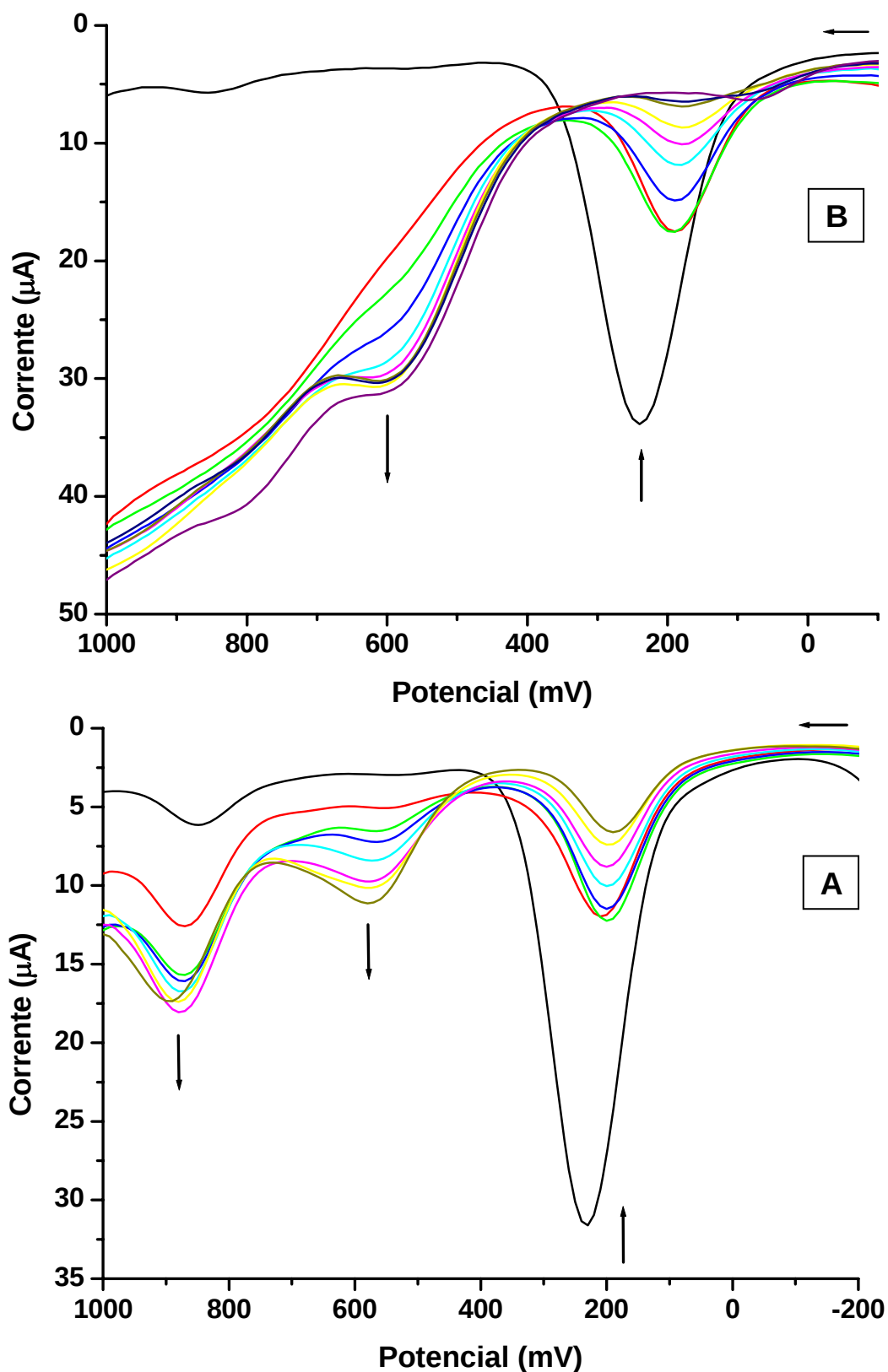


Figura 35. Voltamogramas de onda quadrada referente à redução e liberação de NO do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com glutathiona (A) e cisteína (B) em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 3,5$, e $T = 37^\circ\text{C}$.

Na reação com cisteína ocorre o aparecimento de outro processo com um valor de corrente maior do que outros em torno de 800 mV, o qual é atribuído a oxidação sofrida por este tiol [121]. Na Figura 36B encontra-se o acompanhamento da reação do complexo com glutatona, no qual é observada a formação de uma espécie com potencial em 880 mV referente ao processo de oxidação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO₂)]⁺ [108].

O aparecimento deste composto ocorre devido aproximação do equilíbrio NO⁺/NO₂⁻ de acordo com a equação 28 [108]:



No caso da reação com cisteína não foi observado este potencial redox devido à presença do processo de oxidação deste tiol que se dar na mesma região de potencial e com alto valor de corrente. Apesar do baixo valor de pH, os tióis conseguiram reduzir o óxido nítrico com uma velocidade bastante semelhante com o sulfito-complexo.

4.3.2. Metionina e Histidina

A reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com metionina apresenta a diminuição do processo relacionado ao par redox do óxido nítrico coordenado. No restante do voltamograma não há o surgimento de nenhum processo eletroquímico.

Na Figura 36 encontra-se a variação nos voltamogramas cíclicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com histidina, em NaTFA 0,1 mol L⁻¹ e pH = 7,05. A partir dos dados obtidos verifica-se que ocorre a redução e liberação de óxido nítrico, visto que houve a diminuição no processo em torno de -100 mV atribuído ao par redox NO⁺/NO⁰ coordenado, e o aparecimento de outra espécie com potencial eletroquímico em torno de 600 mV referente ao par redox Ru^{III}/Ru^{II} do aqua complexo formado [98, 108].

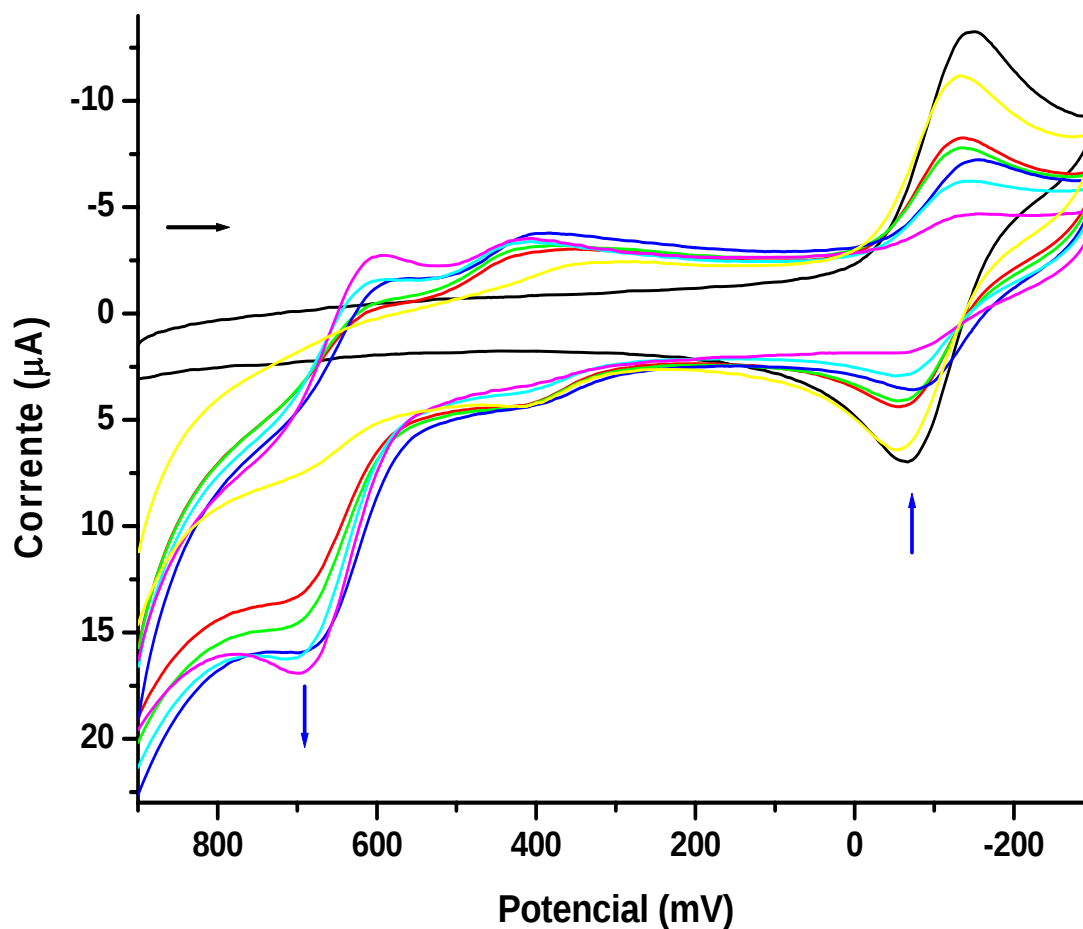


Figura 36. Voltamogramas cíclicos referente à redução e liberação de NO, no íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ em $NaCF_3COO$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,05 e $T = 37^\circ\text{C}$.

Além disso, houve a formação de uma espécie com $E_{1/2}$ em torno de 400 mV atribuído ao processo de redução e oxidação no centro metálico do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO_2]^-$ [108]. Isto ocorre devido ao aumento de pH provocado pela histidina, o que facilita o ataque da hidroxila ao NO coordenado ao centro metálico.

Mesmo a histidina não possuindo enxofre na estrutura, o processo redox no óxido nítrico ocorre. Com isso, torna o resultado interessante visto que aumenta a probabilidade deste complexo de ser ativado numa possível aplicação biológica.

O acompanhamento eletroquímico da redução e labilização do óxido nítrico no íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ pela metionina e histidina foi realizado em $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 3,5$. Nos voltamogramas cíclicos (Figura 37), observa-se uma diminuição de corrente no processo centrado em 210 mV e o aparecimento de um processo em torno de 600 mV. Isto ocorre devido à redução e labilização do óxido nítrico provocada pelos aminoácidos, uma vez que o produto gerado apresenta potencial na mesma região do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ [108].

Ao contrário dos outros tióis, o acompanhamento desta reação foi realizado utilizando a voltametria cíclica, em virtude do processo de oxidação da metionina e histidina não aparecer nesta janela de potencial.

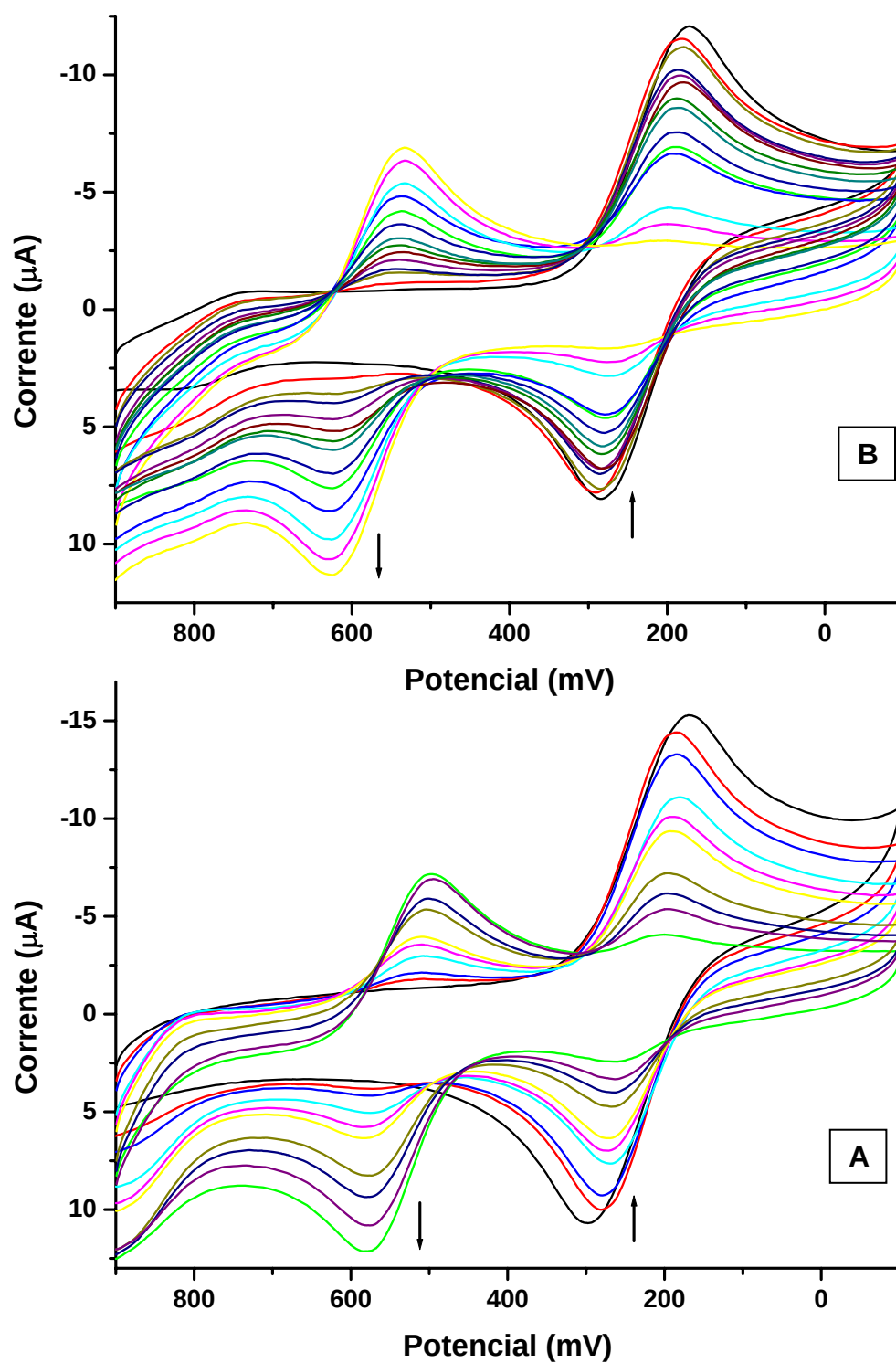


Figura 37. Voltamogramas cíclicos referente à interação do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂ImN(NO)]³⁺ com histidina (A) e metionina (B), em CH₃COOH/H₃COONa 0,1 mol L⁻¹ e pH = 3,5, e T = 37 °C.

4.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons

Quando existem elétrons não emparelhados em uma substância, seus spins estão alinhados ao acaso na ausência de um campo magnético. Quando submetidos a um campo magnético, entretanto, eles terão cada um uma direção preferencial e, como o número quântico de spin de um elétron é $1/2$, cada um pode ser considerado como 'girando' no sentido horário ou anti-horário em torno da direção do campo aplicado. A espectroscopia de RPE mede essencialmente a energia necessária para reverter o spin de um elétron não emparelhado[122].

Os espectros de ressonância paramagnética de elétrons para a interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂LNO]ⁿ⁺ com cisteína (Figuras 38 e 39), realizado em solução (água/etilenoglicol 50%) a temperatura de 77K, apresentaram um sinal com um fator *g* anisotrópico em aproximadamente 1,99 e 1,87, típico do NO. O valor de *g* e a estrutura hiperfina do nitrogênio são consistentes com um elétron desemparelhado ocupando um orbital π^* do ligante NO na espécie [RuNO], com significativo caráter de NO⁰. Não foi observado sinal de espécie paramagnética consistente com o íon Ru^{III}, ou seja o átomo metálico central continua na forma reduzida.

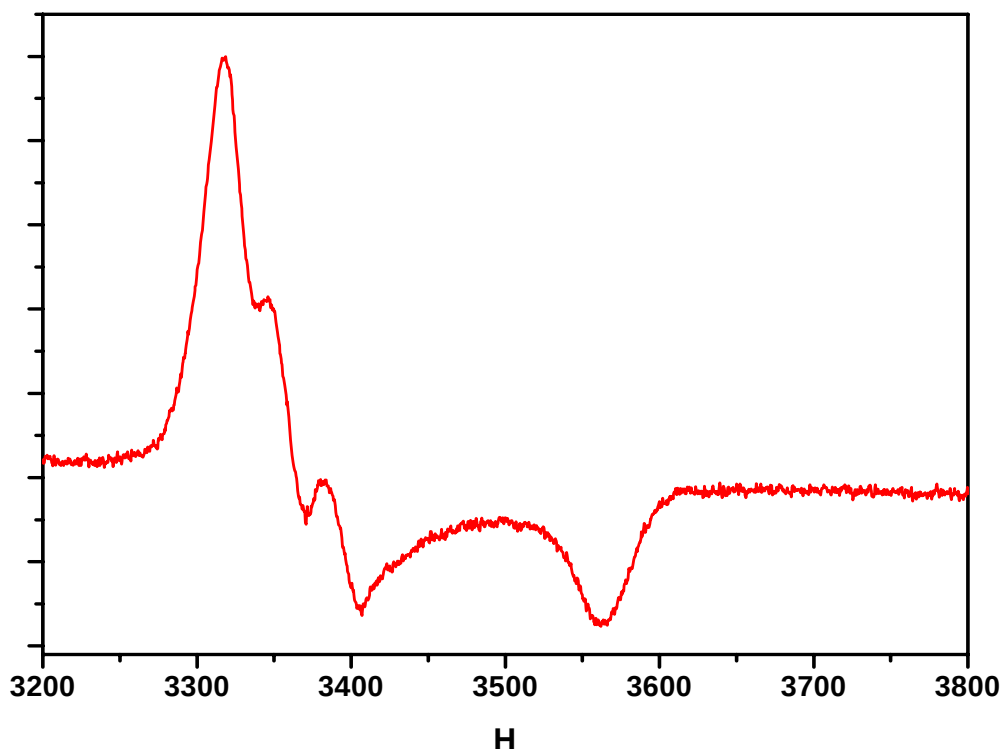


Figura 38. Espectro de EPR da interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína.

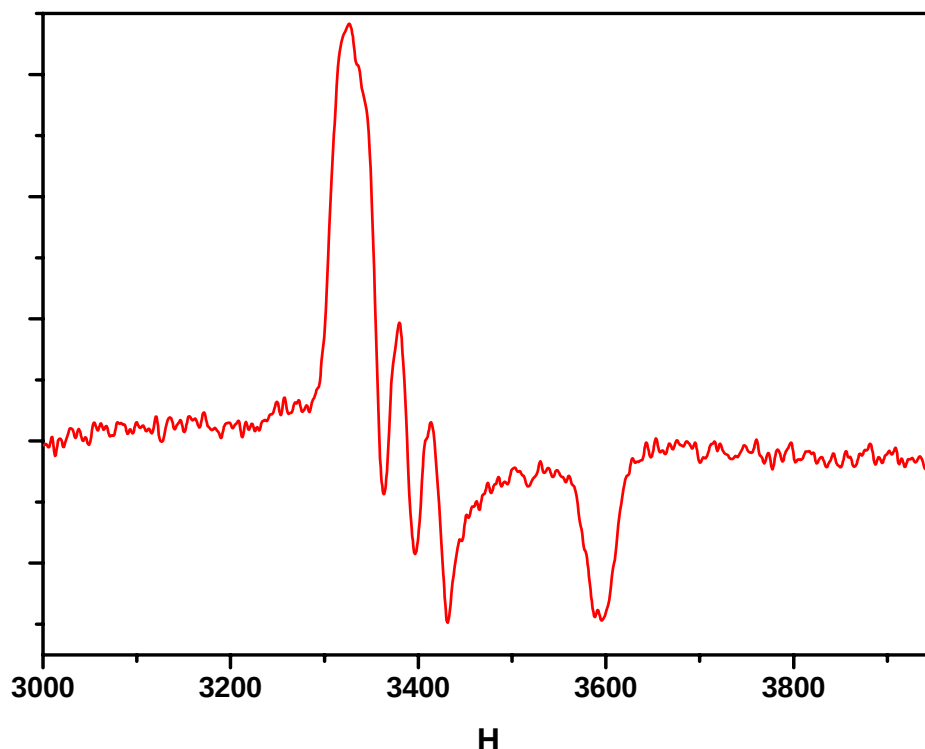


Figura 39. Espectro de EPR da interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína.

