ANDRESSA DE ZAWADZKI

Reações envolvendo NOx mediadas por Fe-heme em alimentos e sistemas biológicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso

São Carlos

2013

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 09/05/2013

Andressa de Zawadzki

À minha mãe, à minha tia, à minha irmã,
família e amigos pelo constante incentivo.
Sua participação foi essencial para o meu
crescimento.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso pela orientação, pela dedicação, pela amizade, pelos conhecimentos passados referentes tanto ao trabalho quanto às experiências de vida.

Ao professor Dr. Douglas Wagner Franco e ao grupo de QIA pela estrutura fornecida.

Ao professor Dr. Júlio César Borges pelo espaço concedido e o material para a realização das análises por SDS-Page.

À minha mãe Jane e à minha tia Zinda pelo estímulo e por contribuírem de todas as formas para o meu crescimento. Especialmente, agradeço à minha irmã Krissia pelo apoio, pela paciência, pela amizade e, por compartilhar seus conhecimentos comigo e, reciprocamente, pelo interesse em assimilar os meus conhecimentos. Agradeço aos demais familiares, que mesmo espacialmente distantes, deram muito apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Química Inorgânica e Analítica e do Laboratório de Química e Aguardente do IQSC, Papa, Boi, Silvia, Natália, Juliana, Regina, Eduardo, Marcella, Gabi, Marianne, Flávia, Ana, Maykon, Metzker, Naná, Dani Truzzi, Augusto, Itapira, Filipão, Thiago Ohe, Irenne, Aline Debolêto, Pedro, Marcela Ruiva, Marcella Piauí, Evânia, Thiaguinho, Willy, Mayara, Fernando, Larissa, Silmara, Carlão, Danizinha. Aos meus amigos do IQSC, de outros laboratórios, Igor, Guilherme Saglietti, Ricardo Pimpão, Viviana, Vagner, Isac, Nikolas, Henrique, Barbara, Glessler, Luís. Aos meus amigos do antigo grupo de trabalho (grupo de Catálise Heterogênea), Profa. Dra. Elisabete Moreira Assaf, Alessandra, Amanda, Yvan, Eurico, Fran, Camila, Kaká, Flávio, Dry, Vivian, Paulo, Thaísa. A minha amiga querida Aline Tavares por todo apoio, amizade e descontração. Ao meu amigo Jorge, que foi meu primeiro coorientador e representa uma figura paterna. Especialmente ao Thiago, que me ajudou bastante a aprender a manusear os equipamentos e analisar os dados. Especialmente o Gustavo pela ajuda na discussão de resultados.

Aos meus amigos do rock Daniel, Pablo, Heline Paula, Gustavo, Ivan, Vinícius, Philip, Marcos, Pedro Napoleão, Sato, Flávia Andressa, Isley, Bela, Gabriel.

Aos meus amigos de São Carlos Tech, Glauco, Bela, Lu Sartor.

“Os enigmas do universo só lentamente se revelam à nossa investigação. Existem questões às quais o homem, atualmente, não pode nos dar respostas, mas, o trabalho científico constitui o único caminho que pode nos levar a um verdadeiro conhecimento da realidade externa a nós”.

(Sigmund Freud - Futuro de Uma Ilusão)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer, adaptado de Pan et al., 2010. ⁵ ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.....	21
Figura 2 – Reações envolvendo óxido nítrico com espécies de oxigênio parcialmente reduzidas.	25
Figura 3 – Comparação entre o ciclo pró-oxidativo da oximioglobina e o ciclo antioxidante da nitrosilmioglobina.....	27
Figura 4 – Ciclo da peroxidação lipídica ilustrando os três principais caminhos de reação responsáveis pelo início do processo oxidativo em alimentos: I) Reação radicalar em cadeia iniciada pela ativação de oxigênio gerando radicais hidroxila ou por radicais fo formados por oxidações químicas ou fotoquímicas; II) Formação enzimática de lipídeos hidroperóxidos através da atividade de lipoxigenase; III) Formação fotosensibilizada de lipídeos hidroperóxidos. Adaptado de Carlsen et al, 2005. ⁴	30
Figura 5 – Estrutura molecular das ferro-porfirinas FeTPPS (esquerda) e hemina (direita) .	37
Figura 6 - Estrutura molecular dos ésteres dos ácidos oléico e linoléico.....	39
Figura 7 – Estrutura molecular para cisteína, glutatona e ácido dihidrolipóico.	42
Figura 8 – Estrutura cristalográfica da BSA desenhada no software UCSF Chimera a partir do número de identificação 1e7h no Protein Data Bank. Os resíduos de cisteína foram destacados.	43
Figura 9 – Estrutura cristalográfica da BLG desenhada no software UCSF Chimera a partir do número de identificação 1bsq no Protein Data Bank. Os resíduos de cisteína foram destacados.	43
Figura 10 – Espectro de UV-vis das soluções de porfirina (preto) e solução aquosa diluída do complexo ao final da síntese (vermelho). [TPPS] = 6,8 µM; [FeTPPS] = 9,8 µM.	49
Figura 11 – Espectro de emissão por fluorescência para soluções de TPPS (vermelho) e de Fe ^{III} TPPS (preto).....	50
Figura 12 – Voltamograma cíclico do íon complexo Fe ^{III} TPPS; CF ₃ COONa/CF ₃ COOH; pH=3,0; µ=0,1 mol L ⁻¹ ; V=20 mV s ⁻¹ ; eletrodo de trabalho carbono vítreo.....	51
Figura 13 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe ^{III} TPPS, metil oleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O ₂ . Concentrações: [Fe ^{III} TPPS] = 8,9 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [NO ₂] = 10,0 10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [metil oleato] = 0,5 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Espectros coletados em intervalos de 30 minutos.....	53