Dados da literatura [123] mostram que a redução do ligante NO⁺ coordenado ao composto *trans*-[Ru^{II}Cl(NO⁺)(cyclam)]²⁺ resulta na formação da espécie *trans*-[Ru^{II}Cl(NO⁰)(cyclam)]²⁺, que em seguida sofre uma labilização relativamente rápida do cloreto ($k = 2,0 \text{ s}^{-1}$ a 8⁰ C) formando o intermediário *trans*-[Ru^{II}(H₂O)(cyclam)(NO⁰)]²⁺ que por sua vez libera NO⁰ vagorosamente ($k = 6,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a 25⁰C). O sinal observado no espectro de EPR ($T = 77\text{K}$) durante a redução da espécie *trans*-[Ru^{II}Cl(NO⁺)(cyclam)]²⁺ é atribuído ao óxido nítrico coordenado ao intermediário *trans*-[Ru^{II}(H₂O)(cyclam)(NO⁰)]²⁺, antes que o NO⁰ seja solvatado.

Esse também é o caso de outros dois complexos, *trans*-[Ru^{II}(NO⁺)(NH₃)₄(H₂O)]²⁺ e o *trans*-[Ru^{II}(NO){(CH₃CH₂)₂PCH₂CH₂P(CH₂CH₃)₂}₂Cl]⁺², que também liberam NO⁰ lentamente após redução ($k = 4,0 \times 10^{-2}$ e $1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25⁰C, respectivamente). A redução desses complexos apresenta um sinal de EPR com valores de $g_{x,y} \approx 2,0$ e $g_z \approx 1,9$, bem característico do ligante NO⁰ coordenado [71, 124, 125]. Contrariamente, é difícil detectar sinais de EPR para complexos nos quais o NO⁰ é liberado rapidamente.

4.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

4.5.1. Cisteína e glutathiona

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação muito utilizada atualmente. As razões para a utilização desse método são: a sua sensibilidade, sua disposição para adaptação a determinações quantitativas exatas, sua conveniência para separar espécies não voláteis ou termicamente instáveis e, sobretudo, sua aplicabilidade comum para substâncias de interesse fundamental para a indústria e para muitos campos da ciência [126]. Durante os últimos anos, o desenvolvimento de colunas mais eficientes e o aumento da variedade de técnicas de detecção têm tornado a CLAE uma ferramenta ainda mais adequada para separação e determinação de complexos metálicos [127-129].

As reações de interação dos tióis com nitrosilo complexos constituem um de seus modos de reatividade mais importantes [82, 100]. É observado que quando soluções de complexos do tipo {MNO} [82] são colocadas em meio neutro com cisteína, há o aparecimento de uma banda de absorção em torno 300 - 450 nm [108, 130]. A banda que surge em torno de 300-450 nm é atribuída a uma transição de transferência de carga do metal para o ligante bipyridina(TCML) [108, 130].

No entanto o uso da cromatografia líquida de alta eficiência para este tipo de reação com tióis, não é utilizado em trabalhos publicados na literatura. Com isso, os dados obtidos neste trabalho contribuem para que este tipo de reação possa ser investigado através de várias técnicas espectroscópicas e cromatográficas.

2 mg (0,003 mmol) de $\text{cis-[Ru(bpy)}_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ foi dissolvido em 5 mL de uma solução tampão de BTP $0,01 \text{ Mol L}^{-1}$, sob agitação e atmosfera inerte. A reação foi monitorada por CLAE onde se observou a diminuição da espécie nitrosilo com a formação da espécie aqua, verificada por espectroscopia eletrônica na região do UV-visível. A velocidade desta reação é extremamente dependente da concentração de H_3O^+ , visto que em pH mais elevados [98, 108], a reação acontece com uma velocidade maior. Sendo assim, o pH escolhido para esta

reação foi 7, o qual possui uma velocidade de interação possível de ser acompanhada por CLAE.

A Figura 40 mostra o acompanhamento cromatográfico referente à reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína. É observado claramente que logo após a dissolução do nitrosilo complexo, só uma espécie com tempo de retenção em 8,40 minutos, está presente na solução. Na Figura 41 A encontra-se o espectro eletrônico do pico com $t_r = 8,40$, no qual apresenta bandas de absorção características do íon complexo ($cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$) [98].

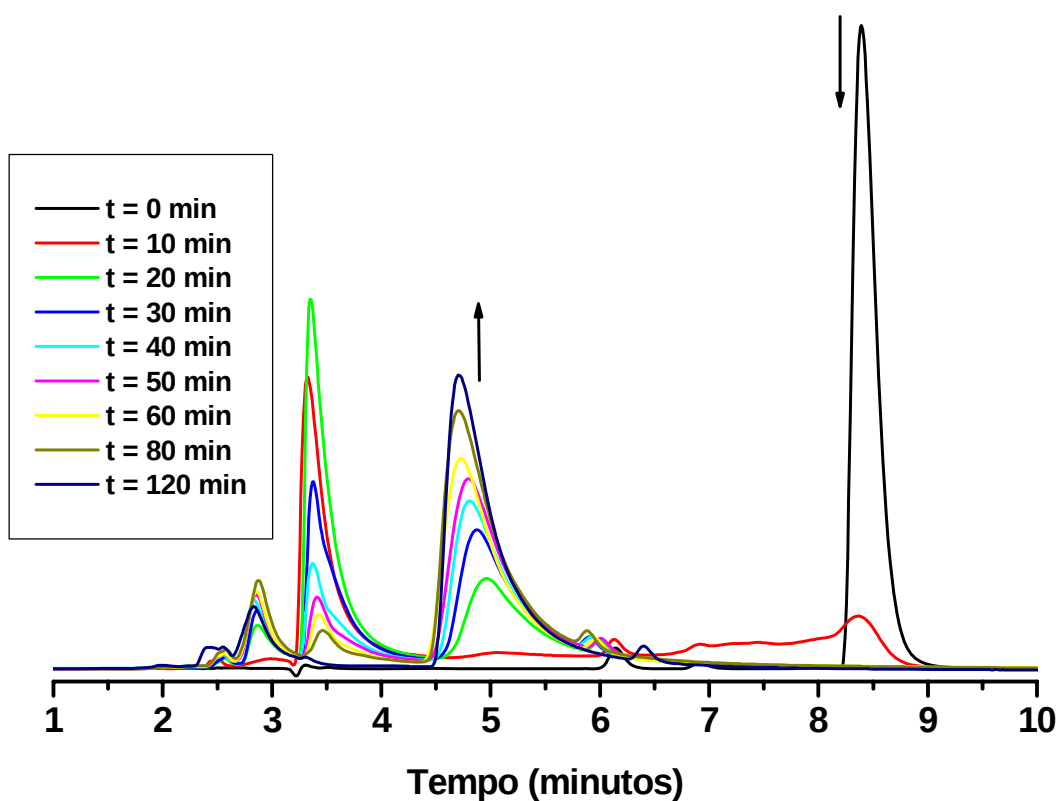


Figura 40. Cromatograma da interação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

Após adição de cisteína, ocorre a formação de uma espécie com tempo de retenção de 3,38 minutos. O espectro eletrônico deste pico (Figura 41B) mostra claramente a banda de absorção em 380 nm atribuída o aparecimento do segundo intermediário (*cis*-Ru(bpy)₂SO₃N(O)(RS)₂]⁻¹). Com o passar do tempo de reação, observa-se outro pico em 4,70 minutos. No qual apresenta bandas de transferência de carga do metal para o ligante (TCML), do tipo $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$ (bipiridina), características do aqua complexo (Figura 41 C) [98, 108].

Além disso, verifica-se uma diferença significativa nos tempos de retenção de ambos os complexos, 8,40 e 4,70 minutos, respectivamente. Devido à menor carga no íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(H₂O)], faz com que o mesmo apresente características mais polares e, conseqüentemente, uma menor interação com a coluna C-18 μ Bondapak Waters recheada com octadecilsilano.

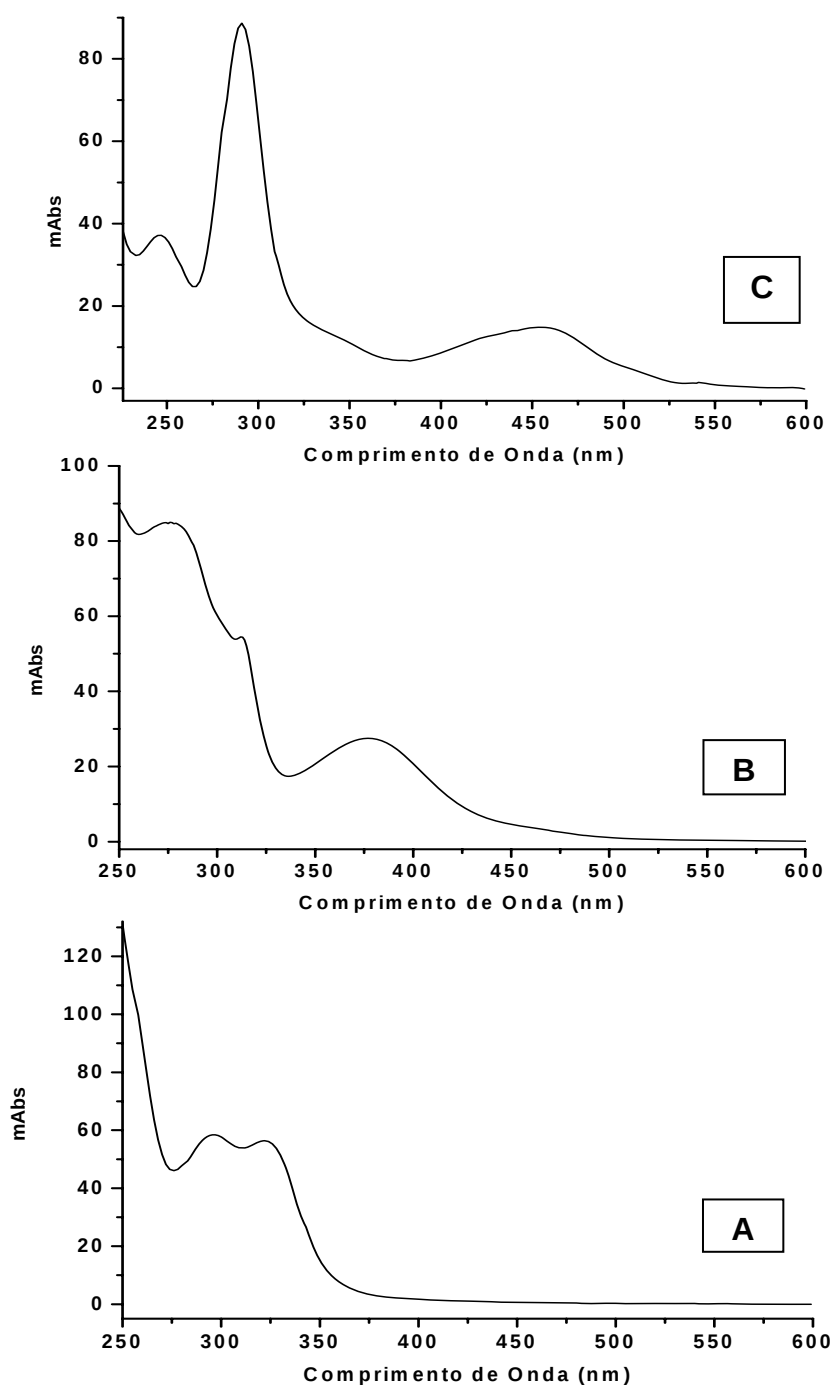


Figura 41. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 8,40$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 3,38$ min; Espectro C – Espécie com $t_r = 4,70$ min.

Com relação à reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com glutathiona (Figura 42), observa-se o mesmo comportamento apresentado na reação com cisteína. Porém houve modificação nos tempos de retenção dos respectivos compostos gerado nesta reação, devido à mudança na coluna cromatográfica. A coluna utilizada nesta reação foi a do tipo C-18 Supelcosil. O primeiro cromatograma corresponde ao composto $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$, o qual apresenta $t_r = 2,15$ minutos, sendo que o espectro eletrônico do mesmo possui bandas de absorção características desta espécie [98].

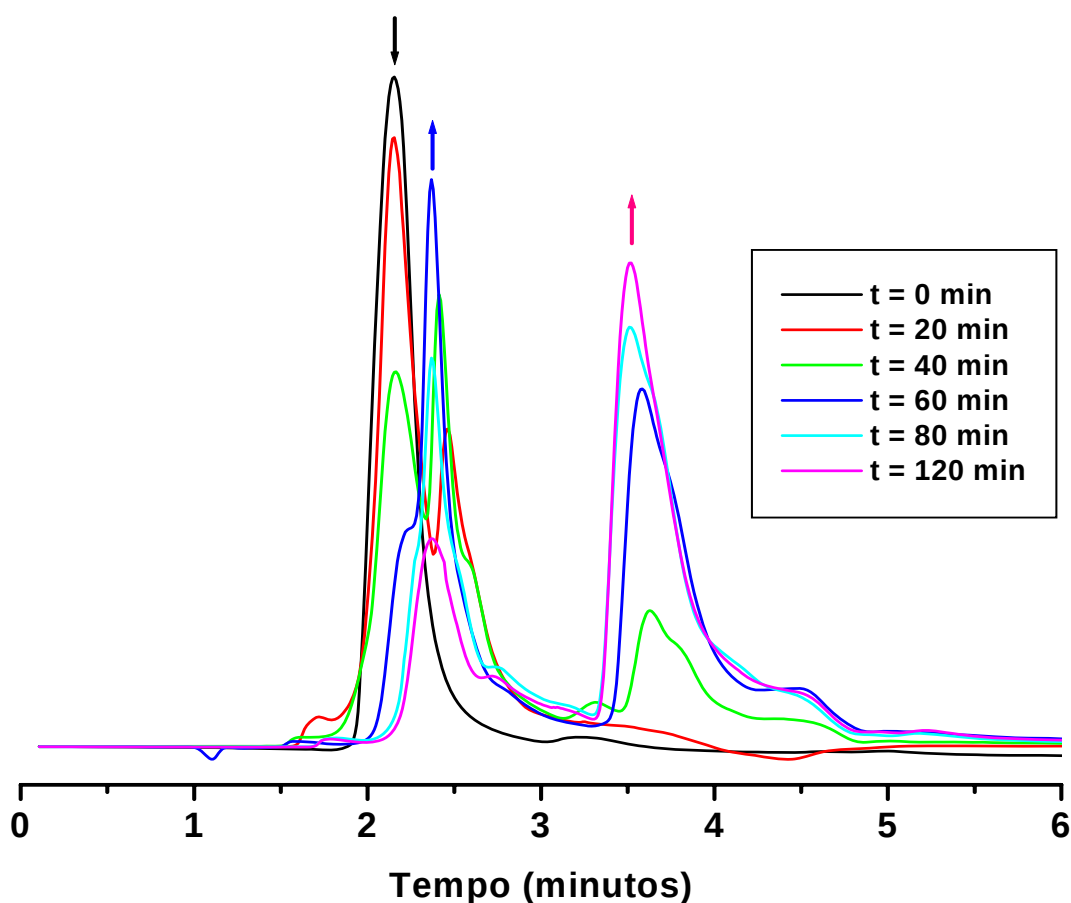


Figura 42. Cromatograma da reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com glutathiona $\lambda_{\text{analítico}} = 300$ nm, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

Ao adicionar o tiól, ocorre a diminuição deste pico e o aparecimento de uma nova espécie com tempo de retenção de 2,40 minutos atribuído ao aduto formado entre o nitrosilo complexo e a glutathiona, visto que o espectro deste pico apresenta a banda em 380 nm (Figura 43 B). Com a decomposição deste intermediário e a formação do produto, torna-se coerente o aparecimento da terceira espécie com tempo de retenção de 4,15 minutos.

Assim como ocorre com a cisteína, o espectro eletrônico deste pico (Figura 43 C) possui as bandas de transferência de carga dos orbitais $d\pi$ rutênio para os orbitais de caráter π^* da bipyridina, referente ao aqua complexo [98]. Com isso, pode-se concluir que a reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína e glutathiona apresentam o mesmo mecanismo, sendo este resultado coerente com os obtidos nas cinéticas.

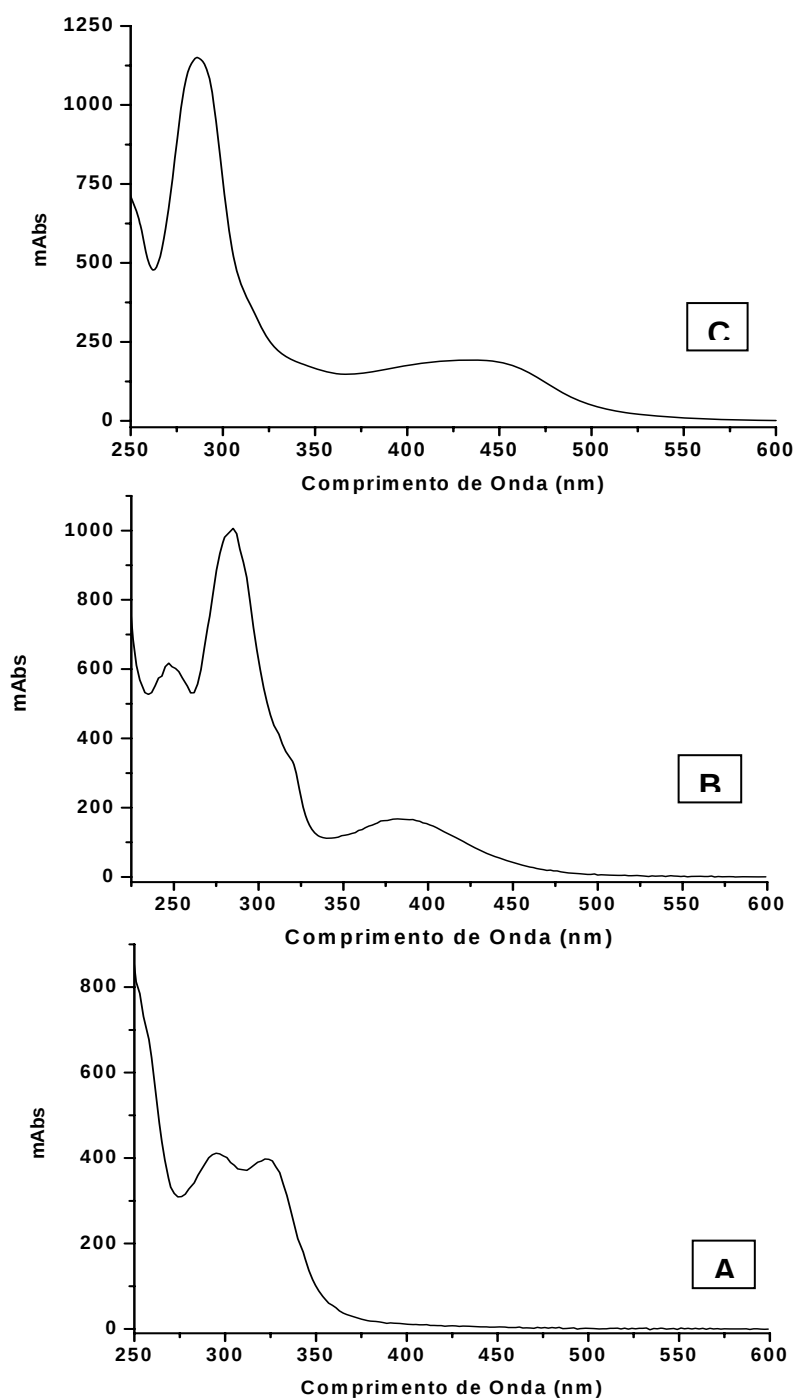


Figura 43. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com glutathiona: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,15$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 3,35$ min; Espectro C – Espécie com $t_r = 3,52$ min.

O acompanhamento referente à reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína encontra-se ilustrado na Figura 44. A partir dos resultados obtidos observa-se o mesmo comportamento apresentado na reação do sulfito complexo com os tióis, porém os tempos de retenção são diferentes. Por isso faz-se necessário descrever o decorrer da reação em questão. O cromatograma em preto refere-se à injeção do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³, o qual possui $t_r = 2,75$ minutos e o espectro eletrônico característico deste composto.

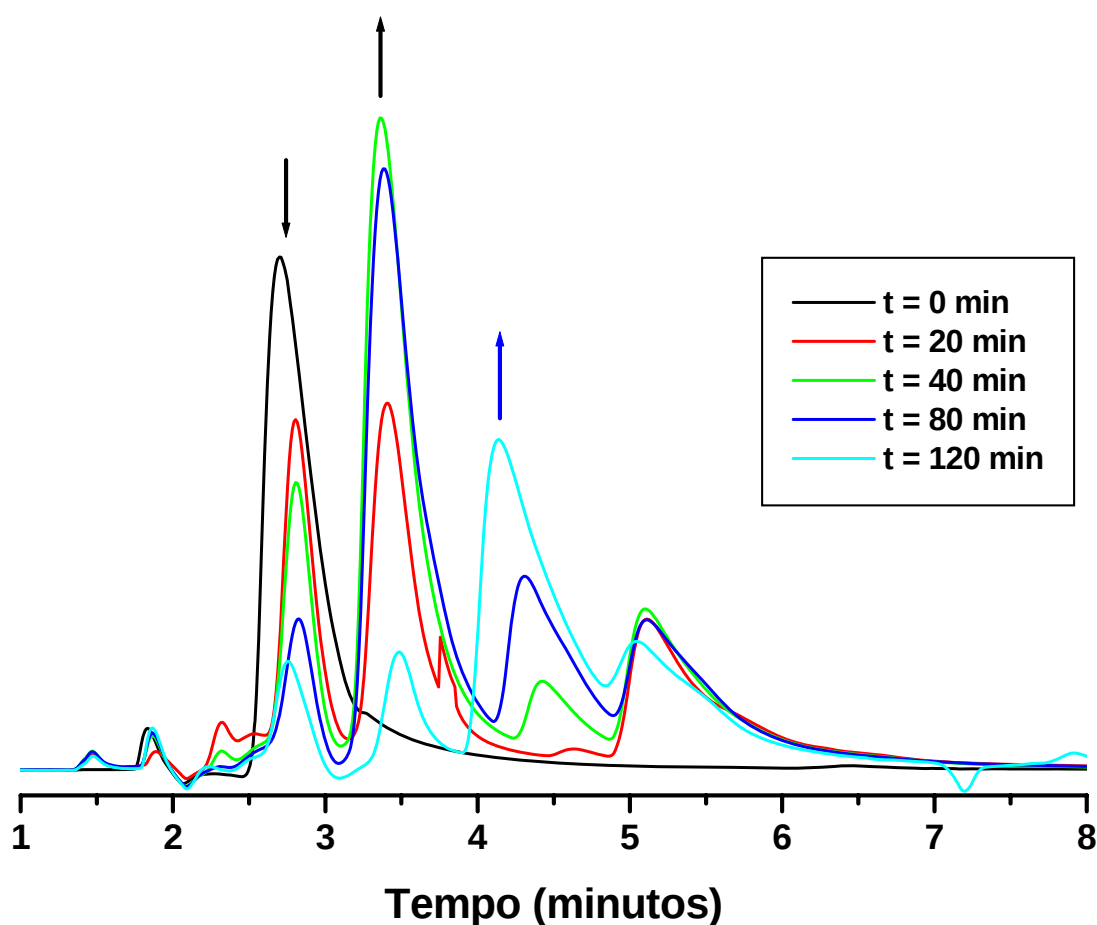


Figura 44. Cromatograma da interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com cisteína $\lambda_{\text{analítico}} = 300$ nm, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

Após adição de cisteína, ocorre o aparecimento do intermediário com banda de absorção em 380 nm, como foi observado no espectro da Figura 45 B. Com o passar do tempo houve a formação do aqua complexo em que o mesmo apresenta bandas de absorção referentes a esta espécie (Figura 45 C). A formação da nova espécie (4,15 minutos) com tempo de retenção superior ao do complexo de partida (2,75 minutos) podem ser justificada em termos da interação fase estacionária e amostra, ou seja, à medida que o NO se dissocia, a nova espécie formada apresenta um maior interação com a coluna e, por consequência, apresenta um maior tempo de retenção.

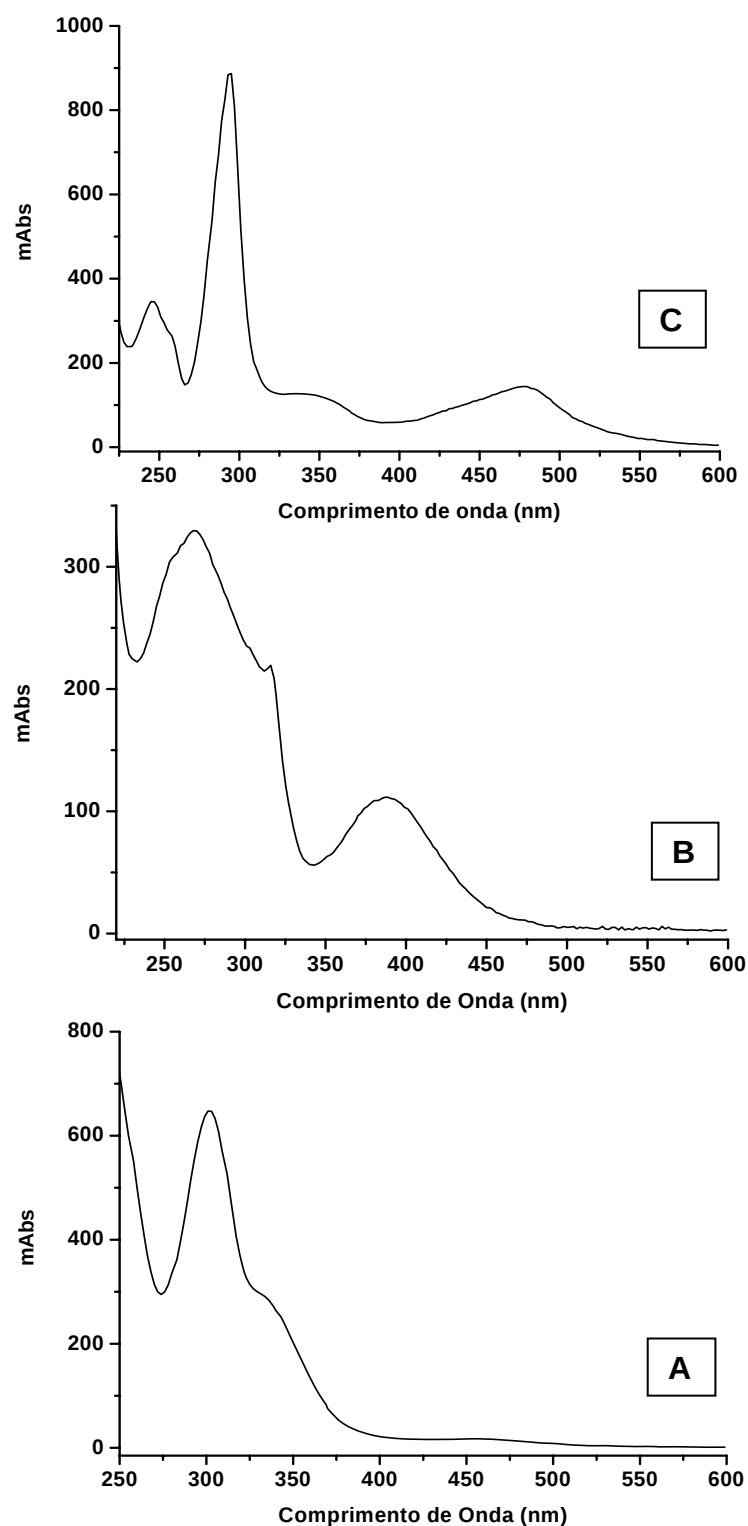
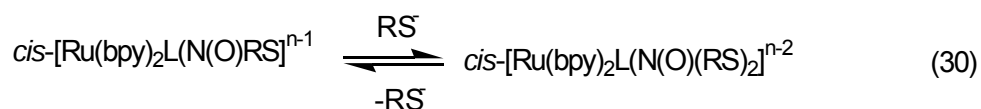
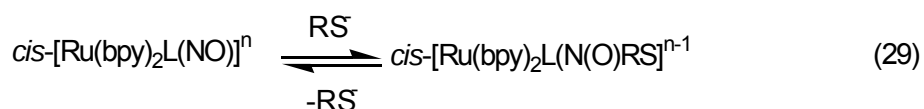


Figura 45. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo cis- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,75$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 3,35$ min; Espectro C – Espécie com $t_r = 4,15$ min.

Além disso, o pico cromatográfico com tempo de retenção de 5,20 minutos que surge junto com o produto final é atribuído a formação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO₂)]⁺². Isto ocorre devido à aproximação do pKa de equilíbrio das espécies NO⁺/NO₂⁻ [98], fazendo com que parte do nitrosilo complexo forme esta espécie antes do ataque dos redutores biológicos.

Na figura 46 encontram-se as variações que acontecem durante a reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com glutathiona, além dos respectivos espectros eletrônicos (Figura 47). Assim como foi observado na reação com cisteína, os dados obtidos com glutathiona apresentaram o mesmo comportamento cromatográfico.

Baseado em estudos cinéticos [82, 100, 131], no espectro de EPR e nos resultados obtidos nos cromatogramas, esta reação apresenta o seguinte esquema de redução e liberação do óxido nítrico (Equação 29-31):



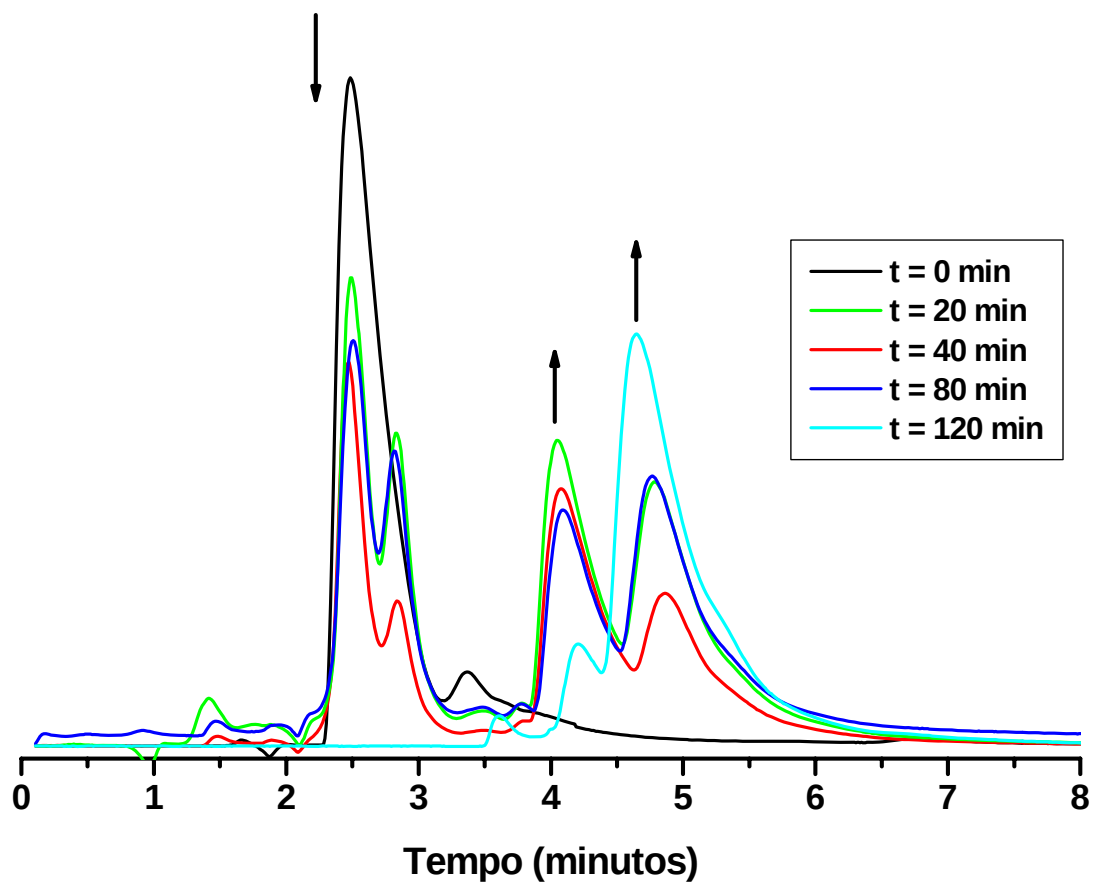


Figura 46. Cromatograma da interação do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com glutathione $\lambda_{\text{analítico}} = 300$ nm, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

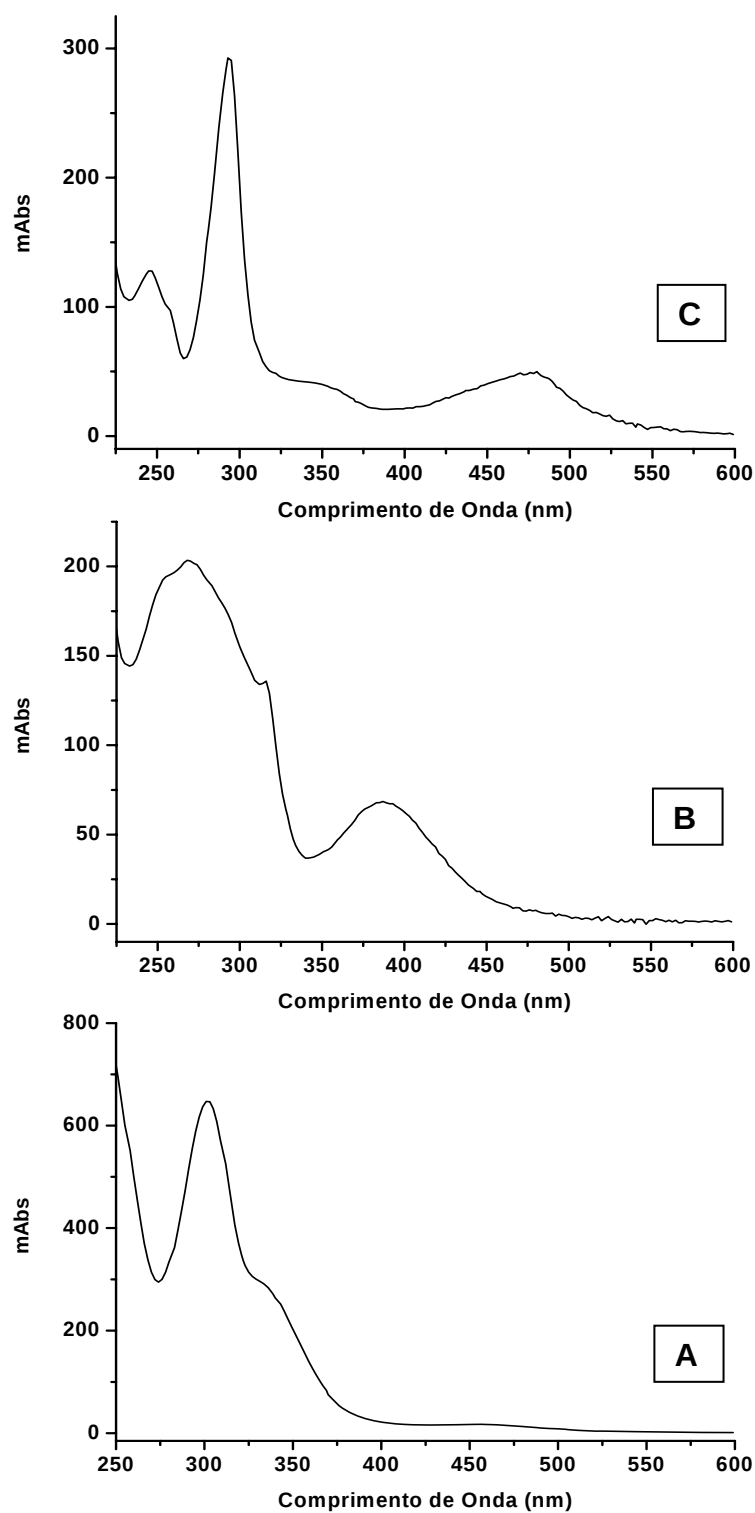


Figura 47. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com glutathione: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,48$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 4,04$ min; Espectro C – Espécie com $t_r = 4,64$ min.

4.5.2. Metionina e histidina

Na Figura 48 encontram-se os cromatogramas referentes à reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com metionina. O primeiro cromatograma apresentam um pico majoritário com tempo de retenção em 2,52 minutos, sendo que o espectro eletrônico deste composto, ilustrado na Figura 49 A, possui bandas de absorção características desta espécie. Ao adicionar a metionina, não há formação do aduto entre o enxofre e o óxido nítrico devido ao bloqueio provocado pelo grupo metila no qual está ligado no aminoácido.

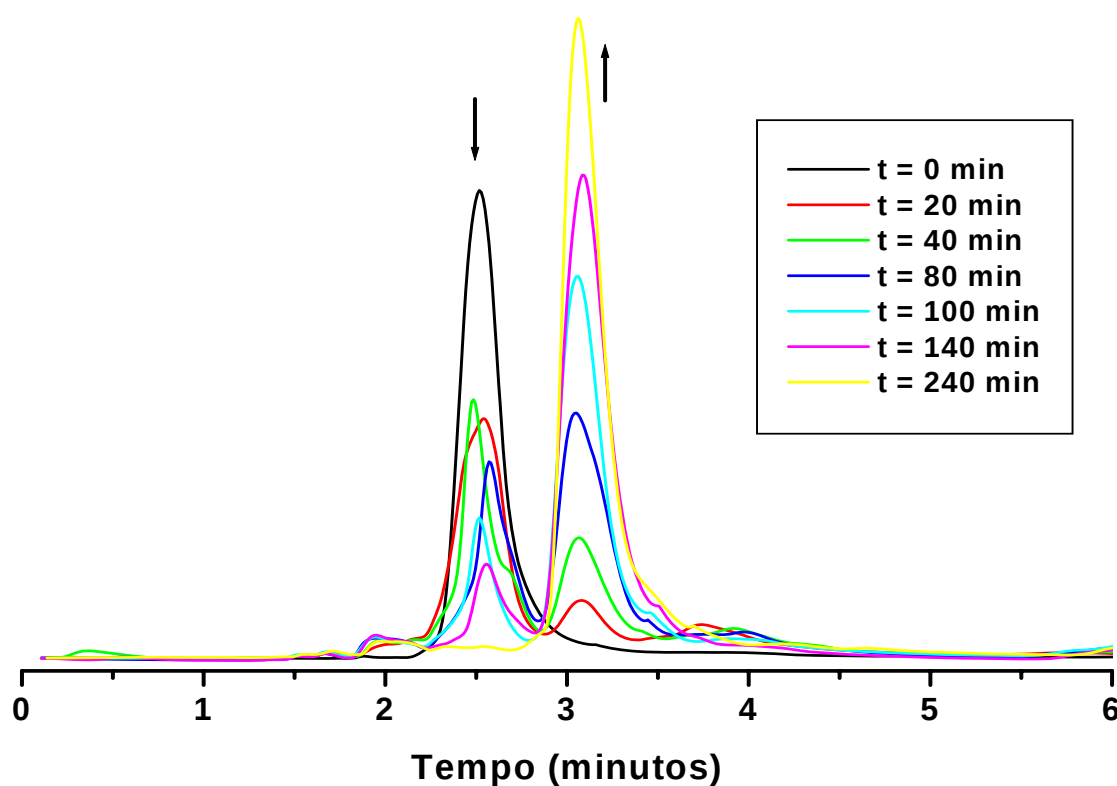


Figura 48. Cromatograma da reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com metionina $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

No decorrer da reação ocorre a formação de outra espécie com $t_r = 3,25$ minutos atribuído ao aqua complexo gerado, o qual apresenta um espectro eletrônico típico deste composto (Figura 49 B)[98].