Figura 14 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos por GC-MS para o produto da reação entre Fe ^{III} TPPS, metil oleato e nitrito na ausência de O ₂ (A), na presença de O ₂ (B) e, para o metil oleato padrão (C).....	53
Figura 15 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) FeTPPS, (B) FeTPPS e nitrito, (C) FeTPPS e metil oleato e, (D) FeTPPS, metil oleato e nitrito. Concentrações: [FeTPPS] = 1,2 x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; [NO ₂ ⁻] = 10,0 x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ ; [metil oleato] = 10,0 x 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ . Solvente: mistura tert-butanol/água = 7:3.	55
Figura 16 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre hemina, metil oleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O ₂ (B); concentrações: [hemina] = 11,5 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [NO ₂ ⁻] = 10 10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [metil oleato] = 0,5 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Em (C) está o sistema apenas com a hemina e nitrito; concentrações: [hemina] = 7,8 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [NO ₂ ⁻] = 10 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Espectros coletados em intervalos de 30 minutos.....	56
Figura 17 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos por GC-MS para o produto da reação entre hemina, metil oleato e nitrito na ausência de O ₂ (A), na presença de O ₂ (B) e, para o metil oleato padrão (C).....	57
Figura 18 – Espectro de IV para o metil oleato padrão (A) e para o produto de reação com a hemina na presença de nitrito (B).....	59
Figura 19 – Espectro de IV para ácido oléico da literatura. ⁶¹	59
Figura 20 – Espectro de RMN - ¹³ C para o produto de reação entre hemina, metil oleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura (abaixo). ⁵⁶	60
Figura 21 – Espectro de RMN- ¹ H para o produto de reação entre hemina, metil oleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura ⁶¹ (abaixo).	62
Figura 22 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre hemina, metil linoleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O ₂ (B); concentrações: [hemina] = 6,5 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [NO ₂ ⁻] = 10 10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [metil linoleato] = 0,5 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . Espectros coletados em intervalos de 30 min.	64
Figura 23 – Espectro de IV para o produto de reação do metil linoleato com a hemina na presença de nitrito.....	64
Figura 24 – Espectro de IV para ácido linoléico da literatura. ⁶¹	65
Figura 25 – Espectro de RMN- ¹³ C para o produto de reação entre hemina, metil linoleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura ⁶² (abaixo).	66
Figura 26 – Espectro de RMN- ¹ H para o produto de reação entre hemina, metil linoleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura ⁶² (abaixo).	68
Figura 27 – Espectro de IV para o metil linoleato padrão (A) e para o produto de reação com Fe ^{III} TPPS na presença de nitrito em sistema heterogêneo (B).....	69

Figura 28 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) FeTPPS, (B) FeTPPS e nitrito, (C) FeTPPS e metil oleato e, (D) FeTPPS, metil linoleato e nitrito. Concentrações: $[\text{FeTPPS}] = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{metil linoleato}] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Solvente: mistura tert-butanol/água = 7:3. 70

Figura 29 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, cisteína (cys) e nitrito na ausência (A), na presença de O_2 (B) e abertura do sistema (C). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{cys}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Solução fosfato 10 mM pH 5,8. 72

Figura 30 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, glutathione (GSH) e nitrito na ausência (A), na presença de O_2 (B) e quando o sistema é aberto (C). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Solução fosfato 10 mM pH 5,8. 74

Figura 31 – Traços cinéticos para a formação da Fe^{II} TPPS(NO) a 413 nm a partir da reação de OAT entre Fe^{III} (TPPS), cisteína e nitrito a diferentes concentrações de nitrito e velocidades iniciais da reação em função da concentração de nitrito. Concentrações fixas: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{cisteína}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 77

Figura 32 – Traços cinéticos para a formação da Fe^{II} TPPS(NO) a 413 nm a partir de Fe^{III} (TPPS), nitrito e glutathione e velocidades iniciais da reação em função da concentração de nitrito. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 77

Figura 33 – Traços cinéticos para a formação da Fe^{II} TPPS(NO) a 413 nm a partir de Fe^{III} (TPPS), nitrito e cisteína e velocidades iniciais da reação em função da concentração de cisteína. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 79

Figura 34 – Traços cinéticos para a formação da Fe^{II} TPPS(NO) a 413 nm a partir de Fe^{III} (TPPS), nitrito e glutathione e velocidades iniciais da reação em função da concentração de glutathione. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 79

Figura 35 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e cisteína; (C) Fe^{III} TPPS, cisteína e nitrito. 81

Figura 36 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e glutathione; (C) Fe^{III} TPPS, glutathione e nitrito. 82

Figura 37 – Espectros de RPE para o estado inicial da Fe^{III} TPPS (A) e para o estado final da Fe^{II} TPPS(NO), com a indicação das amplitudes dos sinais representadas por H_0 e L_0 84

Figura 38 – Detalhes dos espectros de RPE nas regiões de (A) 600,0–2000,0 G e (B) 2800,0–4000,0 G para Fe^{III} TPPS, cisteína e nitrito, com tempos de reação de 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos e 3 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{cys}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 85

Figura 39 – Detalhes dos espectros de RPE nas regiões de (A) 600,0–2000,0 G e (B) 2800,0–4000,0 G para Fe^{III} TPPS, cisteína e nitrito, com tempos de reação de 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos e 5 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 86

Figura 40 – Gráficos de $-\ln[R_t/(R_0+R_t)]$ vs. tempo partir da reação de OAT entre Fe^{III} (TPPS), nitrito e (A) cisteína ou (B) glutathiona. Medidas obtidas por espectroscopia paramagnética de elétrons a 77 K. Soluções congeladas em diferentes tempos de reação. Concentrações fixas: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{RSH}] = [\text{NO}_2^-] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mistura 3:1 = tampão fosfato 10 mM (pH=5,8) / etilenoglicol (v/v)..... 86

Figura 41 – (a) Cromatograma total de íons das amostras com o produto de reação de TAO com glutathiona como substrato (preto) e com o produto de reação de TAO com glutathiona como substrato na presença de dimedona (vermelho). (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutathiona oxidada). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2 (GSNO). (d) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 3 (aduto do ácido sulfênico GS(O)H com a dimedona)..... 88