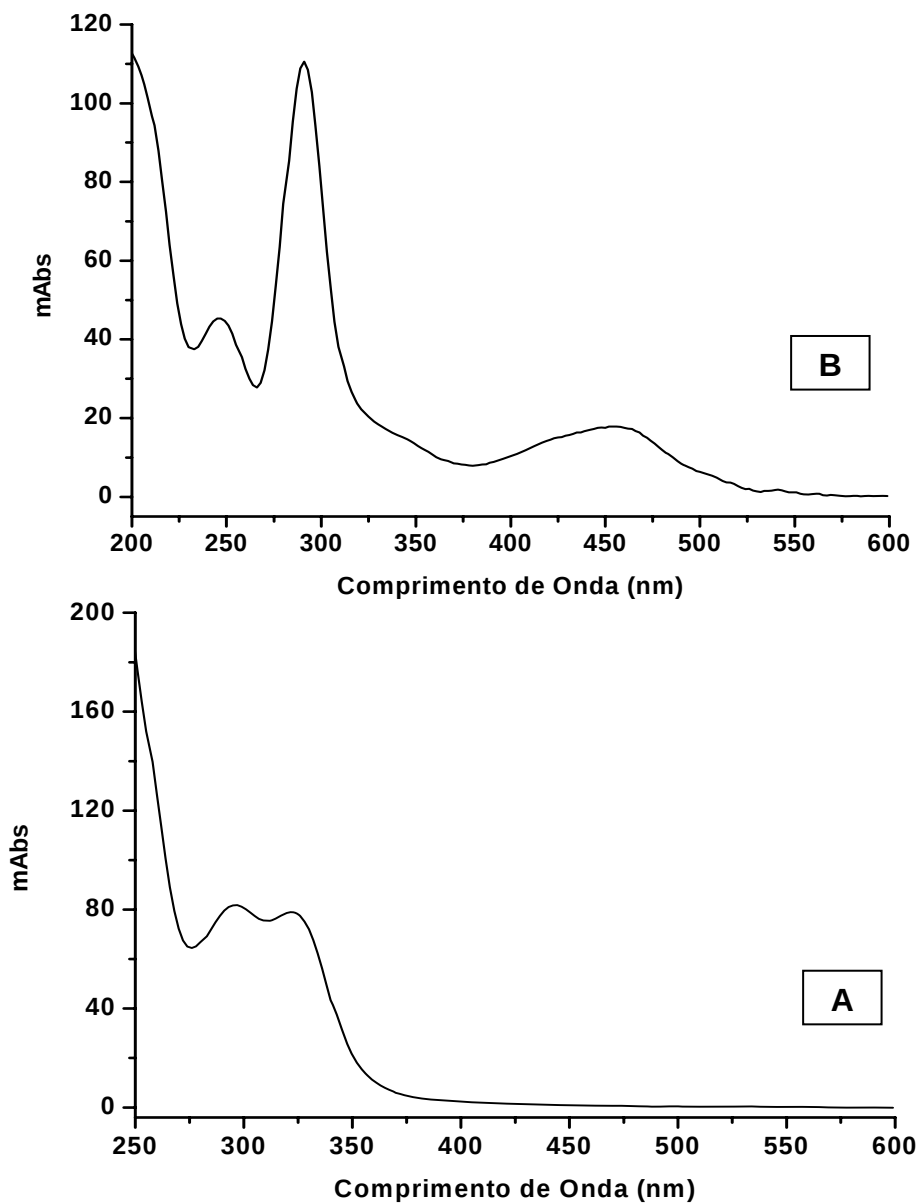


Figura 49. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com metionina: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,52$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 3,05$ min.

Com relação à reação deste complexo com histidina (Figura 50), o perfil cromatográfico apresenta-se semelhante ao que foi obtido com a metionina assim como os espectros eletrônicos referentes aos picos cromatográficos (Figura 51). Com isso, pode-se concluir que os dois redutores possuem o mesmo mecanismo em que o óxido nítrico é reduzido sem que haja a formação do aduto.

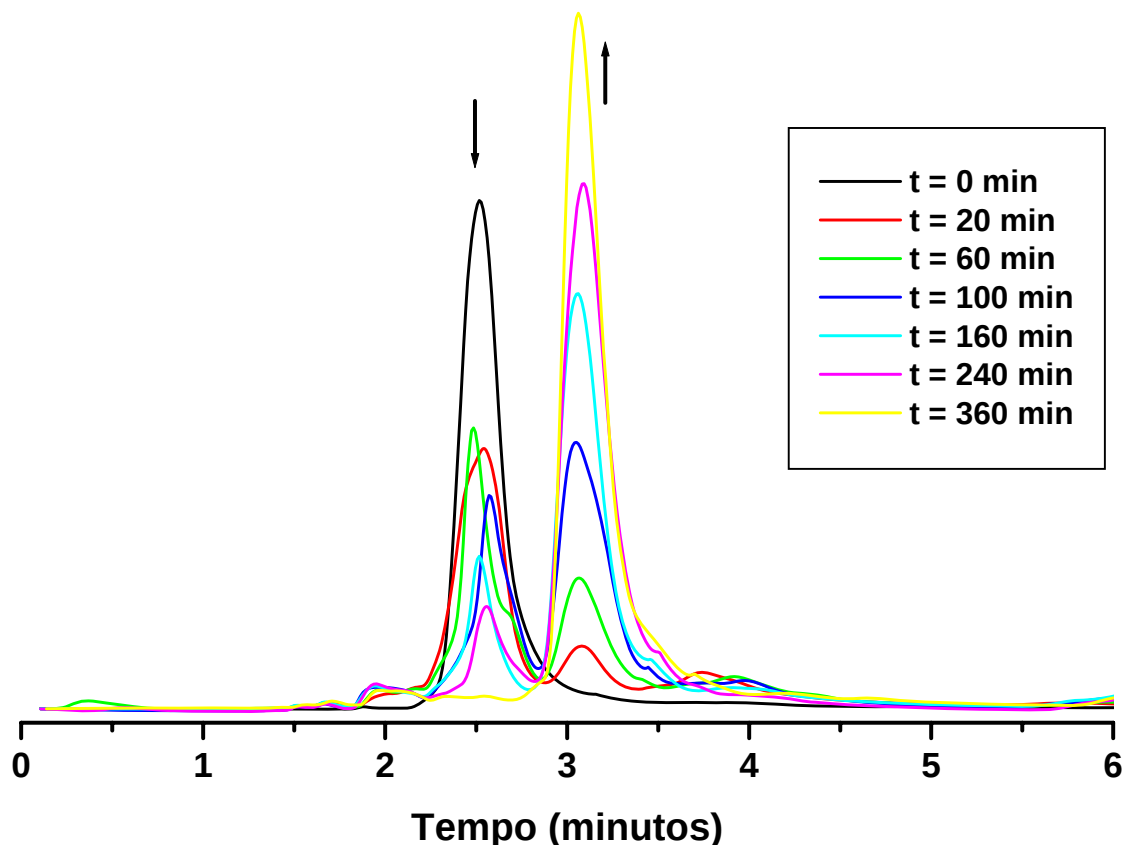


Figura 50. Cromatograma da interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com histidina $\lambda_{analítico} = 300$ nm, fase móvel = acetonitrila/Água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

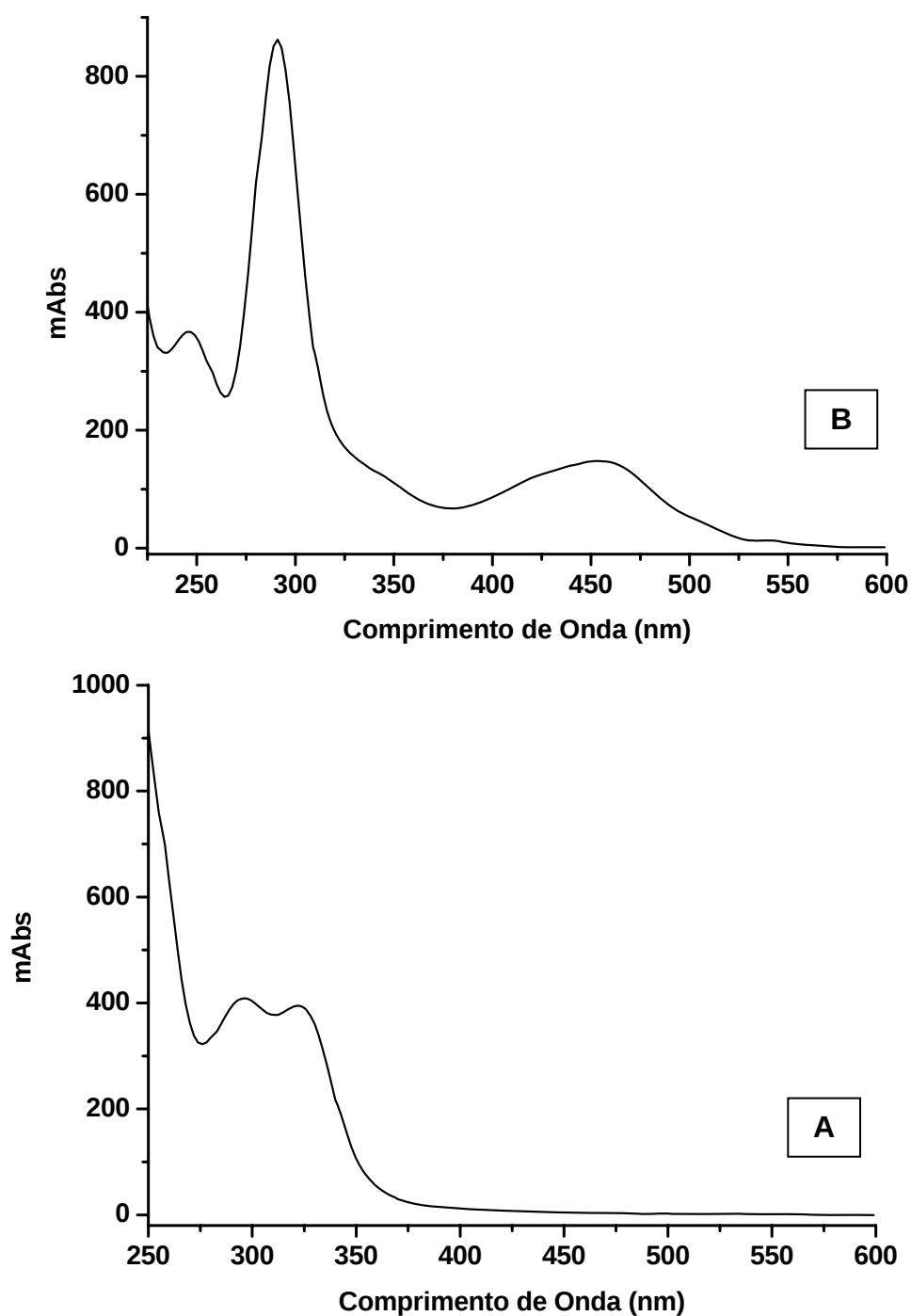


Figura 51. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com histidina: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,50$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 3,05$ min.

A reação também foi realizada com o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ onde nas Figuras 52 e 53 encontram-se os seus respectivos cromatogramas e espectros eletrônicos. Observa-se que, no início da reação, a existência de um único pico cromatográfico com tempo de retenção em 2,31 minutos referente ao nitrosilo complexo. Ao adicionar a metionina, verifica-se uma diminuição do pico em 2,31 minutos e o aparecimento de outro em 3,67 minutos referente ao aqua complexo formado a partir da redução e liberação do óxido nítrico.

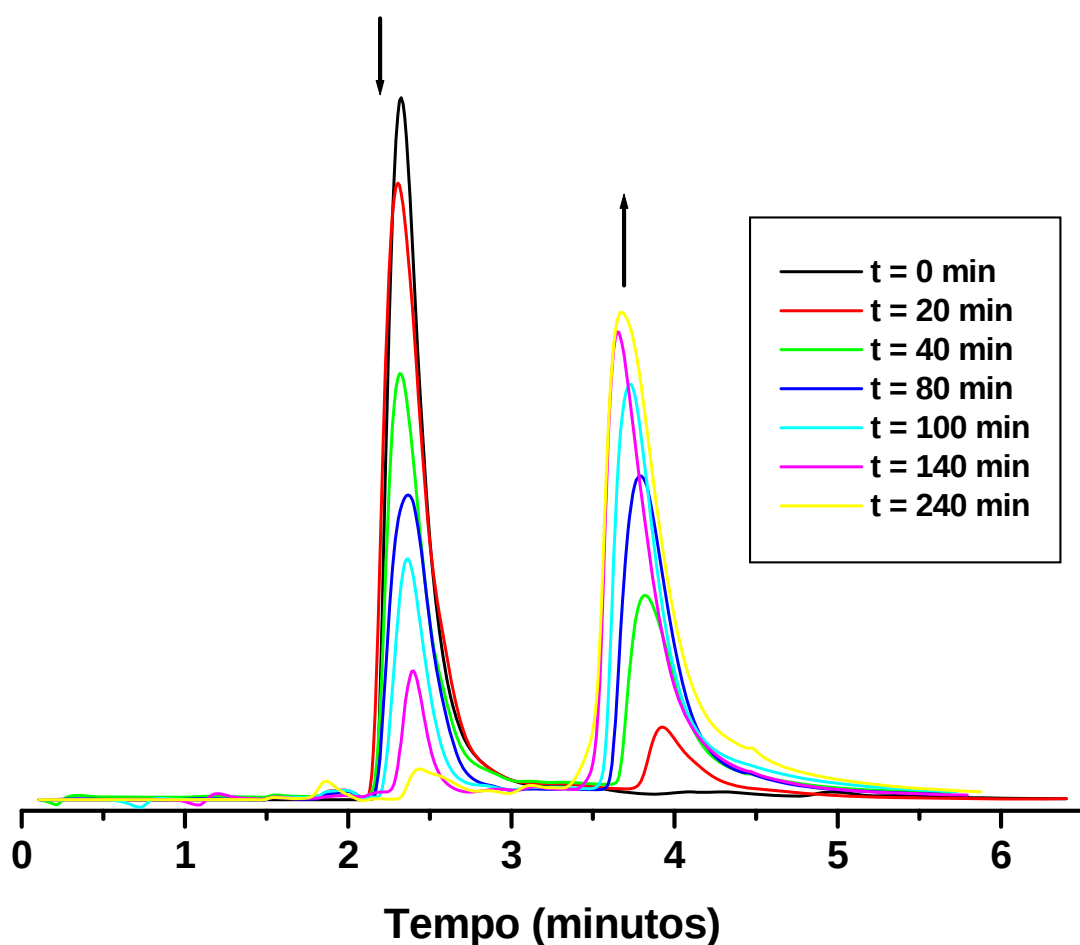


Figura 52. Cromatograma da interação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com metionina $\lambda_{\text{analítico}} = 300 \text{ nm}$, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

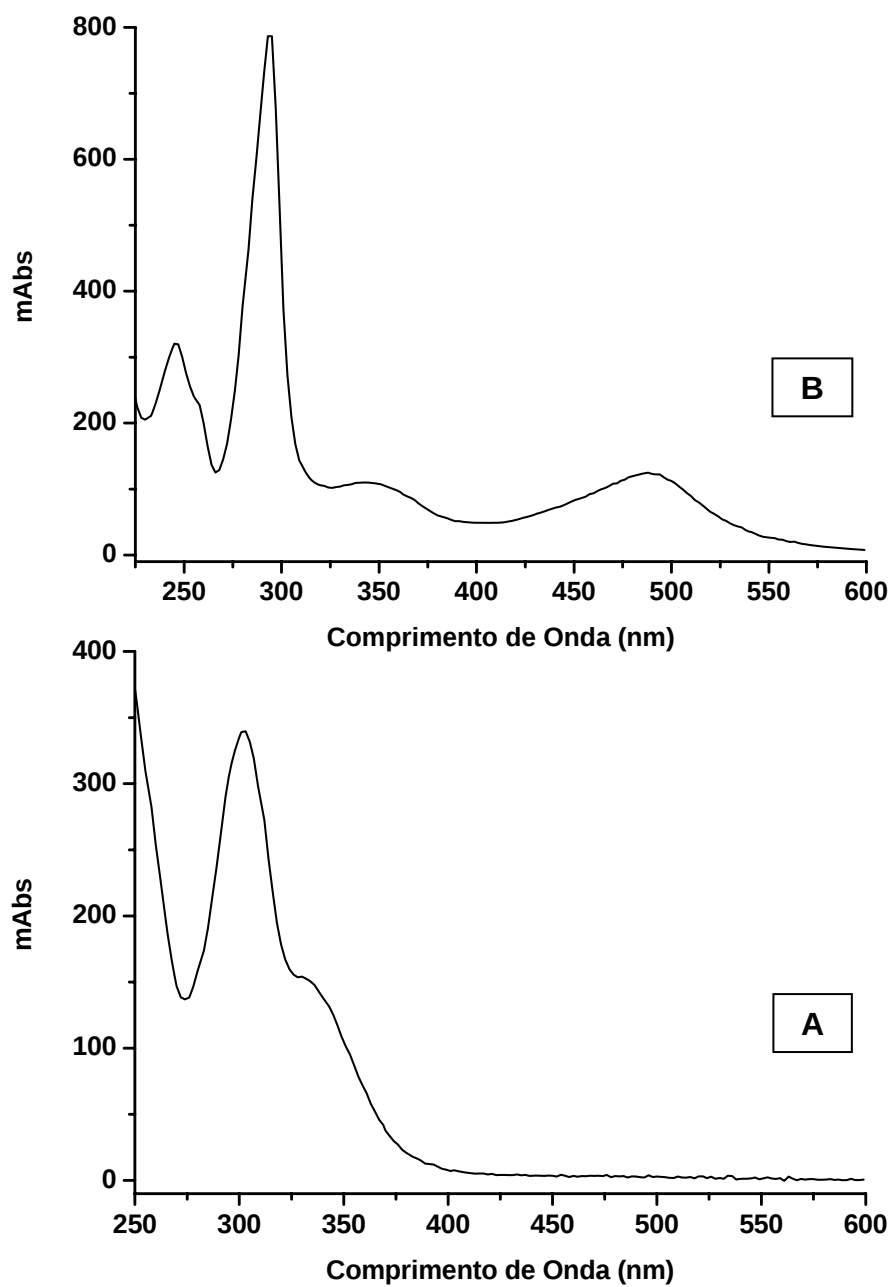


Figura 53. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com metionina: Espectro A - referente à espécie com t_r = 2,31 min; Espectro B – espécie com t_r = 3,67 min.

Assim como foi observado com o íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$, nesta reação não houve a formação de um intermediário com uma característica em torno de 380 nm referente ao aduto gerado quando se utiliza cisteína e glutatona, no qual possui um grupo SH na sua estrutura química. Além disso, ao comparar os tempos de retenção dos dois aqua complexo formado observa-se que o íon composto $cis-[Ru(bpy)_2ImN(H_2O)]^{+2}$ possui um caráter mais apolar.

Com relação ao acompanhamento realizado com histidina (Figuras 54 e 55), verifica-se um comportamento semelhante ao que foi apresentado com a metionina. Desse modo a redução do óxido nítrico se deve, provavelmente, a um processo de oxiredução sem que haja uma interação direta entre o aminoácido e o NO.

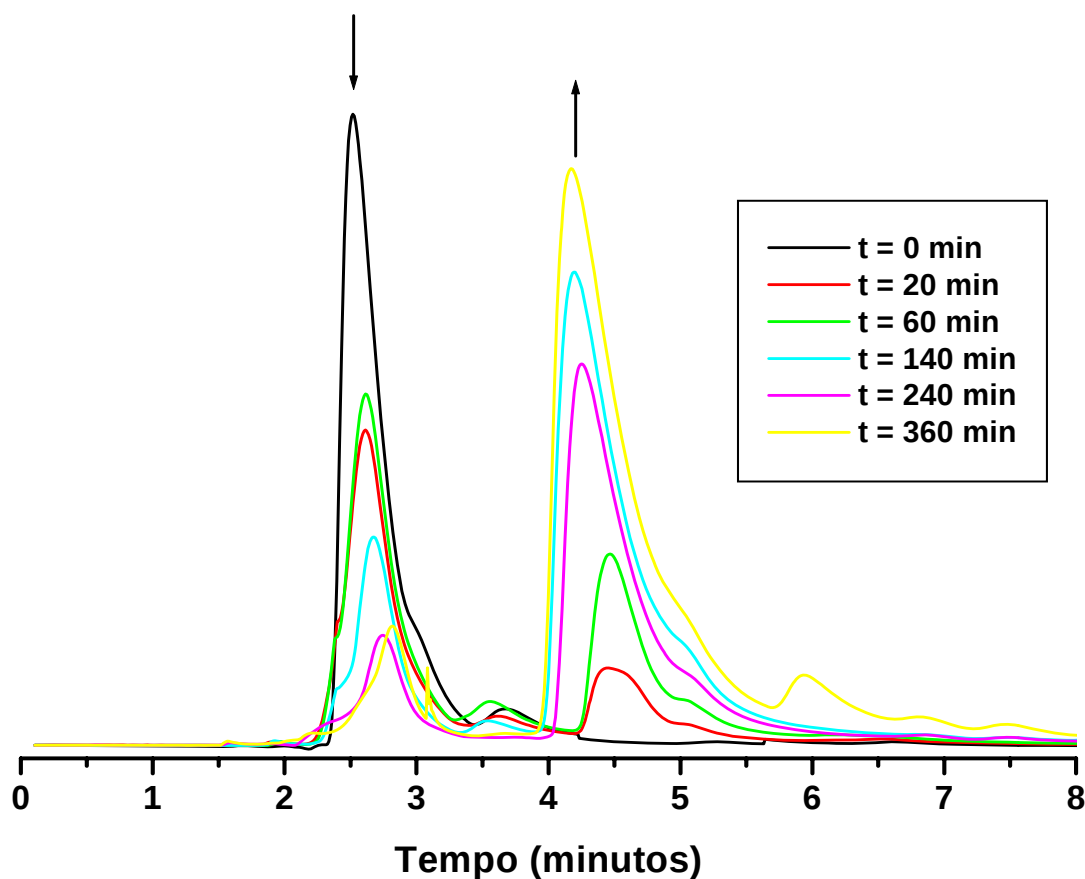


Figura 54. Cromatograma referente à interação do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$ com histidina $\lambda_{analítico} = 300$ nm, fase móvel = acetonitrila/água 20/80%, pH = 3,5, fluxo = 1 mL/min.