Figura 42 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre mioglobina, cisteína (cys) e nitrito na ausência de O_2 . Concentrações: $[\text{Mb}] = 7,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A), $25,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B); $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{cys}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 91

Figura 43 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, ácido dihidrolipóico e nitrito na ausência de O_2 (A) e com abertura do sistema (B). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{DHHLA}] = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 91

Figura 44 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0-2000,0G (A) e na região de 2800,0-4000,0 G (B) para Fe^{III} TPPS, ácido dihidrolipóico e nitrito, com tempos de reação de 3 segundos, 5 minutos e 10 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 0,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 9,4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{DHHLA}] = 4,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 92

Figura 45 – (a) Cromatograma total de íons das amostras com o ácido dihidrolipóico padrão (preto), com os produtos de reação de TAO com o ácido dihidrolipóico como substrato (vermelho) e com o produto de reação de TAO com o ácido dihidrolipóico como substrato na presença de dimedona (azul). (b) Espectro de massas (ESI(-))MS da espécie 1 (ácido dihidrolipóico). (c) Espectro de massas (ESI(-))MS da espécie 2 (ácido dihidrolipóico oxidado). (d) Espectro de massas (ESI(-))MS da espécie 3 (aduto do ácido sulfênico DAcidS(O)H com a dimedona). (e) Espectro de massas (ESI(-))MS da espécie 4..... 94

Figura 46 – Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (azul), metMb na presença de nitrito com DHHLA adicionado em $t=1 \text{ min}$ (verde), metMb na presença de nitrito com DHHLA adicionado em $t=20 \text{ min}$ (vermelho). Concentrações: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 36,7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{final}} = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{DHHLA}]_{\text{inicial}} = 0,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. 96

Figura 47 – Espectro de RPE na região de 600-4000G para Mb, ácido dihidrolipóico e nitrito em tampão na ausência de O_2 . Concentrações: $[\text{Mb}] = 0,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{DHHLA}] = 0,1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 97

Figura 48 - (A) Traços cinéticos para a formação da Mb(II)(NO) a partir reação de OAT entre metMb, DHHLA e nitrito a diferentes concentrações de nitrito. (B) kobs em função da

concentração de nitrito. Concentrações fixas: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 36,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{DHLA}] = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 99

Figura 49 – (A) Traços cinéticos para a formação da Mb(II)(NO) a partir reação de OAT entre metMb, DAcid e nitrito a diferentes concentrações de DHLA. (B) k_{obs} em função da concentração de DHLA. Concentrações fixas: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 39,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 99

Figura 50 – Espectro eletrônico de absorção da reação entre FeTPPS, BSA e nitrito na ausência (A), na presença de O_2 (B) e para a reação apenas entre FeTPPS e BSA (C). Concentrações: $[\text{FeTPPS}] = 8,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BSA}] = 83,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 101

Figura 51 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e BSA; (C) Fe^{III} TPPS, BSA e nitrito. 102

Figura 52 - Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, BLG e nitrito na ausência de O_2 . Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}$ TPPS] = $8,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BLG}] = 98,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 104

Figura 53 – Resultados de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as reações com BSA e BLG..... 104

Figura 54 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, H_2S e nitrito na ausência de O_2 (A) e com abertura do sistema (B). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}$ TPPS] = $8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 106

Figura 55 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (A) e na região de 3000,0–3800,0 G (B) para Fe^{III} TPPS, H_2S e nitrito. $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 107

Figura 56 – Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (vermelho), metMb na presença de nitrito com H_2S adicionado (azul). Concentrações: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 41,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{final}} = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 107

Figura 57 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600-2000G (A) e de 3000-4000G (B) para Mb, H_2S e nitrito. Concentrações: $[\text{metMb}] = 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 108

Figura 58 – (A) Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (verde), metMb na presença de nitrito com H_2S adicionado (vermelho). Concentrações: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 41,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{final}} = 10,0 \text{ mM}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (B) Detalhes dos espectros de RPE na região 2800,0 – 4000,0 G para Mb, H_2S e nitrito. Concentrações: $[\text{metMb}] = 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ 109

Figura 59 – Resultados de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as reações com a metMb e H_2S na presença de nitrito..... 110

Figura 60 - (a) Cromatograma total de íons das amostras padrão de dimedona (verde) e glutathione oxidada (azul). (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutathione oxidada). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2 (dimedona). 122

Figura 61 - (a) Cromatograma total de íons da amostra controle contendo glutathione, dimedona e nitrito. (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutathione). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2. (d) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 3..... 123

Figura 62 - Espectro de massas por CID do eluato a $t_r = 16,1$ min apresentado na Figura 41(a). 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Óxidos de nitrogênio em sistemas biológicos	22
Tabela 2 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN- ¹³ C para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil oleato.	61
Tabela 3 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN- ¹ H para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil oleato.	63
Tabela 4 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN- ¹³ C para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil linoleato.	67
Tabela 5 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN- ¹ H para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil linoleato.	67
Tabela 6 – Constantes de velocidade para a reação de transferência de átomo de oxigênio a 25° C em solução fosfato 50 mM pH 5,8.	80
Tabela 7 – Constantes de velocidade para reações de tióis com diferentes estados redox da mioglobina. ⁷⁶	98
Tabela 8 – Nomeação das amostras analisadas por SDS-Page.....	105
Tabela 9 – Nomeação das amostras das reações entre mioglobina e H ₂ S analisadas por SDS-Page.....	110

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1** – Ciclo catalítico proposto para reações de transferência de átomo de oxigênio a partir de complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})\text{NO}_2^-$ para biomoléculas (substratos) com conseqüente oxidação..... 35
- Esquema 2** – Oxidação do tiol via TAO resultando na formação de ácidos sulfênicos que são interceptados pela dimedona e/ou que reagem com os tióis em excesso do meio reacional formando dissulfetos..... 87
- Esquema 3** – Ciclo catalítico proposto para reações de transferência de átomo de oxigênio a partir de complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})\text{NO}_2^-$ com formação de espécies nitrosantes e, concomitante formação de espécies nitrosiladas. Adaptado de Heinecke et al. 2010. 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
BLG	beta-lactoglobulina
BSA	albumina sérica
cys	cisteína
DHLA	ácido dihidrolipóico
DNA	deoxyribonucleic acid
ERNs	especies reativas de nitrogênio
EROs	especies reativas de oxigênio
ESI	electrospray ionization
FeTPPS	tetrasulfonato-fenil-porfirina
GC	gas chromatography
GSH	glutathione
H ₂ S	ácido sulfídrico
IV	infravermelho
HOO [•]	radical hidroperoxila
HPLC	high performance liquid chromatography
kDa	kilo Dalton
LC	liquid chromatography
metMb	metamioglobina
Mb	mioglobina

Mb(NO)	nitrosilmioglobina
Mb(O ₂)	oximioglobina
MS	mass spectroscopy
m/z	razão massa/carga
NO	óxido nítrico
NO ₂ ⁻	nitrito
NO ₃ ⁻	nitrato
ONOO ⁻	peroxinitrito
ox	oxidante
red	redutor
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ribonucleic acid
ROO [•]	radical peroxila
RPE	ressonância paramagnética de elétrons
SCE	saturated calomel electrode
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Sub	substrato
TIC	total ion chromatogram
t _r	tempo de retenção
UV	ultravioleta
VC	Voltametria cíclica

SUMÁRIO

Resumo	18
Abstract	19
1. Introdução	20
1.1. Espécies de NOx	22
1.2. Reações envolvendo heme proteínas e espécies de NOx	25
1.3. Heme proteínas complexadas com NOx e a peroxidação lipídica	29
1.4. Importância dos tióis em processos oxidativos do meio biológico	30
2. Objetivos	35
3. Experimental	36
3.1. Metodologia	36
3.1.1. Reagentes	36
3.1.2. Síntese das metaloporfirinas	37
3.1.3. Caracterização dos complexos	38
3.1.4. Reações de transferência de átomo de oxigênio mediadas por íons complexos de ferro com lipídeos na presença de nitrito	38
3.1.5. Reações de transferência de átomo de oxigênio mediadas por íon de complexos de ferro com tióis na presença de íons de nitrito	41
3.2. Instrumentação	45
3.2.1. Espectrofotometria de UV-vis	45
3.2.2. Espectroscopia de Emissão Molecular	45
3.2.3. Voltametria cíclica	45
3.2.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE)	46
3.2.5. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	46
3.2.6. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)	46
3.2.7. Cromatografia Líquida hifenada ao Espectrômetro de Massas (LC-ESI-MS) ..	47
3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	47

3.2.9.	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- ¹ H) e de carbono (RMN- ¹³ C)	48
4.	Resultados e discussão.....	48
4.1.	Caracterização do complexo Fe ^{III} TPPS.....	49
4.1.1.	Espectroscopia de Absorção eletrônica UV-Vis	49
4.1.2.	Espectroscopia de emissão molecular.....	50
4.1.3.	Voltametria cíclica (VC)	50
4.2.1.	Metil Oleato (C18:1(9))	52
4.2.2.	Metil Linoleato (C18:2(9,12))	63
4.2.3.	Cisteína e Glutathiona.....	71
4.2.4.	Ácido dihidrolipóico	91
4.2.5.	Albumina Sérica Bovina (BSA) e β-Lactoglobulina (BLG)	100
4.2.6.	Sulfeto de hidrogênio	106
5.	Conclusões.....	111
6.	Referências bibliográficas	113

Resumo

Os ânions inorgânicos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) por muito tempo foram considerados produtos finais inertes do metabolismo do óxido nítrico (NO) e constituintes indesejáveis da dieta. Entretanto, é crescente o interesse das potenciais reações que podem se processar em meio fisiológico e, que envolvem especialmente o íon nitrito mediadas por complexos de metais de transição. Ferro-heme presente em proteínas como a mioglobina podem formar complexos porfirínicos com NO, gerando espécies que podem atuar principalmente como catalisadores em diversas vias biológicas importantes. Complexos com NOx coordenado a ferro-heme estão envolvidos tanto no processo da cura da carne (pigmentação da carne), como em processos redox, nos quais são capazes de oxidar substratos indiretamente pela produção de espécies reativas ou diretamente por reações de transferência de átomo de oxigênio (TAO). Os lipídeos, constituintes celulares fundamentais na composição de membranas e lipoproteínas, podem servir como substratos para essas reações e, sua oxidação pode ocasionar danos ao organismo. Tióis, importantes antioxidantes e constituintes de proteínas, também podem participar desse tipo de reações e, conseqüentemente gerar danos ao organismo. Considerando que o mecanismo e os parâmetros cinéticos e termodinâmicos destas reações ainda não foram completamente estabelecidos para explicar a vasta funcionalidade destes complexos, o presente projeto de pesquisa visa proporcionar um melhor conhecimento das reações redox envolvendo NOx e mediadas por porfirinas de ferro em alimentos e sistemas biológicos.

Palavras-chave: oxidação lipídica, óxidos de nitrogênio, transferência de átomo de oxigênio, Fe-porfirinas, tióis.

Abstract

For long time, the anions nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) were considered inert end products of nitric oxide (NO) metabolism and undesirable constituents of the diet. Currently, there is an increasing interest for potential reactions which may occur in physiological conditions involving specially the nitrite ion and mediated by transition metal complexes. Heme NOx iron complexes are involved in meat curing process (meat pigmentation) and are able to oxidize substrates indirectly generating reactive species or directly by oxygen atom transfer reactions (OAT). Lipids, fundamental cellular constituents of membranes and lipoproteins, and thiols, important antioxidants and protein constituents, may serve as substrates to OAT and their oxidation may promote damage to the organism. Considering that the mechanism and kinetic and thermodynamic parameters of these reaction have not yet been fully elucidated to explain the varied functionality of these complexes, the present research project aim to bring a better understanding of redox reactions involving NOx mediated by iron porphyrins in foods and biological systems. Thiols, important antioxidants and protein constituents, may serve as substrates to OAT and their oxidation may promote damage to the organism. The present work aims to bring a better understanding of the mechanism, kinetic and thermodynamic parameters of the reaction involving nitrite mediated by iron-porphyrins in food and biological systems.