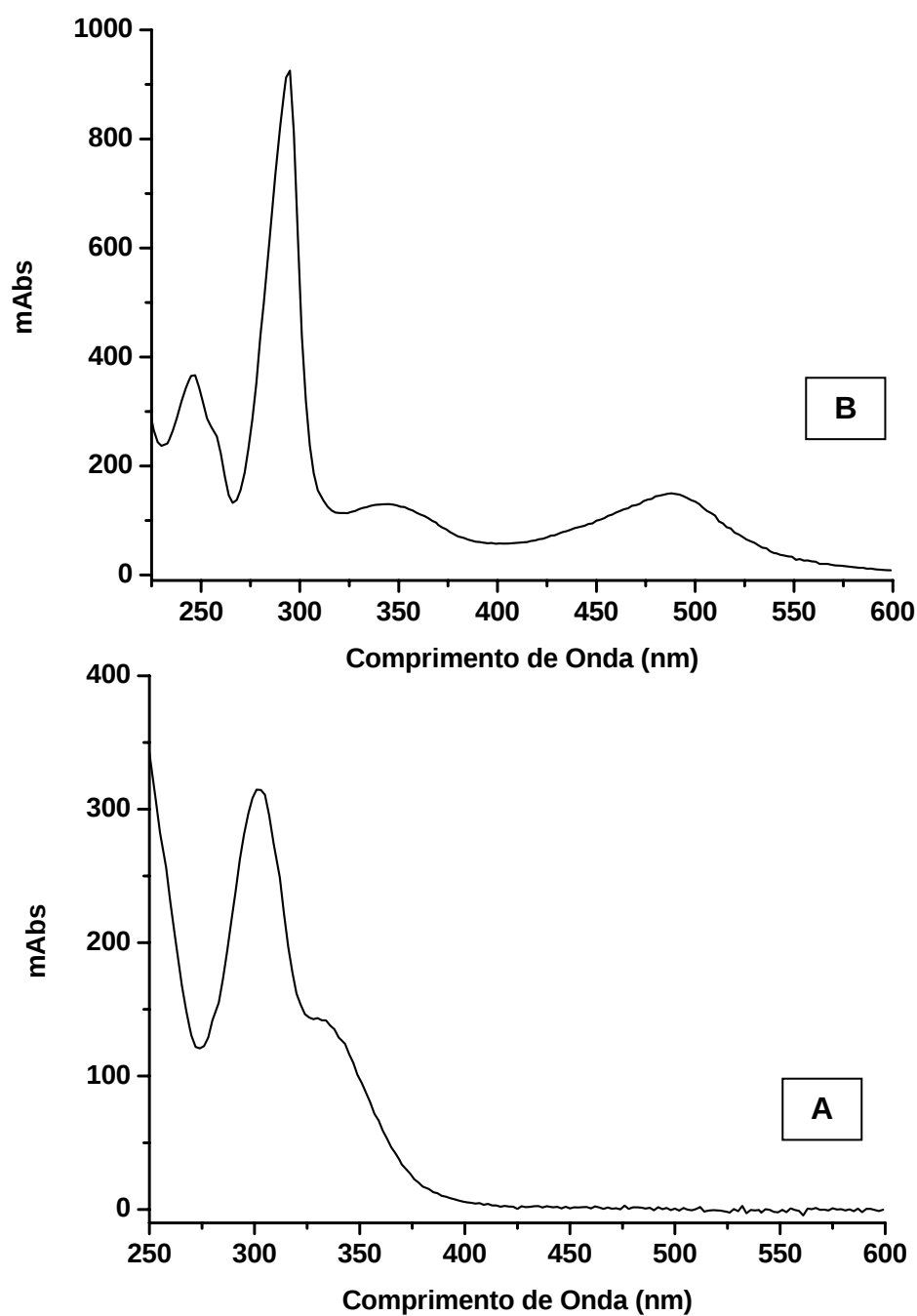


Figura 55. Espectros eletrônicos da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺ com histidina: Espectro A - referente à espécie com $t_r = 2,50$ min; Espectro B – espécie com $t_r = 4,17$ min

4.6. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi outra técnica utilizada neste trabalho para investigar a cinética das reações dos nitrosilo complexos com os tióis e aminoácidos. Na Figura 56 são observadas as variações espectrais no infravermelho da reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína, glutatona, metionina e histidina. Observa-se no espectro do composto inicial (linha preta), uma banda em torno de 1911 cm⁻¹ referente à frequência de estiramento do óxido nítrico coordenado na forma linear (NO⁺) [98].

A partir da adição dos redutores biológicos, verifica-se que houve uma diminuição desta banda devido à redução e labilização sofrida pelo óxido nítrico. Em concordância com os outros experimentos realizados, a liberação do ligante nitrosilo acontece. Estudo realizado com o nitroprussiato de sódio com tióis mostrou que os principais produtos de decomposição do intermediário são as espécies [Fe^{II}(CN)₅(NO)]³⁻ e [Fe^{II}(CN)₅(H₂O)]³⁻, sendo que a formação da última implica na liberação do NO com óxido nítrico livre ou como o nitrosotiól (RSNO) [82].

Além disso, trabalhos realizados com a reação de nitrosilo complexos com tióis [100, 132], demonstraram que há liberação da espécie N₂O em vez de óxido nítrico. Isto é verificado através do modo vibracional característico desta espécie em torno de 2100 cm⁻¹ [100, 132]. De acordo com os espectros vibracionais da reação entre o íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ e os redutores biológicos, o NO⁺ foi reduzido e labilizado na sua forma reduzida (NO⁰) sem que houvesse a formação de N₂O.

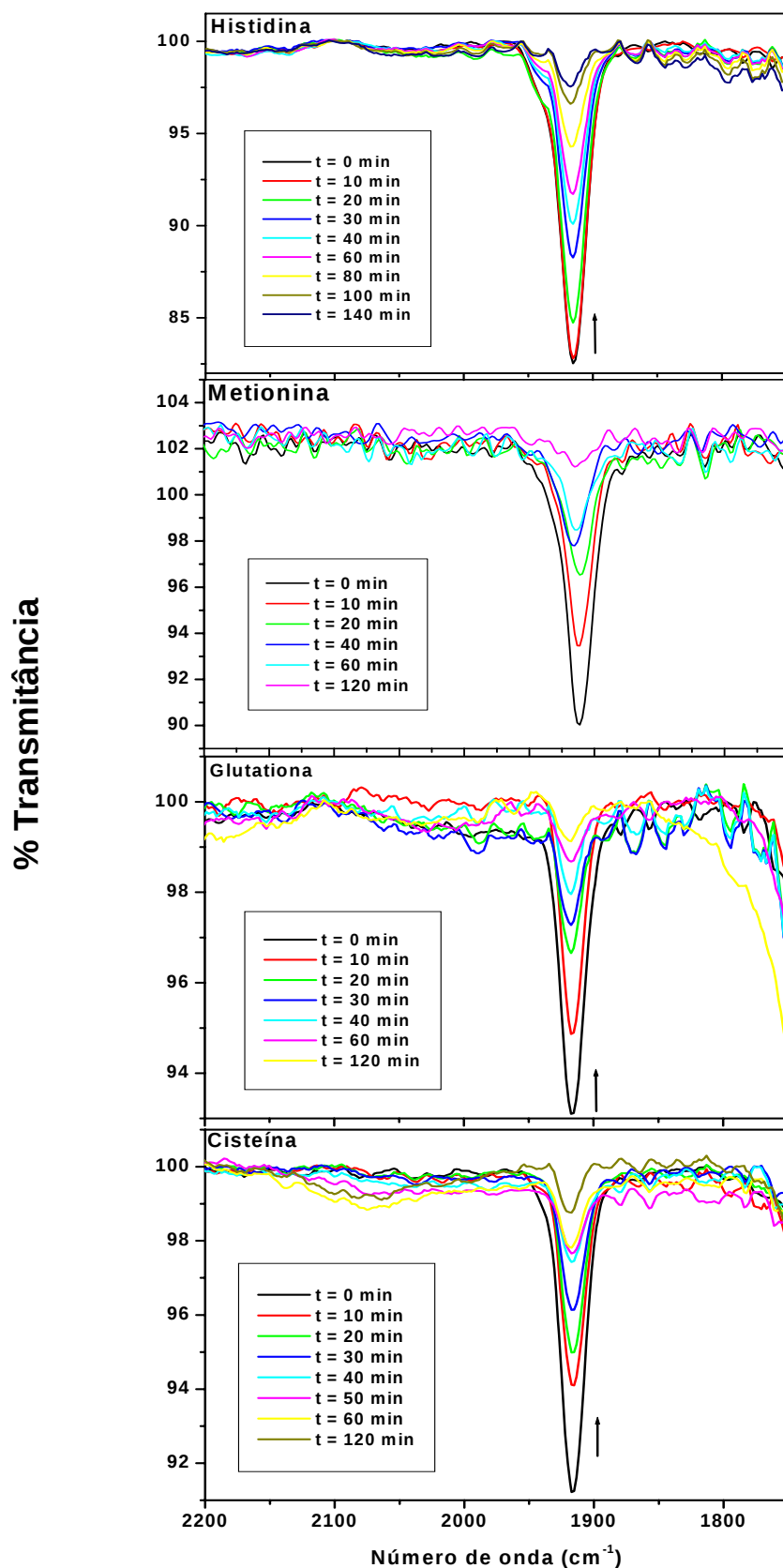


Figura 56. Variações espectrais na região do infravermelho, para as reações do íon complexo cis -[Ru(bpy)₂SO₃NO]⁺ com cisteína, glutathiona, metionina e histidina, respectivamente. Espectros obtidos em solução aquosa, em Temperatura = 25 °C.

A reação do íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³ com os redutores biológicos encontra-se ilustrado na figura 57. Assim como ocorreu com sulfito complexo, houve a diminuição na intensidade do pico em torno de 1940 cm⁻¹, referente ao estiramento do ligante nitrosilo (NO⁺). Isto acontece, devido à redução sofrida por este ligante provocada pelos redutores biológicos adicionados nas reações. Após esta redução, o óxido nítrico é labilizado do complexo na sua forma ativa, ou seja, NO⁰. Com isso, fica provado que não há formação da espécie N₂O, no qual apresenta o estiramento da ligação N-O em torno de 2200 cm⁻¹ [100, 132].

Além disso, foi verificada uma diminuição brusca na intensidade do pico logo após adição dos dois tióis. Isto se deve, provavelmente, a uma reação mais rápida do óxido nítrico com a cisteína e glutathione neste complexo do que outro composto estudado neste trabalho. Já a metionina e a histidina apresentaram comportamento semelhante ao sulfito complexo.

Com isso, verifica-se que a formação do aduto entre o tiol e nitrosilo complexo é um fator essencial para aumentar a velocidade de redução e labirização do óxido nítrico no íon complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)]⁺³, assim como foi observado no experimento cinético no qual este complexo apresentou uma constante de labilização do NO maior do que no sulfito complexo.

Os resultados obtidos com metionina e histidina apresentam uma diminuição gradual o pico referente ao estiramento do óxido nítrico. Isto demonstra que formação do aduto entre o enxofre da cisteína e glutathione e o óxido nítrico acelera o processo de redução e liberação deste ligante.

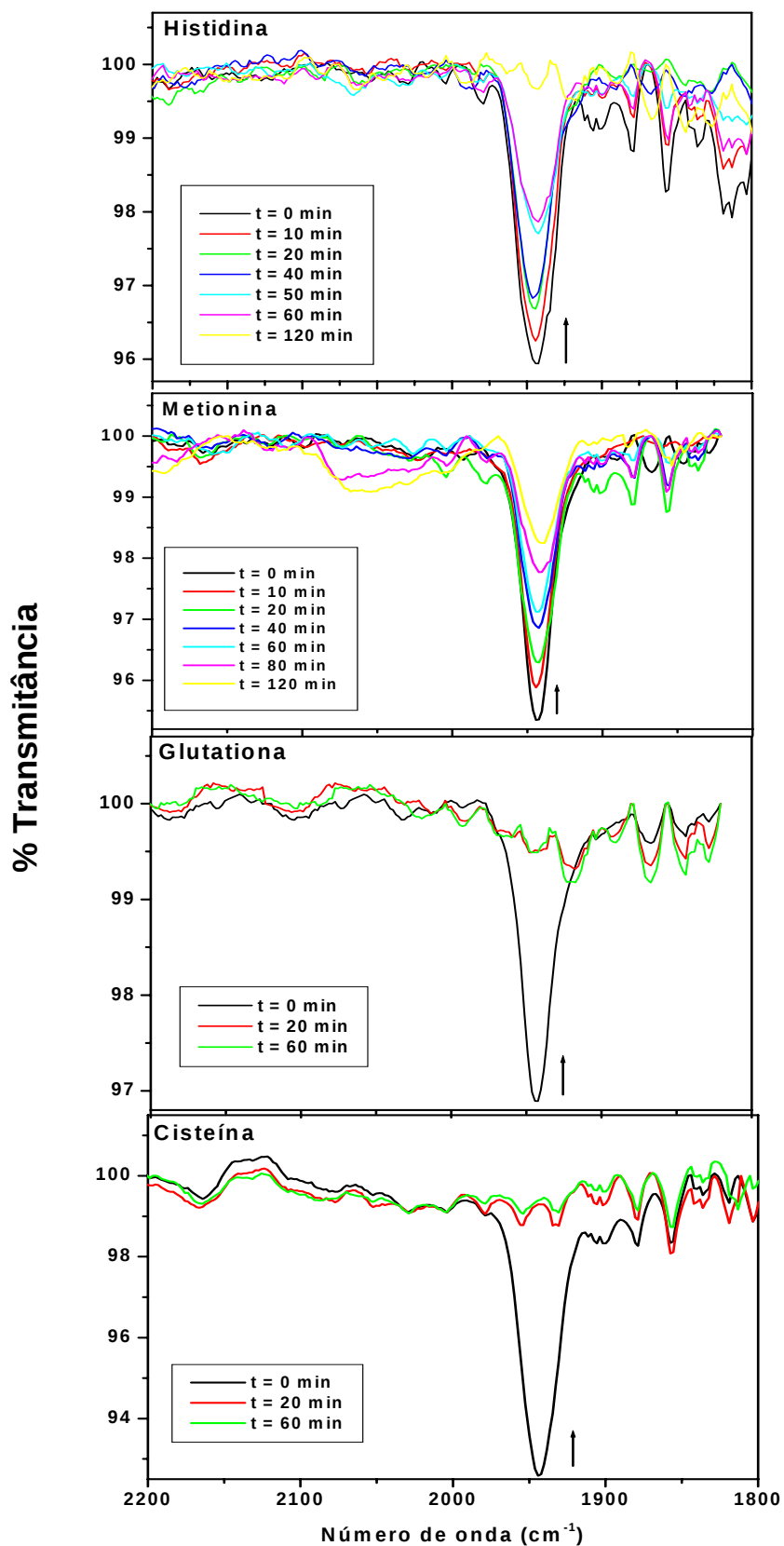


Figura 57. Variações espectrais na região do infravermelho, para as reações do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, glutathiona, metionina e histidina, respectivamente. Espectros obtidos em solução aquosa, em $T = 25^\circ\text{C}$.

4.7. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

4.7.1. Cisteína e glutathiona

A natureza de intermediários e produtos que acontecem na reação do complexo foi investigada utilizando-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Isto envolveu análise do deslocamento químico dos ^1H aromáticos das diferentes espécies que se formaram durante o acompanhamento da reação. Os sinais de hidrogênios do ligante bipyridina dependem da natureza do sexto ligante, fazendo com que ocorram deslocamentos químicos nesses sinais. A Figura 58 mostra a evolução da reação do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína, onde o primeiro espectro é referente ao íon complexo sem a presença do tiol, e a partir do segundo espectro a cisteína encontra-se presente no solvente deuterado.

A partir da adição da cisteína foi verificado um deslocamento dos sinais de prótons da bipyridina. Além disso, observa-se que na presença do tiol os sinais não apresentaram um desdobramento característico deste ligante coordenado devido à formação de uma espécie radicalar no solvente. Isto se deve a redução sofrida pelo NO^+ levando a sua forma ativa de NO^0 , no qual possui um elétron desemparelhado provocando uma perturbação no sinal de RMN ^1H . Além do mais, outra espécie é formada no meio devido à oxidação da cisteína através de um mecanismo que envolve o aparecimento de um radical ($-\text{S}\bullet$). Com isso, ocorre a contribuição de dois radicais para dificultar a obtenção de sinais dos prótons da bipyridina.

Após duas horas de acompanhamento da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína foi observado a formação de um precipitado branco devido à geração de cistina, sendo que esta é insolúvel em meio aquoso. Depois da eliminação do precipitado por meio de filtração e também do óxido nítrico através da passagem de um gás inerte na solução, observa-se uma maior resolução nos sinais do ligante.

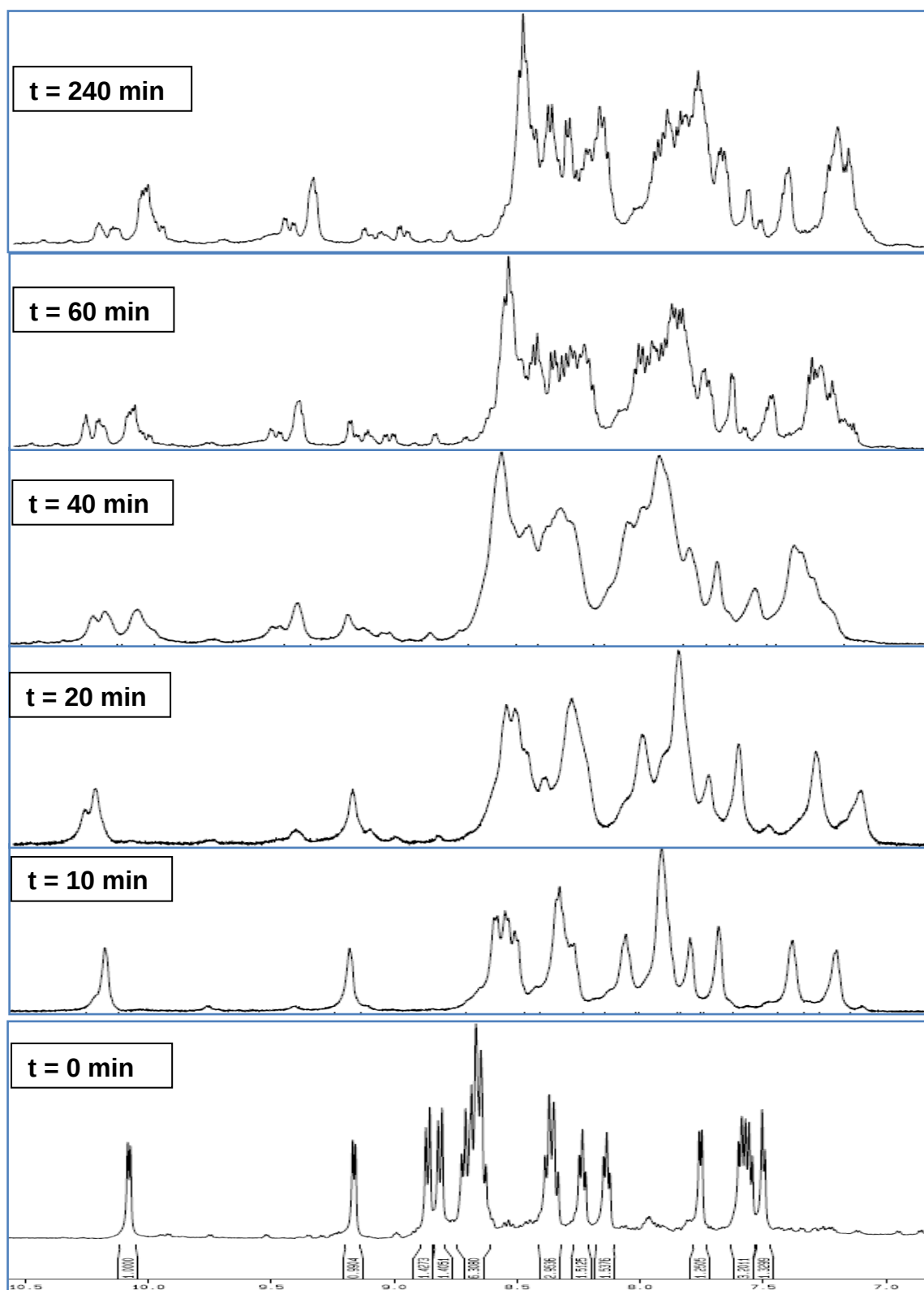


Figura 58. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com cisteína, obtidos em D_2O .