Keywords: lipid oxidation, nitrogen oxides, oxygen atom transfer, iron porphyrins, thiols.

1. Introdução

Diversos estudos¹ reportam a associação de um grande número de fenômenos patológicos com o estresse oxidativo, tais como câncer, doenças cardiovasculares, inflamação e doenças degenerativas. Na condição de estresse, o sistema biológico torna-se incapaz de evitar a geração de grandes quantidades de radicais, espécies oxidantes diamagnéticas e pró-oxidantes ocasionando uma perturbação da homeostase redox. Quando a homeostase redox celular é alterada, quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) podem ocasionar danos oxidativos à molécula de DNA, RNA, proteínas, lipídeos, e a estruturas complexas e sensíveis de membranas.

O câncer, doença responsável por grande parcela de mortes em alguns países, tem origem na alteração da informação genética e, está sendo considerado reflexo de condições intensivas de estresse oxidativo impostas por dietas ricas em compostos oxidantes e pró-oxidantes.^{1,2} Alguns estudos responsabilizam o aumento da incidência do câncer colorrectal pelo alto consumo de carne vermelha em função do alto teor de ferro-heme, mioglobina (Mb), contido no tecido muscular comparativamente à carne branca.³ O íon de ferro coordenado ao grupo prostético heme das heme-proteínas pode atuar como pró-oxidante no trato gastrointestinal, reagindo com peróxidos e hidroperóxidos para produzir radicais reativos atuando como uma pseudo-peroxidase⁴ e, portanto favorecer a condição de estresse oxidativo. Outro agente importante de promoção para o cancro no trato-gastrointestinal é o íon nitrito que por sua vez pode causar nitrosação em biomoléculas conduzindo a alterações oxidativas, danos ao DNA e mutação, Figura 1.⁵

Figura 1- Tumorigênese e o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer, adaptado de Pan et al., 2010.⁵ ROS = espécies reativas de oxigênio; RNS = espécies reativas de nitrogênio; NO = óxido nítrico; PGs = prostaglandinas; ODC = ornitina descarboxilase; MMP = matriz metaloproteinase; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Pan et. al, Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, 1(1), p. 15-31, 2010.

Heme, o grupo prostético das heme proteínas (como mioglobina e hemoglobina), é uma ferro porfirina responsável pelo transporte e o estoque de oxigênio nestas proteínas. A oximioglobina (MbFe(II)O_2), que além de conferir a coloração da carne, pigmento com cor vermelho cereja, reage com espécies reativas de oxigênio convertendo-se nas formas hipervalentes ferrilmioglobina (MbFe(IV)=O) ($E^0 = +1,4\text{V}$; pH 7,4) e perferrilmioglobina ($\text{MbFe(IV)=O}^{+\bullet}$) ($E^0 \gg 1,4\text{V}$; pH 7,4) ⁶. A mioglobina pode reagir prontamente com espécies de nitrogênio promovendo, por exemplo, a formação da nitrosilmioglobina (MbFe(II)NO), pigmento da carne curada, um complexo porfirínico com potenciais propriedades antioxidantes. Contudo, ERNs, principalmente peroxinitritos, reagem com heme proteínas e podem levar à formação de estados hipervalentes de ferro (IV/V) que prontamente são reduzidas às custas da oxidação de substratos e estruturas sensíveis.

Até recentemente, os ânions inorgânicos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) eram considerados produtos finais do metabolismo do óxido nítrico (NO), biologicamente não tão relevantes, apesar de sua presença na dieta ser considerada indesejável.⁷ Entretanto, é crescente o interesse das potenciais reações em condições fisiológicas envolvendo especialmente o íon nitrito mediadas por metaloenzimas e sua capacidade de atuação como antioxidante ou como pró-oxidante, respectivamente, prevenindo a peroxidação lipídica e mediando reações de transferência de átomo de oxigênio (TAO).

1.1. Espécies de NOx

Os óxidos de nitrogênio são de grande importância para os sistemas biológicos, na medida em que participam de diversas vias metabólicas, tanto como reagentes como cofator enzimático ou mesmo redirecionando vias metabólicas. A Tabela 1 ilustra as principais espécies de nitrogênio e seus respectivos modos de ação nos organismos vivos.⁸

Tabela 1 – Óxidos de nitrogênio em sistemas biológicos

Espécie	Estado de oxidação	Nome	Ação
NO ⁻	+1	Ânion nitroxil	Relaxante muscular
N ₂ O	+1	Óxido nitroso	Anestésico
•NO	+2	Monóxido de nitrogênio (óxido nítrico)	Vasodilatador;
NO ⁺	+3	Nitrosil (cátion nitrosônio)	Espécie nitrosante; mutagênico
NO ₂ ⁻	+3	Nitrito	Oxidante; produto final da oxidação
N ₂ O ₃	+3	Trióxido de dinitrogênio	Espécie nitrosante e oxidante
•NO ₂	+4	Dióxido de nitrogênio	Oxidante
N ₂ O ₄	+4	Tetróxido de dinitrogênio	Espécie nitrosante e oxidante
ONOO ⁻	+5	Peroxinitrito	Oxidante; espécie nitrante; antimicrobiano
NO ₃ ⁻	+5	Nitrato	Produto final da oxidação do NO

Fonte: Rubbo et al. Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury. **Chemical Research Toxicology**, 1996, 9, 809-820.

O monóxido de nitrogênio ou óxido nítrico (•NO) pode atuar como vasodilatador e como transmissor de impulsos nervosos quando presente em baixas concentrações em adequadas regiões no organismo.⁸ Também é o segundo mensageiro celular nas vias metabólicas e tem reconhecida propriedade antimicrobiana. Quando a homeostase redox é comprometida devido a condições de estresse oxidativo ou ativação por macrófagos (inflamações), a concentração de NO aumenta significativamente, o que pode fazer com que o óxido nítrico, em determinadas condições, participe de reações como pró-oxidante, antiredutor, ou como antioxidante.⁹ O •NO livre não é um oxidante forte¹⁰, mas reage quase que por controle difusional ($k = 1,9 \cdot 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) com o ânion superóxido, produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻) que é um oxidante extremamente forte, segundo a reação 1:

O produto ONOO^- pode reagir oxidativamente com a desoxirribose, com o α -tocoferol⁸ ou com proteínas. Neste último caso, é comum ocorrer a nitração de resíduos de tirosina, por exemplo, presentes nas proteínas ribonuclease e lisozima, promovendo a formação radicais derivados de proteína de ocasionado cross-link da proteína por ligações de di-tirosina.¹¹ O ONOO^- também pode iniciar a oxidação lipídica, especialmente em meio ácido, uma vez que a forma protonada do peroxinitrito ONOOH (pK_a 7,49)¹² predomina e apresenta elevada constante de velocidade para reações com biomoléculas oxidáveis e rápida permeabilidade/difusão através de membranas. O peroxinitrito também pode reagir com o CO_2 para gerar o intermediário reativo nitrosoperoxocarbonato, ONOOCO_2^- ($t_{1/2} < 1\text{ms}$), que decompõe-se em NO_3^- e CO_2 (reação 2) ou por fragmentação homolítica forma os radicais oxidantes $\bullet\text{NO}_2$ (1,04V, pH 7) e $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (1,78V, pH 7), como ilustra a reação abaixo.⁴

Ainda, o $\bullet\text{NO}$ reage difusionalmente com radicais, como o hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (reação 4), o alquila ($\text{L}^\bullet$), o alcóxila ($\text{LO}^\bullet$) ou o peróxila ($\text{LOO}^\bullet$) (reação 5), como esquematizado a seguir:

O óxido nítrico também pode reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formando oxigênio singlete excitado¹³ e ou associar-se com íons e complexos de metais de transição por uma simples associação (ilustrada na reação 6) formando espécies nitrosiladas. As reações de nitrosilação de metais de transição têm alta reatividade, pois a simetria e as interações energéticas entre orbitais d dos metais de transição e o óxido nítrico são favoráveis.¹⁴

A reação 5 assim como a reação 1 próxima ao limite difusional em meio aquoso ($k \sim 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{14,15} Proteínas contendo grupos com ferro e enxofre ([FeS]) reagem com o óxido nítrico com constante de velocidade considerável ($k \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁴ Isso permite considerar que o $\bullet\text{NO}$ também pode atuar como pró-oxidante ou espécie antiredutora.

O dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) é produzido pela decomposição de peroxinitrito na presença ou ausência de CO_2 durante a autooxidação do $\bullet\text{NO}$, nas reações de peroxinitrito com metaloproteínas, principalmente heme proteínas e, quando estas últimas oxidam o íon nitrito. E, em condições de aerobiose, é formado a partir do $\bullet\text{NO}$ ⁹ como segue:

Moléculas de $\bullet\text{NO}_2$ podem sofrer reação de combinação (reação 8) ou reagirem com o $\bullet\text{NO}$ (reação 9) formando as espécies nitrosantes⁹:

As reações até então apresentadas constituem formas pelas quais o óxido nítrico atua como pró-oxidante formando ERNs. Entretanto, em determinadas condições biológicas, o óxido nítrico pode atuar como antioxidante, por exemplo, inibindo a peroxidação lipídica, quando os níveis de $\bullet\text{NO}$ excedem os de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, há um redirecionamento das vias de EROs consumindo-as e evitando a formação de radicais e, conseqüentemente, da propagação da oxidação por reações em cadeia.¹⁶ A Figura 2 apresenta de forma simples as vias pelas quais o NO pode reagir com EROs. A presença de alguns produtos finais dessas reações de nitração de lipídeos, como peroxinitrito lipídico (LOONO), está sendo investigada assim como sua possível associação como sinalização celular e com algumas doenças. Lima et al.¹⁷ estudaram a nitração do ácido linoléico (C18:2(9,12)) em sangue humano e constataram a presença de nitrolinolato (LNO_2) e nitrohidroxilinolato (LNO_2OH). A identificação dessas espécies lipídicas oxidadas contendo nitrogênio contribuiu para

o melhor entendimento de como o NO pode agir como antioxidante, anti-redutor ou até pró-oxidante.¹⁸

Figura 2 – Reações envolvendo óxido nítrico com espécies de oxigênio parcialmente reduzidas.

Fonte: RUBBO, H.; DARLEY-USMAR, V.; FREEMAN, B. A. Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury. **Chemical Research Toxicology**, vol. 9, 809-820, 1996.

1.2. Reações envolvendo heme proteínas e espécies de NOx

O íon de ferro tanto no estado de oxidação +2 (ferroso) quanto no estado de oxidação +3 (férica) do grupo heme das hemeproteínas reage rapidamente com $\bullet NO$, sendo as constantes de velocidade para cada caso, $k = 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k = 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, em meio aquoso respectivamente.⁹ Ainda, NO_2^- é capaz de reduzir

¹⁸ Antioxidante: é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas. Possui atividade antiradicalar por meio de transferência de elétrons, podendo atuar como aceptores ou doadores efetivos de elétrons; ação preventiva à oxidação de outras moléculas por meio de sua oxidação.

Anti redutor: é uma substância com ação preventiva à redução de outras moléculas; aceptores efetivos de elétrons com atividade antiradicalar por meio de transferência de elétrons e facilidade para redução.