Na Figura 59 encontra-se o acompanhamento referente à reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com glutathiona, o qual apresenta comportamento semelhante ao que foi obtido com a cisteína.

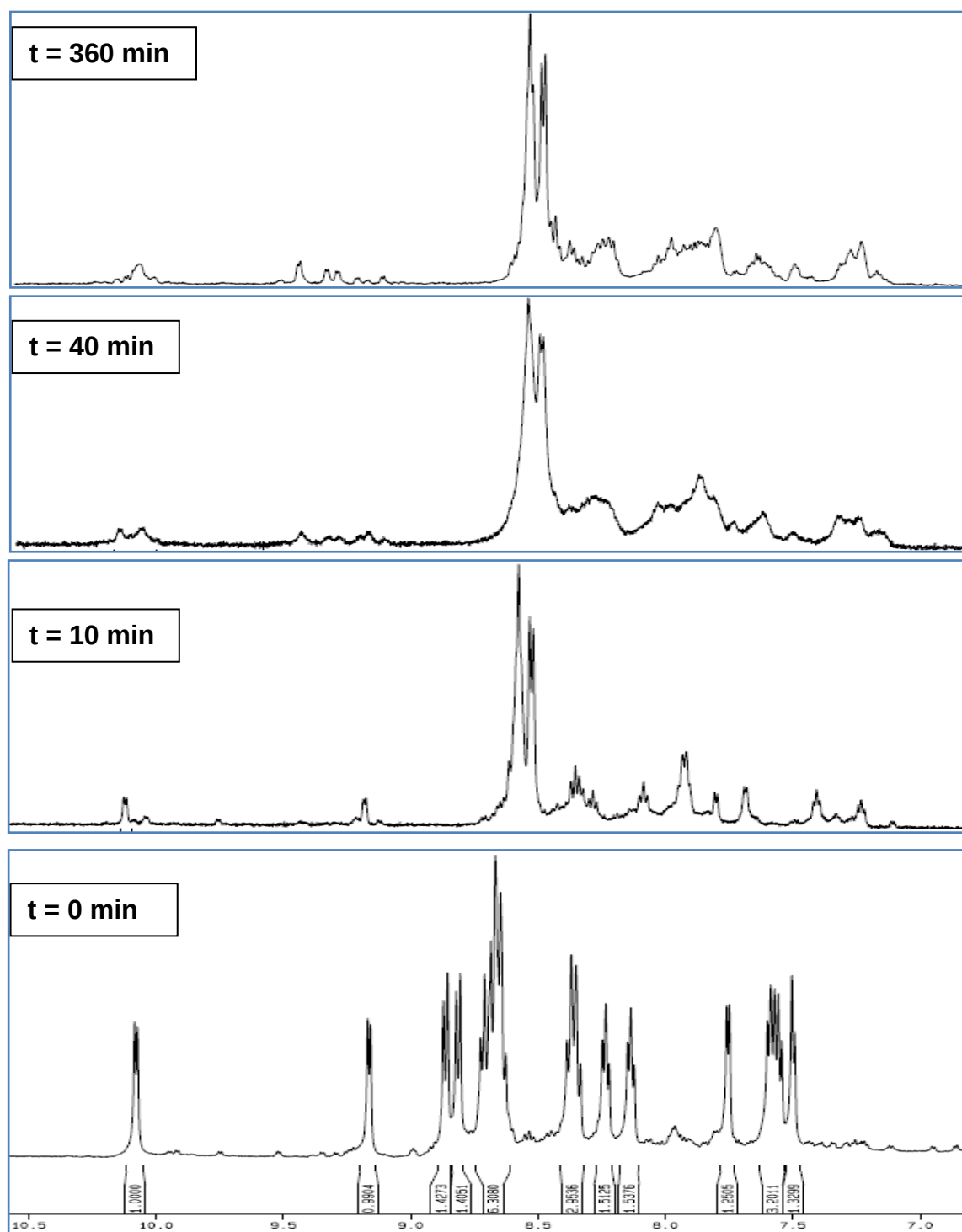


Figura 59. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com glutathiona, obtidos em D_2O .

O espectro de RMN de ^1H do íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$, em D_2O , apresentaram sinais de hidrogênio em 8,09, 7,46 e 7,01 ppm atribuídos aos prótons do anel imidazólico H_1 , H_2 e H_3 , respectivamente. Observa-se que os prótons sofreram deslocamento para campos mais forte em relação ao ligante livre, como observado em alguns complexos citados na literatura [116, 133]. Esta proteção sofrida pelos prótons pode ser explicado considerando que ocorre o domínio do efeito doador de densidade eletrônica π do Ru^{II} para o anel imidazólico sobre o efeito retirador de densidade eletrônica. A presença destes três singletos no complexo com o ligante imidazol, indica que a coordenação deste ligante ao centro metálico de rutênio(II) se dá via átomo de nitrogênio.

A atribuição dos hidrogênios para o ligante bipyridina foi feita de acordo com a literatura [133, 134], visto que os complexos com a conformação *cis* apresentam muitos sinais referente aos prótons e carbonos da bipyridina. Isto acontece devido a distorção que ocorre nos anéis deste ligante após a coordenação. Para o íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ a conformação na forma isomérica *cis* das duas bipyridinas foi confirmada, como também observou-se que os próprios anéis piridínicos não eram equivalentes, visto que observou-se 16 sinais de hidrogênio referente aos 16 prótons das duas bipyridinas.

Assim como no complexo anterior, a reação do íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína (Figura 60) apresenta o mesmo comportamento nos deslocamentos químicos dos prótons da bipyridina. Ou seja, houve uma proteção nesses sinais de hidrogênio, além da diminuição na resolução dos mesmos. Isto se deve a formação de uma espécie paramagnética (NO^0) que atrapalha na obtenção dos dados de ressonância magnética nuclear. Além disso, após duas horas de reação houve o aparecimento de um precipitado branco devido à oxidação da cisteína, no qual foi removido do solvente através de filtração.

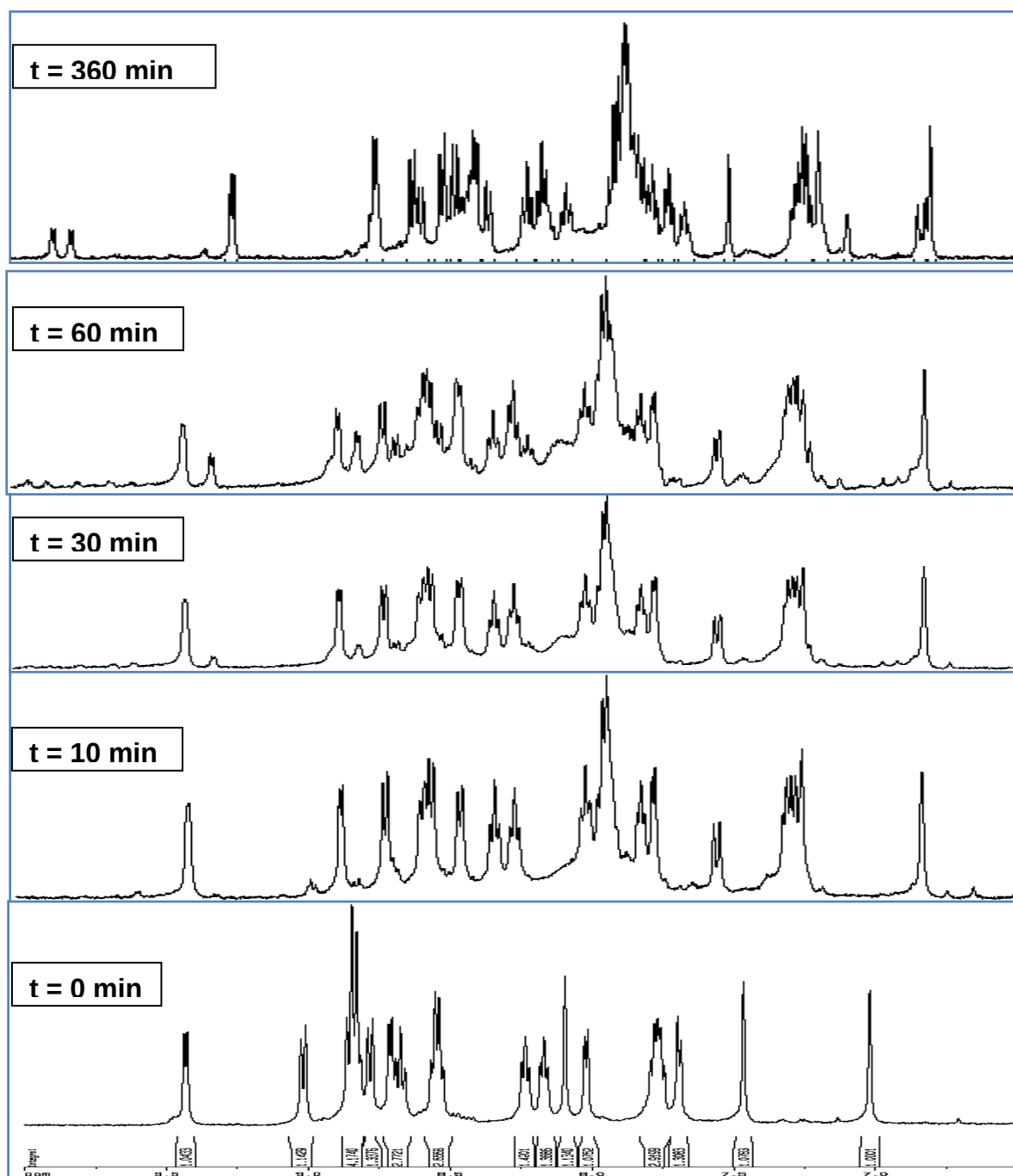


Figura 60. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína, obtidos em D_2O .

Fora isso, foi observado que apenas o óxido nítrico sofreu redução e labilização da esfera de coordenação, isto é, o ligante imidazol permaneceu coordenado após o término da reação. De um modo geral os sinais dos prótons sofreram uma proteção após a redução e liberação do óxido nítrico. Isto pode ser explicado pelo fato da saída de um ligante que forma uma ligação π muito forte, no caso o NO^+ , o que provoca o domínio do efeito doador de densidade eletrônica π do Ru^{II} para o anel da bipyridina sobre o efeito retirador de densidade eletrônica.

Com relação ao acompanhamento realizado com glutathione (Figura 61), foi observado as mesmas características apresentada da reação com cisteína. Com isso, pode-se concluir que tanto a cisteína quanto glutathione reage da mesma forma com o nitrosilo complexo.

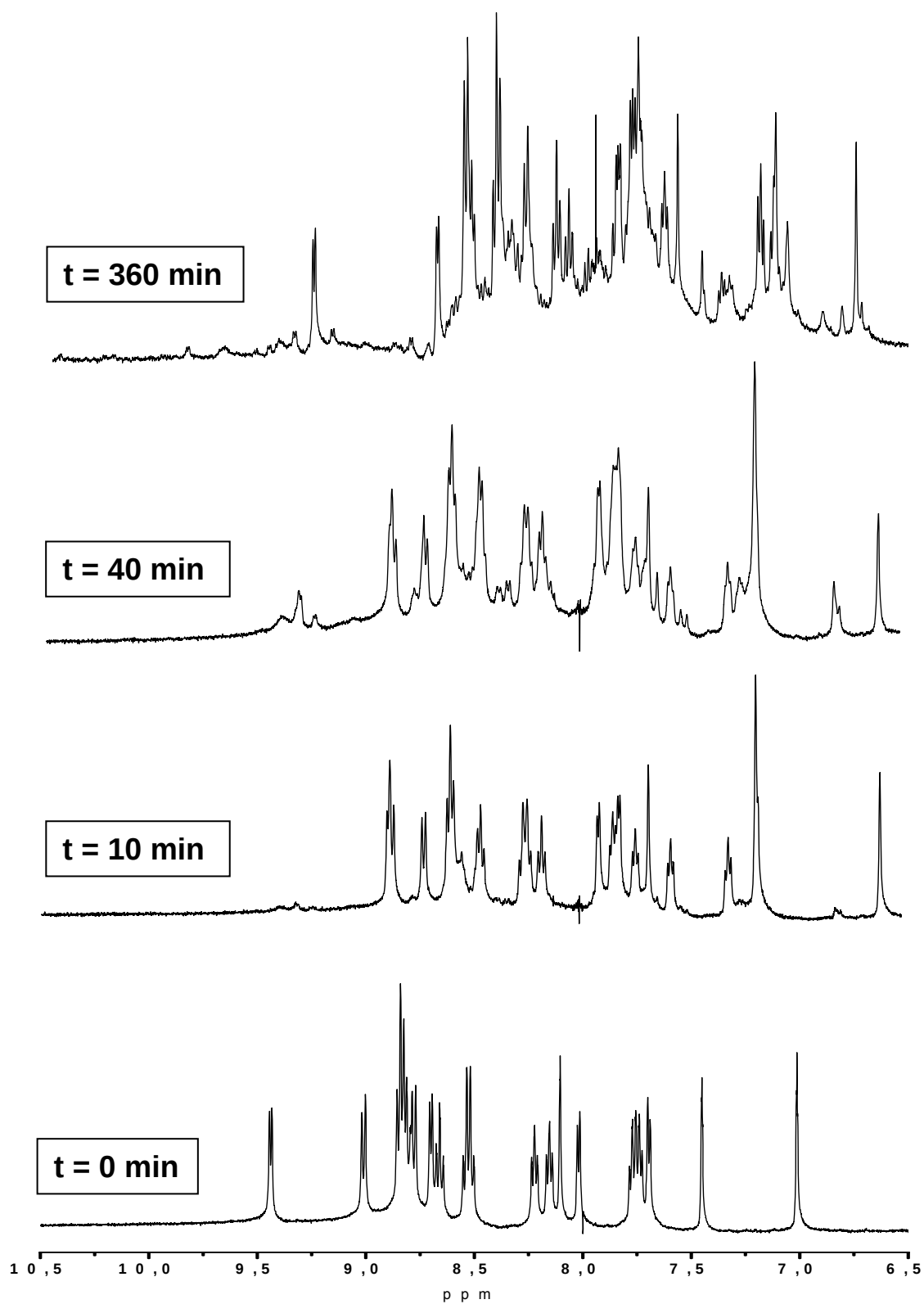


Figura 61. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com glutathiona, obtidos em D_2O .

4.7.2. Metionina

O acompanhamento da reação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com metionina utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons encontra-se ilustrado na Figura 62.

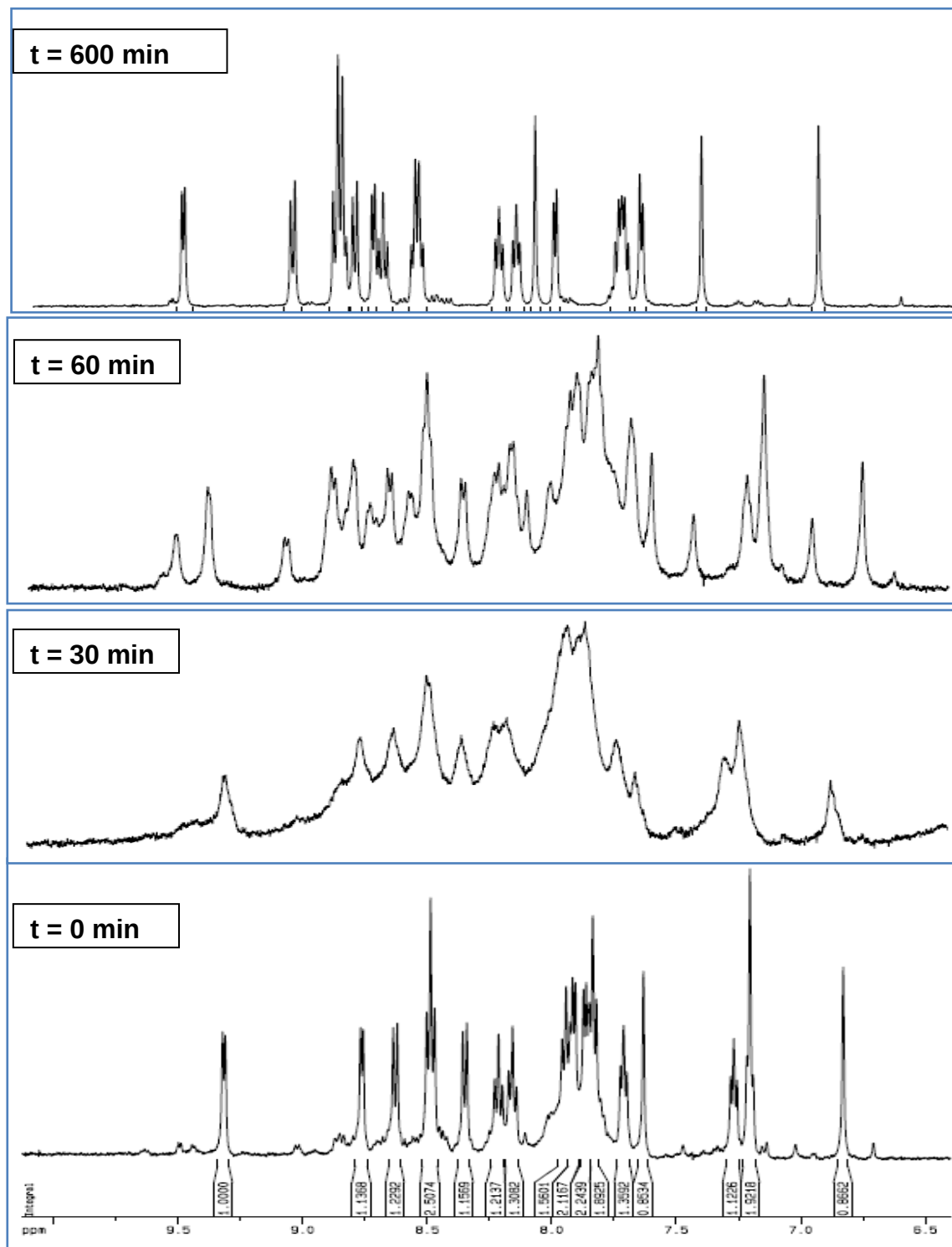


Figura 62. Espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H da interação do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com metionina, obtidos em D_2O .

A partir da análise dos resultados observa-se que após adição do aminoácido houve uma proteção nos sinais de hidrogênio dos anéis piridínicos e do anel imidazólico. Isto ocorre devido à saída de um ligante com uma forte ligação π , neste caso o NO^+ , provocando o domínio do efeito doador de densidade eletrônica π do Ru^{II} para o anel da bipyridina.

Além disso, foi observado que logo após adição da metionina ocorreu uma interferência no desdobramento dos sinais de prótons provocado pelo aparecimento de uma substância paramagnética no meio da solução. Assim como no caso da reação com a cisteína, houve a redução do óxido nítrico através da oxidação da metionina com o surgimento de um espécie radicalar no solvente, sendo que esta substância se trata do NO^0 . Ao término da reação verificou-se um maior desdobramento nos sinais de hidrogênio.

Com relação a reação do íon complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ com metionina, não foi observado mudança nos espectros de ^1H mesmo deixando os compostos em solução por 24 horas. O acompanhamento com histidina não é possível de ser realizado devido à presença dos sinais referente ao anel imidazólico deste aminoácido. Além disso, o redutor é utilizado em excesso tornando inviável este experimento em virtude da forte intensidade referente aos sinais da histidina, o que encobre os sinais do nitrosilo complexo.

4.8. Medidas no eletrodo de NO

4.8.1. Cisteína e glutatona

O processo de labirização do ligante nitrosilo a partir da reação dos complexos com os tióis foi realizado em função do tempo, através do eletrodo medidor de NO. A redução do ligante nitrosilo (NO^+) a partir do íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ gera uma resposta em função do aumento da corrente elétrica, conforme a espécie vai sendo reduzida e liberada pelos tióis. A concentração de óxido nítrico é então detectada pelo eletrodo específico para esta espécie. A partir da Figura 63, observa-se um aumento na corrente quando se adiciona cisteína e glutatona, mostrando a capacidade redutora destes aminoácidos.