Pró-oxidante: espécie capaz de promover a oxidação ou induzir a formação de espécies oxidativa, essa capacidade oxidativa está condicionada a alguns fatores, como concentração e meio reacional.

espécies oxoferril de mioglobina (MbFe(IV)=O) ($k = 13,9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e hemoglobina (HbFe(IV)=O) à forma férrica (MbFe(III) e HbFe(III))¹⁹ – como exemplificado na reação 10 – que é menos reativa e oxidante do que os estados hipervalentes⁶:

Além disso, •NO pode se coordenar a hemoglobina para formar nitrosilhemoglobina e a mioglobina para formar nitrosilmioglobina, nitrosilos complexos incapazes de oxidar ácidos insaturados e outras biomoléculas oxidáveis. Tal fato é aproveitado por produtores de alimentos no processo artesanal de preservação de produtos cárneos, processo conhecido como cura da carne.¹⁶

Os tecidos musculares frescos (*pós morte*) apresentam coloração roxa devido à presença de MbFe(II) , deoximioglobina. A coloração avermelhada de tecidos cárneos é oriunda presença da oximioglobina MbFe(II)O_2 cuja formação é proporcionada pelo ambiente aeróbico da exposição do tecido muscular durante o processo de transformação de músculo em carne. Entretanto, após prolongado tempo de armazenamento, as condições oxidativas convertem o complexo de íon Fe(II) das formas da mioglobina à metamioglobina, MbFe(III) , de coloração marrom que é um indicativo de que a carne está oxidada. Para preservar a aparência da carne, pode-se estimular a complexação do ferro com ligantes fortes²⁰, tais como CO e NO. CO e NO se complexam fortemente com o ferro produzindo, respectivamente, a carboximioglobina (MbFe(II)(CO)) e a nitrosilmioglobina (MbFe(II)(NO)) que apresentem espectro de absorção eletrônica na região do UV-Vis similar ao espectro da oximioglobina, mantendo a cor vermelha da carne e aumentando a aceitação pelo consumidor. Entretanto, o CO preserva apenas a aparência e os processos deteriorativos pela atuação microrganismos, incluindo patógenos, ainda podem estar ocorrendo. Assim, alguns países, como União Européia²¹, proíbem a adição de CO em embalagens de produtos cárneos, mas têm a conservação de seus produtos baseada na adição de nitrito de sódio (NaNO_2) para aumentar a disponibilidade de NO que pode se ligar à mioglobina formando nitrosilmioglobina ao mesmo tempo em que inibe a contaminação microbiológica.¹⁹

O aumento da concentração de NO a partir do nitrito pode ocorrer, por exemplo, quando o último reage com a deoxihemoglobina (HbFe(II)) oxidando-a à HbFe(III) e simultaneamente formando NO, que por sua vez se liga à HbFe(II) com

considerável constante de velocidade ($k = \sim 4 \cdot 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).²² Essa reação é usada para explicar efeitos mediados pelo nitrito presente no fluxo sanguíneo.^{7,22}

O pigmento MbFe(II)NO torna-se atrativamente rosado em carne curada cozida através da desnaturação da proteína.¹⁶ Ainda, para este pigmento, gradualmente desenvolve-se descoloração em uma reação dependente de temperatura e na presença de oxigênio em decorrência da sua forma desnaturada ou da oxidação do pigmento a MbFe(III). Para essa reação, é proposto um mecanismo de duas etapas: (i) inicial substituição do $\cdot\text{NO}$ por O_2 ; (ii) subsequente interação da MbFe(II) O_2 com $\cdot\text{NO}$ levando à formação do pigmento marrom metamioglobina (MbFe(III)) e íons nitrato.²³ O ciclo de cor na carne é ilustrado pela Figura 3.

Figura 3 – Comparação entre o ciclo pró-oxidativo da oximioglobina e o ciclo antioxidante da nitrosilmioglobina.

Fonte: CARLSEN, C. U.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 249, 485-498, 2005.

Além da disponibilidade de $\bullet\text{NO}$ pela cura da carne e pela adição direta de nitrito de sódio, a ingestão diária de nitratos por meio da dieta é outra fonte para os óxidos nitrogenados. Verduras e legumes são alimentos que respondem por 72-94% do nitrato ingerido diariamente, pois suas raízes e folhas têm habilidade de acumulá-lo.^{24,25} Uma porção destes alimentos contém mais nitrato do que aquele gerado endogenamente durante um dia por todas as três NOs (NO sintases; isoformas derivadas da L-arginina-NO sintase) juntas.⁷

A interconversão de espécies nitrogenadas entre si, como observado nas reações anteriormente apresentadas, é uma das formas pela qual o íon nitrato excessivamente consumido pela ingestão de alimentos ricos em aminas promove a formação de nitrosaminas²⁶, compostos carcinogênicos, e íon nitrito, que pode levar à inibição do transporte de oxigênio. A reação 11 apresenta a ação de espécies nitrosantes com aminas ou amidas secundárias, sendo produtos N-nitroso, potentes agentes mutagênicos.²⁷

Na saliva, o íon NO_3^- é eficientemente reduzido a NO_2^- por bactérias simbióticas^{7,28} e, este último, leva à geração de uma variedade de espécies de NOx, incluindo-se NO, no sistema gástrico, onde se encontram também as espécies de ferro-heme decorrentes da ingestão de produtos cárneos.²⁹

Volk et al. mostraram que há um efeito sinérgico antioxidante pela combinação de nitrito com polifenóis e ácido ascórbico no sentido de produzir NO, que pode desativar ROS ou inibir a peroxidação lipídica.³⁰ Os autores trabalharam com compostos redutores presentes em vinho e ácido ascórbico e sua influência sobre peroxidação lipídica em carne de peru. As reações foram processadas em locais que simulavam as condições do estômago. Por outro lado, outros estudos reportaram que o NO originado pela redução do íon nitrito na saliva contribuem para processos oxidativos. Por exemplo, Combet et al. observaram que a inibição da nitrosação de algumas aminas por antioxidantes foi menos eficiente em compartimentos lipídicos do que em ambientes aquosos.³¹

Além disso, como a metamioglobina formada através da oxidação da MbFe(II)NO é susceptível à formação de estados hipervalentes altamente reativos, ela pode ser precursora à processos oxidativos à lipídeos, como ácidos graxos

insaturados e fosfolípidos constituintes de membranas celulares, bem como de proteínas, comprometendo os sistemas biológicos.