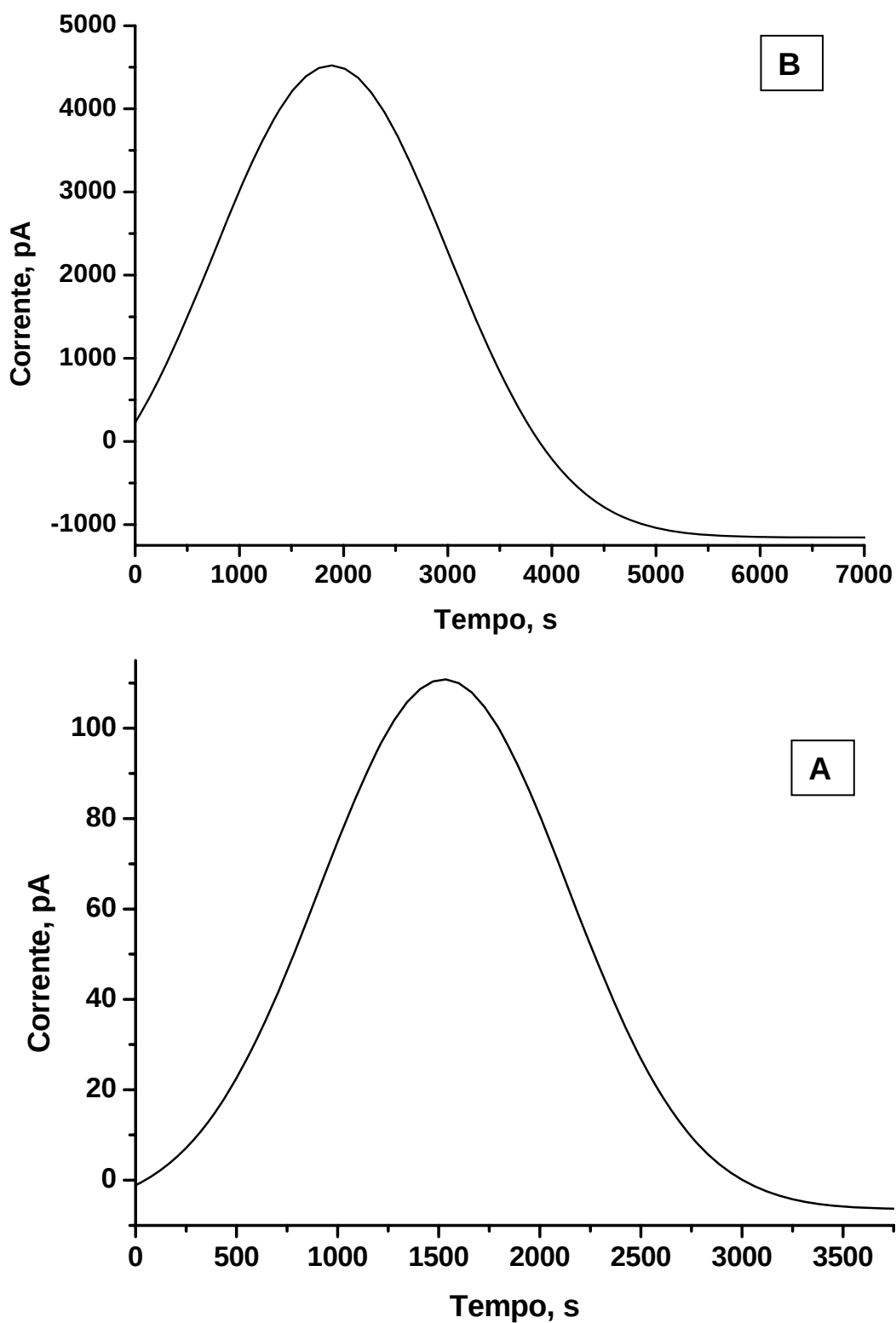


Figura 63. Cronoamperograma da liberação de NO através da reação em solução aquosa do íon complexo $cis-[Ru(bpy)_2SO_3NO]^+$ com glutathione (A) e cisteína (B).

De acordo com o acompanhamento da reação dos nitrosilo complexos com cisteína, utilizando-se várias técnicas espectrométricas e eletrométricas no qual foi observada a redução e labilização do óxido nítrico, esta técnica vem comprovar definitivamente o processo de redução sofrida pelo NO^+ nos complexos.

Com relação ao acompanhamento da reação do íon complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína e glutathione (Figura 64), foi observado o mesmo comportamento apresentado pelo sulfito complexo. Com isso, pode-se concluir que óxido nítrico (NO^0) faz parte dos produtos destas reações.

Com base em todas as técnicas utilizadas neste trabalho, o mecanismo proposto para as reações dos nitrosilo complexos com cisteína e glutathione é o seguinte (Equação 32):



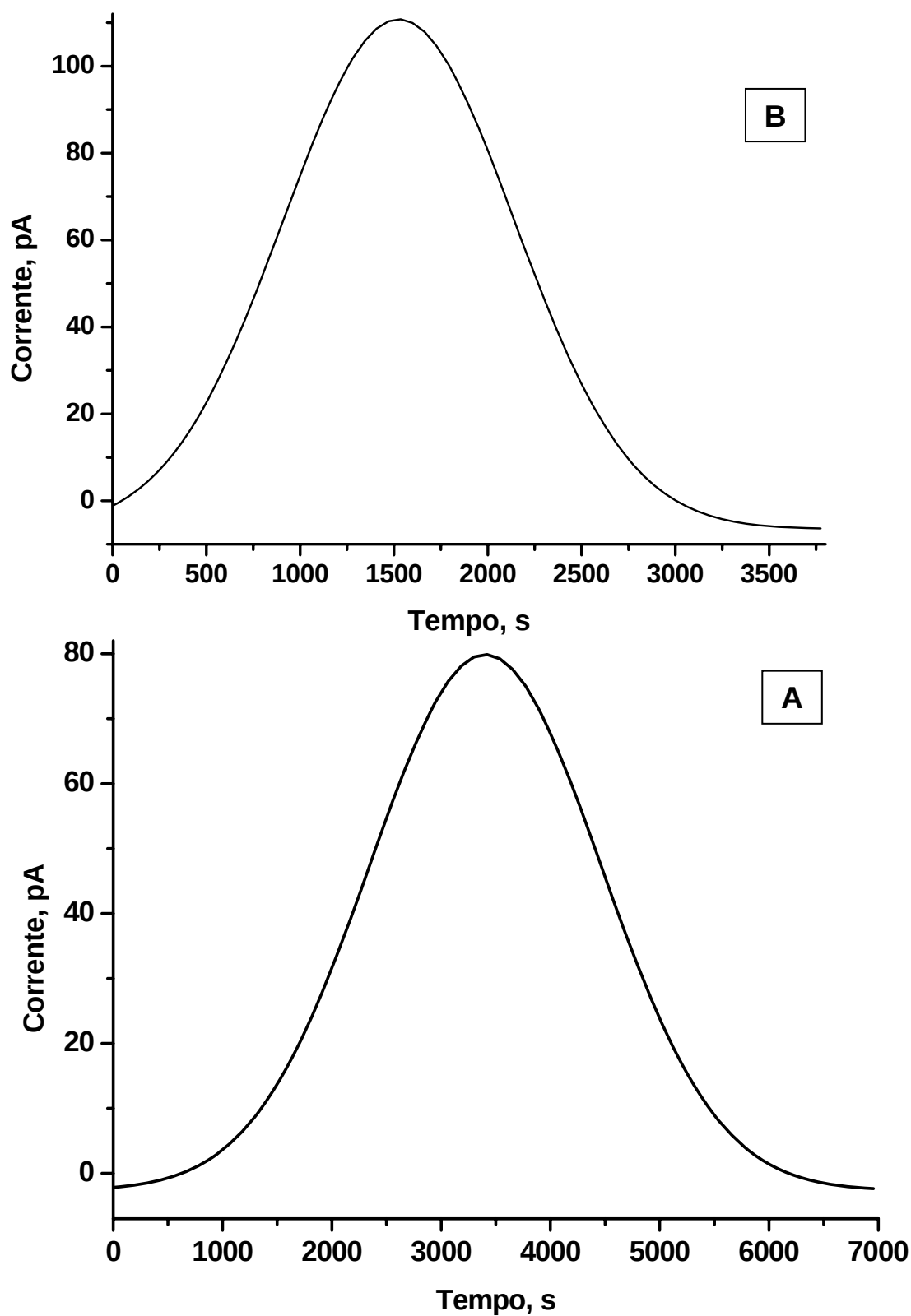


Figura 64. Cronoamperograma da labilização de NO através da reação em solução aquosa do íon complexo $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ com cisteína (A) e glutatona (B).

4.7.2. Metionina

A reação dos nitrosilo complexos com metionina também foi acompanhada utilizando-se um sensor de NO que é uma maneira de se provar a liberação desta espécie. Na Figura 65 encontram-se os cronoamperogramas de corrente em função do tempo desta reação. Observa-se um aumento de corrente depois da adição de metionina. Isto ocorre devido à redução e labirização do óxido nítrico no nitrosilo complexo provocado pelo aminoácido.

Estudo realizado com fotólise de nitrosilo complexo [135, 136] utilizando-se esta técnica mostra que o sinal registrado pelo sensor aumenta quando a fotólise é iniciada e diminui quando a luz é desligada. Com isso a concentração de NO diminui depois de cada pulso de laser, indicando que provavelmente o foto produto absorve parte da luz.

Ao contrário desse estudo fotoquímico, a reação do nitrosilo complexos com metionina apresenta um comportamento diferente, no qual ocorre um aumento na corrente quando se adiciona o aminoácido e este permanece constante por algum tempo. Isto acontece devido à liberação mais lenta do óxido nítrico em relação à reação fotoquímica.

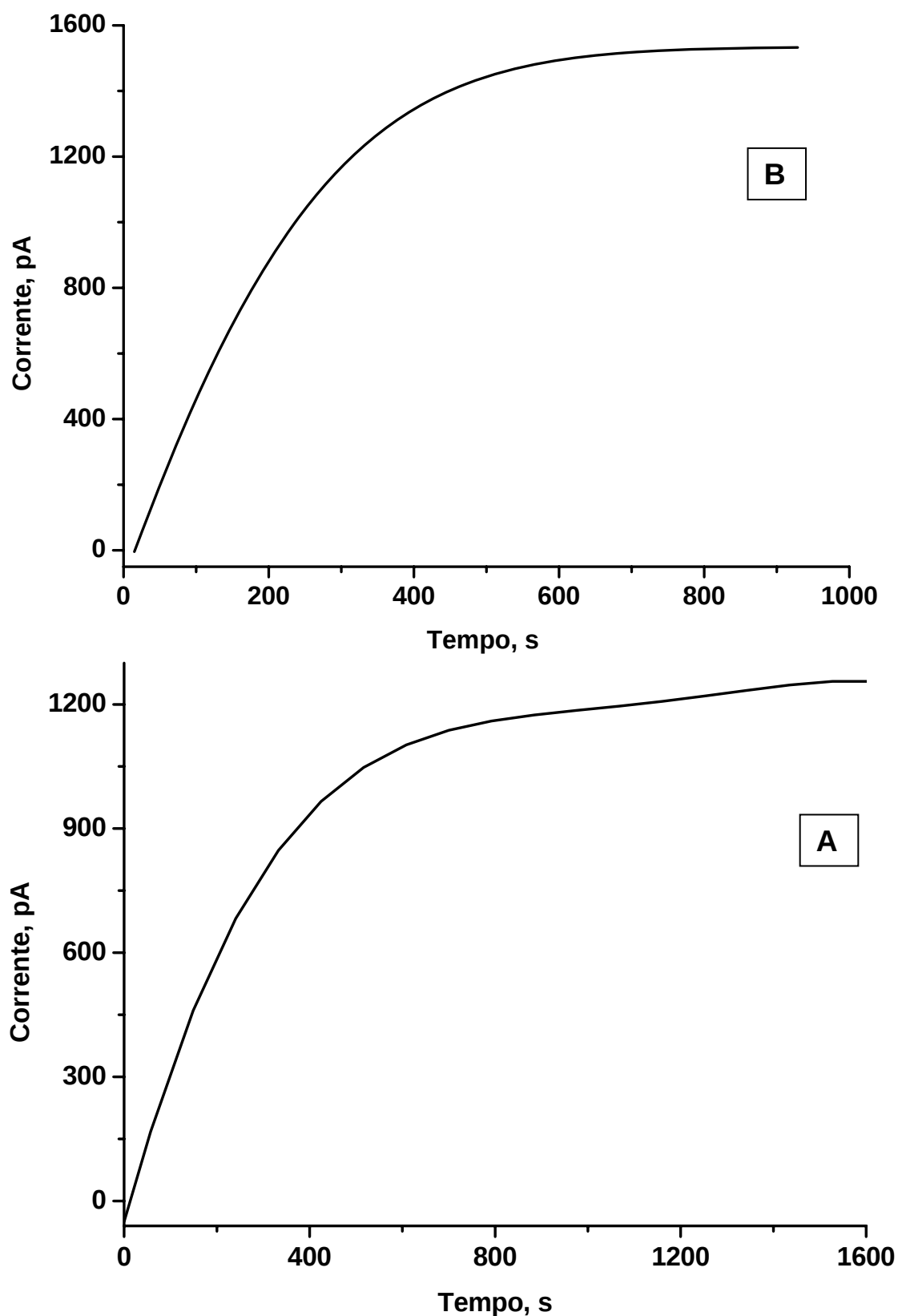
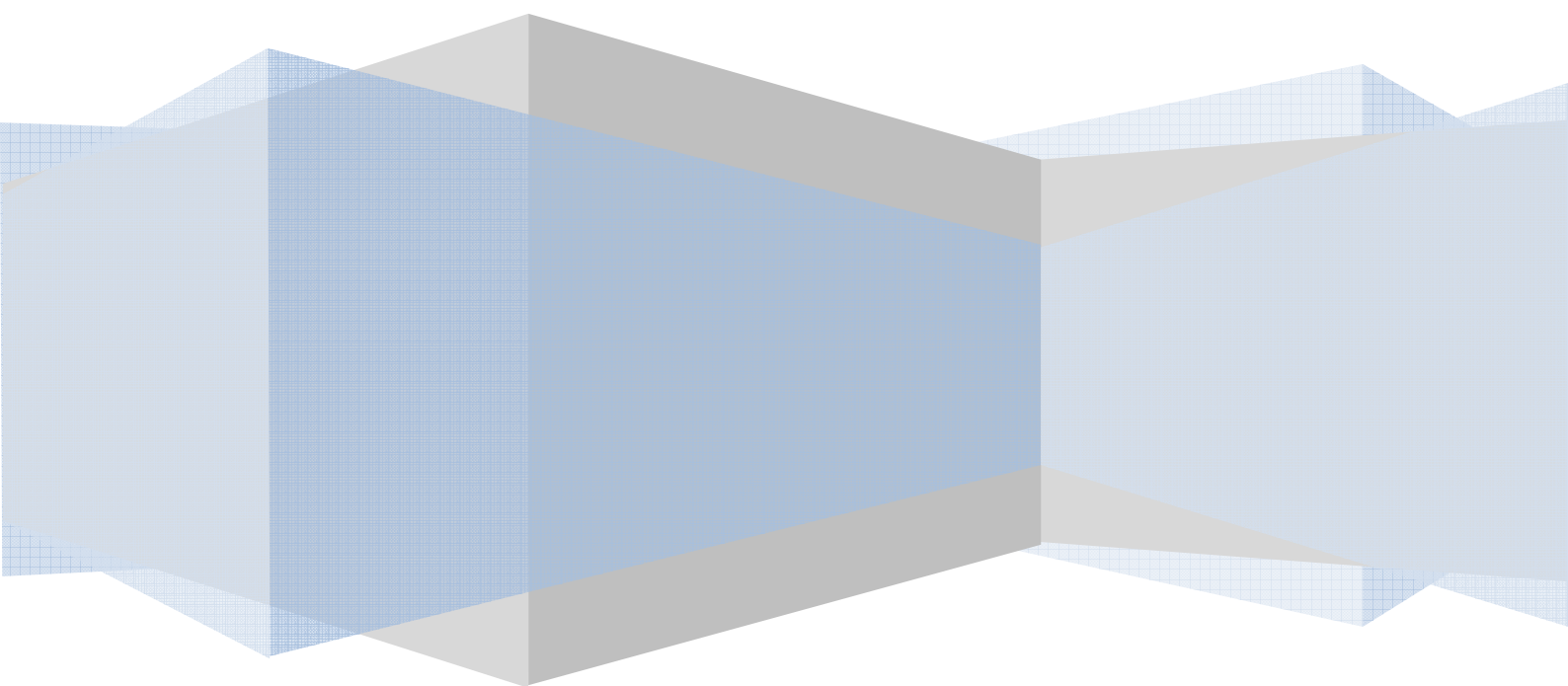


Figura 65. Cronoamperograma da liberação de NO através da reação em solução aquosa dos íons complexos $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{SO}_3\text{NO}]^+$ (A) e $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{ImN}(\text{NO})]^{+3}$ (B) com metionina.

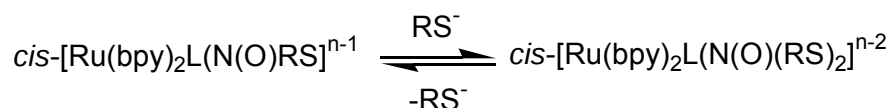
Considerações finais



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram estudadas as reações com excesso de cisteína e glutatona para os íons complexos $cis-[Ru(bpy)_2SO_3(NO)]^+$ e $cis-[Ru(bpy)_2ImN(NO)]^{+3}$. As reações são muito rápidas, se comparadas com as que ocorrem com OH^- e nucleófilos que liga pelo nitrogênio. A primeira interação da cisteína e glutatona com os íons complexos gera um aduto intermediário, I_1 , com bandas de absorção em 450 nm atribuídas a transições de transferência de carga do metal para o ligante (TCML), do tipo $d\pi(Ru^{+2}) \rightarrow \pi^*(bpy)$. As reações de formação são de primeira ordem com relação a cada reagente.

Com o decaimento de I_1 ocorre a o aparecimento de um segundo intermediário, I_2 , com intensas bandas de absorção em 380 nm. A constante de velocidade para a formação de I_2 é mais lenta do que para I_1 , mas a ordem cinética na reação formação e dissociação de ambos os intermediários é o mesmo. Nós propomos que o intermediário I_2 é atribuído de acordo com estequiometria 2:1 tiolato/complexo:



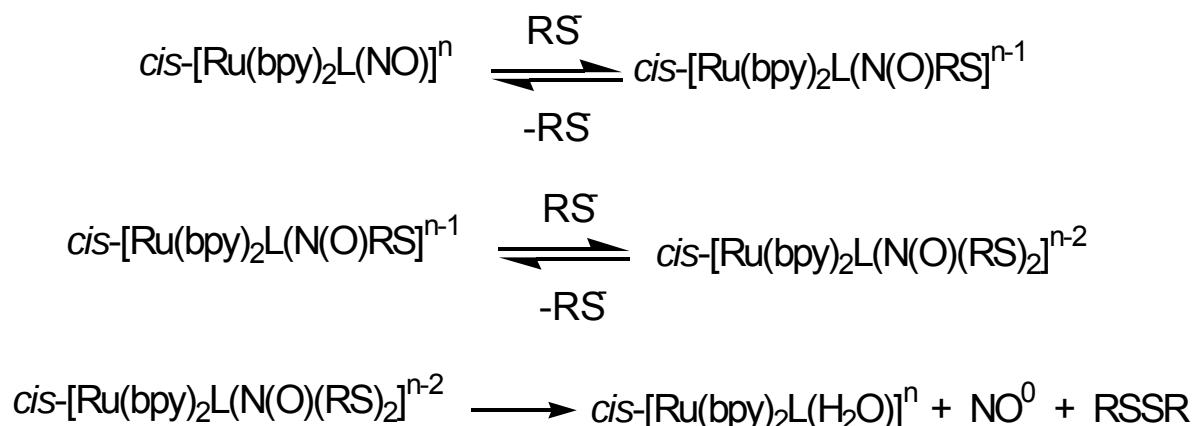
Com decomposição de I_2 ocorre formação dos aqua complexos, NO, e cistina. Evidências foram obtidas para a geração destes produtos, como por exemplo, o aparecimento de bandas de absorção na região de 450-470 nm características destas espécies. Além disso, o EPR e o infravermelho mostram que o óxido nítrico sofre uma redução.

As constantes de velocidade da reação com cisteína apresentaram dependência com relação ao pH. Isto ocorre, provavelmente, devido à desprotonação no enxofre da cisteína, facilitando a interação deste tiól com o óxido nítrico coordenado ao rutênio (II). Os parâmetros de ativação, $\Delta H^\ddagger$ e $\Delta S^\ddagger$ sugerem a existência de um único mecanismo nas reações com cisteína e glutatona.

Ao contrario do que foi observado para a reação de íons complexos do tipo $[Ru(bpy)_2Cl(NO)]^+$ com tióis, neste trabalho houve a formação de NO^0 em vez de

N₂O. Isto é comprovado pela medida amperométrica no eletrodo de NO, no qual foi observado que ao adicionar os tióis numa solução do complexo ocorre o aparecimento desta espécie na solução.

Baseado em estudos cinéticos e no espectro de EPR, a reação dos nitrosilo complexos com cisteína e glutatona apresenta o seguinte esquema de redução e liberação do óxido nítrico:



Com relação às reações com metionina e histidina, não ocorrem o aparecimento dos intermediários. Isto se deve à ausência do grupo SH fazendo com que a redução e liberação do NO se dar formação dos produtos sem a presença do aduto complexo. Os resultados de CLAE reforçam esta observação visto que houve a formação de apenas uma espécie o qual possui bandas de absorção características dos aqua complexos. Além disso, análise no eletrodo de NO mostra que o óxido nítrico está sofrendo um processo redox visto que foi detectada esta espécie nesta medida.

Referências

6. REFERÊNCIAS

1. A. R. Butler, D. L. H. Williams, Chem. Soc. Rev. (1993) 233.
2. D. L. Wise, G. Houghton, Chem. Eng. Sci. 23 (1968) 1211.
3. J. F. Kerwin Jr, J. R. Lancaster Jr, P. L. Feldman, J. Med. Chem. 38 (1995) 7373.
4. J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, Acc. Chem. Res 30 (1997) 149.
5. J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (1990) 1620.
6. B. Mayer, B. Hemmens, Trends Biochem. Sci. (1997) 477.
7. D. A. Wink, J. F. Darbyshire, R. W. Nimes, J. E. Saavedra, P. C. Ford, Chem. Res. Toxicol. 6 (1993) 23.
8. B. Gaston, J. Reilly, J. M. Drazen, J. Farckler, P. Ramdev, D. Arnette, M. E. Mullins, D. J. Sugarbaker, C. Chee, D. J. Singel, J. Loscalzo, J. S. Stamler, Proc. Natl. Acad. Sci. 90 (1993) 10957.
9. A. S. Torsoni, B. F. Barros, J. C. Toledo, M. Haun, M. H. Krieger, E. Tfouni, D. W. Franco, Nitric Oxide-Biology and Chemistry 6 (2002) 247.
10. R. M. J. Palmer, D. S. Ashtom, S. Moncada, Nature (1998) 326.
11. M. Feelisch, J. S. Stamler, Methods in Nitric Oxide Research, Wiley, Dorset, (1996).
12. L. J. Ignarro, Nitric Oxide Biology and Pathology, Academic Press, San Diego, (2000).
13. B. F. Barros, J. C. Toledo, D. W. Franco, E. Tfouni, M. H. Krieger, Nitric Oxide-Biology and Chemistry 7 (2002) 50.
14. D. S. Bohle, C. H. Hung, J. Am. Chem. Soc. 117 (1995) 9584.

15. J. J. Lancaster, Nitric Oxide, Principles and Actions, Academic Press, San Diego, USA, (1996).
16. S. Selemidis, T. M. Cocks, Br. J. Pharmacol. 129 (2000) 1315.
17. M. R. Bennett, Prog.Neurobiol. 52 (1997) 159.
18. P. L. Feldman, O. W. Griffith, D. J. Stuehr, Chem. Eng. News 71 (1993) 26.
19. R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, Nature 288 (1980) 373.
20. T. M. Griffith, D. H. Edwards, M. J. Lewis, A. C. Newby, A. H. Henderson, Nature 308 (1984) 645.
21. G. M. Rubanyi, R. R. Lorenz, P. M. Vanhoutte, Am. J. Physiol. 249 (1985) H95.
22. W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianadan, R. F. Furchgott, J. Pharmacol. Exp. Ther. 232 (1985) 708.
23. R. F. Furchgott, Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium, Raven Press, New York, (1988).
24. L. J. Ignarro, R. E. Byrns, K. S. Wood, Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium, Raven Press, New York (1988).
25. R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, Nature 327 (1987) 524.
26. J. R. Lancaster Jr., American Scientist 80 (1992) 248.
27. P. L. Feldman, O. W. Griffith, D. J. Stuehr, Chem. Eng. News 20 (1993) 26.
28. S. P. Fricker, Platinum Metals Rev. 39 (1995) 150.
29. L. J. Roman, P. Martasek, B. S. S. Masters, Chem. Rev. 102 (2002) 1179.
30. N. F. Cerqueira, W. B. Yoshida, Acta Cirúrgica Brasileira 17 (2002) 417.
31. G. B. Mackaness, J. Exp. Med. 129 (1969) 973.

32. D. J. Stuehr, M. A. Marletta, *Cancer Res.* 47 (1987) 5590.
33. M. Laurent, M. Lepoivre, J. P. Tenu, *Biochem. J.* 314 (1996) 109.
34. Y. S. Yo, H. H. Lec, T. C. Mori, Y. J. Wong, J. K. Lin, *Mol. Carcinog.* 19 (1997) 101.
35. H. Kaneto, J. Fujii, T. Matsuoka, H. Tatsumi, T. Kamada, N. Taniguchi, *Diabetes* 44 (1995) 733.
36. J. Sparrow, *J Mol Neurosci* 5 (1995) 219.
37. J. Zielasek, H. P. Hartung, *Adv Neuroimmunol* 6 (1996) 191.
38. E. B. Wiedner, X. Bao, S. M. Altschuler, *Gastroenterology* 108 (1995) 367.
39. Z. S. Herman, *Pol. J. Pharmacol.* 49 (1997) 1.
40. D. W. Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 9741.
41. S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, *Pharm. Rev.* 43 (1991) 109.
42. J. E. Shaffer, B. J. Han, W. H. Cluer, F. W. Lee, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260 (1992) 286.
43. J. Abrams, *Circulation* 74 (1986) 1181.
44. D. L. H. Williams, *Trans. Met. Chem.* 21 (1996) 189.
45. J. S. Stamler, D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992) 444.
46. D. J. Stuerhr, P. L. Feldaman, O. W. Griffith, *chem. Eng. News* 20 (1993) 26.
47. S. C. Askew, D. J. Barnett, J. Mcaninlt, D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 4* (1995) 741.
48. A. Belder, C. Less, J. Martin, S. Moncada, *Lancet* 345 (1995) 124.

49. A. P. Dicks, H. R. Swift, D. L. H. Williams, A. R. Butler, H. H. Al-Sadoni, B. G. Cox, *J. Chem. Soc.* 4 (1996) 481.
50. P. H. Beloso, D. L. H. Williams, *Chem. Commun.* 1 (1997) 89.
51. R. Clancy, D. Levartovskis, J. Leszczynska-Piziak, J. Yegudin, S. Abramson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 3680.
52. L. Jia, J. Bonaventura, J. S. Stamler, *Nature* 380 (1996) 21.
53. G. Giovanni, J. Land, G. Keir, E. Thompson, S. Heales, *Ann. Clin. Biochem.* 34 (1997) 193.
54. B. Gaston, J. Sears, J. Woods, J. Hunt, T. McMahon, J. S. Stamler, *Lancet* 351 (1998) 1317.
55. M. P. Gordge, J. S. Hothersall, G. H. Neil, A. A. N. Dutra, *Br. J. Pharmacol.* 119 (1996) 533.
56. M. P. Gordge, P. Addis, A. Noronha-Dutra, J. Hothersall, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 657.
57. K. Do, B. Benz, G. Grima, U. Gutteck-Amsler, I. Kluge, T. Salt, *Neurochem. Int.* 29 (1996) 213.
58. A. J. Barbier, R. A. Lefebvre, *Br. J. Pharmacol.* 111 (1994) 1280.
59. A. T. Struck, N. Hogg, J. P. Thomas, B. Kalyanaraman, *Febs Lett.* 361 (1995) 291.
60. P. Rauhala, K. P. Mohanakumar, I. Sziraki, A. M. Lin, C. C. Chiuch, *Synapse* 23 (1996) 58.
61. C. W. Schwieter, J. P. Mccue, *Coord. Chem. Rev.* 184 (1999) 67.
62. Z. Guo, P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* 49 (2000) 183.
63. M. J. Abrams, B. A. Murrer, *Science* 261 (1993) 725.
64. P. J. Sadler, *Adv. Inorg. chem.* 36 (1991) 1.

65. G. Stochel, A. Wanat, E. Kulis, Z. Stasicka, *Coord. Chem. Rev.* 171 (1998) 203.
66. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Platinum Metal rev.* 45 (2001) 62.
67. E. Tfouni, Krieger, B. R. McGarvey, D. W. Franco, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 57.
68. E. Tfouni, K. Q. Ferreira, F. G. Doro, R. S. Da Silva, Z. N. Rocha, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 405.
69. N. Bettache, C. L. Carter, J. E. Corrie, D. Ogden, *Methods Enzymol.* 268 (1996) 266.
70. M. G. Sauaia, F. D. Oliveira, A. C. Tedesco, R. S. Silva, *Inorg. Chim. Acta* 355 (2003) 191.
71. D. R. Lang, J. A. Davis, L. G. F. Lopes, A. A. Ferro, L. C. G. Vasconcellos, D. W. Franco, E. Tfouni, A. Wieraszko, M. J. Clarke, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2294.
72. L. G. F. Lopes, A. Wieraszko, Y. El-Sherif, M. J. Clarke, *Inorg. Chim. Acta* 312 (2001) 15.
73. L. G. F. Lopes, Tese de doutorado, São Carlos, (1997).
74. M. H. Krieger, M. Sumitani, F. G. Marcondes, A. A. Ferro, M. J. Clarke, D. W. Franco, E. Tfouni, *Hypertension* 37 (2001) 1020.
75. A. Wieraszko, M. J. Clarke, D. R. Lang, L. G. F. Lopes, D. W. Franco, *Life Sciences* 68 (2001) 1535.
76. M. J. Clarke, J. B. Gaul, *Struct. Bond.* 81 (1993) 144.
77. Y. Chen, R. E. Shepherd, *J. Inorg. Biochem.* 68 (1997) 183.
78. A. R. Butler, C. Glidewel, *Chem. Soc. Rev.* 16 (1987) 361.
79. J. H. Swinchart, *Coord. Chem. Rev.* 2 (1967) 385.
80. R. Bakhtiar, E. I. Ochiai, *Gen. Pharmacol.* 32 (1999) 525.

81. G. B. Richter-Addo, P. Legzdins, Metal Nitrosyls, Oxford University Press, New York, (1992).
82. J. N. Bates, M. T. Baker, R. Guerra, D. G. Harrison, Biochem. Pharmacol. 42 (1991) 157.
83. A. R. Butler, C. Glidewell, A. S. McIntosh, D. Reed, I. H. Sadler, Inorg. Chem. 25 (1986) 970.
84. G. Stochel, R. V. Eldik, Z. Stasicka, Inorg. Chem. 25 (1986) 3663.
85. M. G. Oliveira, G. J. Langley, A. J. Rest, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 12 (1995) 2013.
86. E. Wasielewska, Z. Stasicka, J. Inf. Rec. Mater. 17 (1998) 441.
87. Z. Stasicka, E. Wasielewska, Coord. Chem. Rev. 159 (1997) 1.
88. E. Hejmo, E. Porcel-Ortega, T. Senkowski, Z. Stasicka, Bull. Pol. Acad. Sci. Chem. 36 (1998) 351.
89. C. Hauser, T. Glaser, E. Bill, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 4352.
90. O. Siri, A. Tabard, P. Pullumb, R. Guillard, Inorg. Chim. Acta 350 (2003) 633.
91. A. Janczyk, A. Wolnicka-Glubisz, A. Chmura, M. Elas, Z. Matuszak, G. Stochel, K. Urbanska, Nitric Oxide 10 (2004) 42.
92. A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, Princípios de bioquímica, São Paulo, (1995).
93. P. D. Wood, B. Mutus, R. W. Redmond, Photochem. Photobiol. 64 (1996) 518.
94. W. B. Jakoby, Academic Press 2 (1980)
95. A. Meister, M. E. Anderson, Ann. Rev. Biochem. 52 (1983) 711.

96. R. G. Wilkins, *Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes*, VCN, New York, (1991).
97. B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 17 (1978) 3334.
98. F. O. N. Silva, S. X. B. Araújo, A. K. M. Holanda, E. Meyer, F. A. M. Sales, I. C. N. Diógenes, I. M. M. Carvalho, Í. S. Moreira, L. G. F. Lopes, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 2020.
99. F. Roncaroli, M. E. Ruggiero, D. W. Franco, G. L. Estiu, J. A. Olabe, *Inorg. Chem.* 41 (2002) 5760.
100. F. Roncaroli, J. A. Olabe, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 4719.
101. J. A. Olabe, *Adv. Inorg. Chem.* 55 (2004) 61.
102. K. Szacilowski, G. Stochel, Z. Stasicka, H. Kisch, *New J. Chem.* 21 (1997) 893.
103. F. Bottomley, W. V. F. Brooks, D. E. Paez, P. S. White, M. Mukaida, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1983) 2465.
104. J. D. Schwane, M. T. Ashby, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 6822.
105. R. J. Singh, N. Hogg, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Jour. of Biol. Chem.* 271 (1996) 18596.
106. B. Durham, J. L. Walsh, C. L. Carter, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 19 (1980) 860.
107. J. L. Walsh, R. M. Bullock, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 19 (1980) 865.
108. F. O. N. Silva, *Dissertação de Mestrado*, Fortaleza, (2004).
109. R. W. Callahan, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 574.
110. K. F. S. Ricardo, S. M. Shishido, M.G. Oliveira, M. H. Krieger, *Nitric Oxide* 7 (2002) 57.

111. A. Franke, G. Stochel, N. Suzuki, T. Higuchi, K. Okuzono, R. V. Eldik, J. A. Chem. Soc. 127 (2005) 5360.
112. M. C. Dawson, Data for biochemical research third edition, Oxford scientific publications, (1987).
113. H. E. Toma, Tese de Livre Docência, São Paulo, (1979).
114. C. R. Johnson, R. E. Shepherd, Synth. React. Inorg. Met. Org.Chem. 14 (1984) 339.
115. I. C. N. Diógenes, Dissertação de mestrado, Fortaleza, (1996).
116. J. R. D. Souza, Dissertação de mestrado, Fortaleza, (1999).
117. F. Létumier, G. Broeker, J. M. Barbe, R. Guillard, D. Lucas, V. Dahaoui-Gindrey, C. Lecomte, L. Thouin, C. Amatore, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1998) 2233.
118. B. Bänisch, V. R. Eldik, Inorg. Chim. Acta 201 (1992) 75.
119. I. S. Moreira, D. W. Franco, Inorg. Chem. 33 (1994) 1607.
120. A. L. R. D. Silva, Dissertação de mestrado, Fortaleza, (2000).
121. T. R. Ralph, M. L. Hitchman, J. P. Millington, F. C. Walsh, Journal of Electroanal. chem. 375 (1994) 1.
122. N. M. Atherton, Principles of Electron Spin Resonance, Prentice Hall (1993).
123. B. R. Mcgarvey, A. A. Ferro, E. Tfouni, C. W. B. Bezerra, I. Bagatin, D. W. Franco, Inorg. Chem. 39 (2000) 3577.
124. R. C. L. Zampieri, G. V. Poelhsitz, A. A. Batista, O. R. Nascimento, J. Ellena, E. E. Castellano, J. Inorg. Biochem. 92 (2002) 82.
125. P. Diversi, M. Fontani, M. Fuligni, F. Laschi, F. Marchetti, S. Matteoni, C. Pinzino, P. Zanello, J. Organ. Chemistry 675 (2003) 21.

126. D. A. Skoog, J. J. Leary, Principles of instrumental analysis, Saunders College Publishing, New York, (1992).
127. I. C. N. Diógenes, J. R. Sousa, I. S. Moreira, Chromatographia 50 (1999) 105.
128. I. S. Moreira, M. O. Santiago, Chromatographia 43 (1996) 322.
129. K. B. Reddy, M. P. Cho, J. F. Wishart, T. J. Emge, S. S. Isied, Inorg. Chem. 35 (1996) 7241.
130. A. A. Chevalier, L. A. Gentil, J. A. Olabe, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1991) 1959.
131. A. Franke, G. Stochel, N. Suzuki, T. Higuchi, K. Okuzono, R. V. Eldick, J. A. Chem. Soc. 127 (2005) 5360.
132. F. Roncaroli, M. Videla, L. D. Slep, J. A. Olabe, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 1903.
133. M. Brissard, O. Convert, M. Gruselle, C. Guyard-Duhayon, R. Thouvenot, Inorg. Chem. 42 (2003) 1378.
134. A. H. Velders, A. C. G. Hotze, Van Albada, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, Inorg. Chem. 39 (2000) 4073.
135. V. Togniolo, R. S. Silva, A. C. Tedesco, Inorg. Chim. Acta 316 (2001) 7.
136. M. G. Sauaia, R. G. D. Lima, A. C. Tedesco, R. S. Silva, J. A. Chem. Soc. 125 (2003) 14718.
137. R. S. F. Silva, E. M. Costa, U. L. T. Trindade, D. V. Teixeira, M. C. F. R. Pinto, G. L. Santos, V. R. S. Malta, C. A. D. Simone, A. V. Pinto, S. L. D. Castro, Eur. J. Med. Chem. 41 (2006) 526.

Anexo

Aplicação biológica dos nitrosilo complexos

Os complexos *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ e *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]PF₆ foram testado visando uma possível aplicação no tratamento da doença de chagas. Os compostos exibiram uma atividade inibitória muito boa em *T. cruzi*-gGAPDH, foi decidido avaliar a habilidade destes complexos para lise BT *em vitro*. Na tabela abaixo mostra os resultados da atividade dependente do tempo e da concentração dos nitrosilo complexos no BT.

O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ (IC_{50try} = 59 µM) revelou eficiências semelhantes ao nitroprussiato de sódio SNP (IC_{50try} = 52 µM) quando incubado nas mesmas condições. Porém, SNP não inibe *T. cruzi*-gGAPDH. Assim, é provável que o mecanismo de ação para SNP não segue o mesmo mecanismo. Além disso, o composto *cis*-[Ru(bpy)₂ImN(NO)](PF₆)₃ mostrou uma atividade tripanomicida 9 vezes maior do que o GV (IC_{50try} = 536 µM)[137] que é, atualmente, a droga recomendada no tratamento de sangue infetado. O complexo *cis*-[Ru(bpy)₂SO₃(NO)]PF₆ também mostrou um excelente em atividade tripanomicida *em vitro* com IC_{50try} = 85 µM e estes valores são, pelo menos, 6 vezes menor que a concentração inibitória apresentada pelo GV.

Atividade Tripanocidal (% TA)									
Doadores de NO	T = 1 h			T = 4 h			T = 24 h		
	Concentração (mM)			Concentração (mM)			Concentração (mM)		
	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1	0,1	0,5	1
IC _{50try} (µM)									
SNP ^a	56 ± 7	78 ± 3	90 ± 4	75 ± 4	89 ± 7	92 ± 4	97 ± 4	98 ± 5	100
BZ ^a	0	7 ± 6	12 ± 4	15 ± 5	21 ± 5	37 ± 7	89 ± 8	92 ± 5	100
c-[Ru(bpy) ₂ ImN(NO)](PF ₆) ₃	86 ± 7	88 ± 3	90 ± 6	78 ± 3	88 ± 6	92 ± 4	92 ± 4	97 ± 4	100
c-[Ru(bpy) ₂ SO ₃ (NO)](PF ₆)	75 ± 6	79 ± 3	92 ± 4	75 ± 5	81 ± 5	87 ± 7	74 ± 8	82 ± 5	89 ± 8
IC _{50try} (µM)									
52									
53									
59									
85									

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)