1.3. Heme proteínas complexadas com NOx e a peroxidação lipídica

A oxidação de lípidos presentes em alimentos pode ocorrer em três vias principais.⁴ A primeira via, também chamada de “autooxidação” ou oxidação lipídica térmica por ar atmosférico através de radicais intermediários, há envolvimento de íons de metais de transição ou enzimas redox tais como a xantina oxidase. Na segunda via, há incorporação de oxigênio a lípidos insaturados por atuação de lipoxigenases, produzindo hidroperóxidos. A terceira via está relacionada com a oxidação fotossensibilizada principalmente por flavinas formando oxigênio singlete excitado que atua como eletrófilo e ciclo adiciona-se à dupla ligação do lípido insaturado formando hidroperóxidos diretamente, reação do tipo ene, como na ativação por lipoxigenases. Adicionalmente à oxidação fotossensibilizada mediada por oxigênio singlete excitado (fotooxidação do Tipo II), o estado tripleto excitado do fotossensibilizador pode agir como forte oxidante abstraindo átomo de hidrogênio ou abstração de elétrons seguindo de deprotonação do radical cátion do lípido (fotooxidação do Tipo I), formando radicais alquila que podem iniciar a reação em cadeia como exemplificado no caso de catálise mediada por metais de transição.³² Esses processos são ilustrados na Figura 4.

A peroxidação lipídica pode ser iniciada pela direta abstração de hidrogênio alílico de lípidos ou então quebrar lípidos hidroperóxidos gerando radicais alcóxila ($\text{MbFe(IV)=O} + \text{LOOH} \rightarrow \text{MbFe(III)} + \text{LO}^\bullet + \text{OH}^-$), processos mediados por MbFe(V)=O e $\text{MbFe(IV)=O}^{+\bullet}$. Ainda, meios ácidos tornam a mioglobina parcialmente proteolizada, o que lhe confere aumento significativo na atividade catalítica para a oxidação de lípidos em meio heterogêneo, e a degradação hidrolítica do pigmento Fe-heme durante o processo de digestão pode, da mesma forma, iniciar um processo oxidativo danoso no trato digestivo.⁴ Compartimentos fisiológicos extremamente importantes, como o fígado e o fluido cérebro-espinhal possuem baixo pH, tornando a protonação da ferrilmioglobina e da perferrilmioglobina

fenômenos extremamente importantes, considerando que conferem aumento da sua reatividade quando atuam como oxidantes.³³

Figura 4 – Ciclo da peroxidação lipídica ilustrando os três principais caminhos de reação responsáveis pelo início do processo oxidativo em alimentos: I) Reação radicalar em cadeia iniciada pela ativação de oxigênio gerando radicais hidroxila ou por radicais formados por oxidações químicas ou fotoquímicas; II) Formação enzimática de lipídeos hidroperóxidos através da atividade de lipoxigenase; III) Formação fotosensibilizada de lipídeos hidroperóxidos. Adaptado de Carlsen et al, 2005.⁴

Fonte: CARLSEN, C. U.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 249, 485-498, 2005.

1.4. Importância dos tióis em processos oxidativos do meio biológico

Os tióis (RSH) estão presentes na composição de diversas moléculas importantes no meio biológico. Eles são fundamentais na constituição de proteínas e na manutenção de sua estabilidade.³⁴ Além disso, diversas moléculas classificadas como tióis conferem marcantes propriedades sensoriais em alimentos, como vinho e

carne.^{35,36} De modo geral, eles participam de diversos processos diversos oxidativos e também podem ser potencialmente atuar como antioxidantes.³⁷

O aminoácido cisteína é um tiol constituinte da sequência primária de algumas heme-proteínas com a função de atuar como o ligante proximal axial para o O₂, ativando o grupo heme de proteínas, como ocorre no citocromo P450.³⁸ Resíduos de cisteína são extremamente importantes nos processos redox de proteínas, além de contribuir para a manutenção da estabilidade de diversas proteínas, uma vez que a formação de pontes de dissulfeto entre cisteínas (RSSR) próximas contribui com efeitos entálpicos durante a obtenção da conformação do estado nativo durante o enovelamento, o que confere uma compensação energética, considerando que a organização espacial da proteína tem alto custo entrópico.

O aminoácido cisteína é o mais importante precursor para a síntese do peptídeo glutathione, que é marcadamente o composto não protéico tiol/sulfidril mais importante em células de mamíferos. A glutathione é um importante redutor de radicais e espécies oxidantes reativas, uma vez que reage com os mesmos produzindo espécies não radicalares.^{39,40,41}

A cisteína, enquanto aminoácido essencial componente da sequência de aminoácidos da estrutura primária de proteínas, pode apresentar-se na região interna das proteínas comprometida em interações fracas ou formando pontes de dissulfeto e, também, pode estar exposta ao solvente (região superficial da proteína). Dessa forma, a proteína está susceptível a participar de processos redox de maneira análoga à cisteína, isto é como um redutor por conta da presença do tiol expostos ao solvente.

Participam da composição da estrutura primária das proteínas vinte aminoácidos essenciais, grupo ao qual a cisteína integra. Denomina-se proteoma o conjunto global de proteínas produzidas pelos organismos, tanto uni como multicelulares. O proteoma humano contém cerca de 300.000 a 3.000.000 proteínas distintas e a essa ampla complexidade está relacionada tanto à diversificação ao nível do mRNA (RNA mensageiro) quanto à modificação de proteínas específicas por modificações covalentes após a tradução do mRNA em proteínas nos ribossomos. Neste último caso, fala-se em modificação pós-traducional⁴², que é responsável pela alteração das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos das proteínas. Reações oxidativas podem participar do processo de modificação pós-

traducional e, quando mediadas por EROs e ERNs, os sítios primários de oxidação de proteínas são os resíduos de cisteína.⁴³ O processo reversível de S-glutathionação protéica, que possui papel central na sinalização redox bem como de proteger as proteínas da oxidação irreversível de seus resíduos de cisteína, é um exemplo de modificação pós-traducional que vem ganhando destaque.^{43,44} Essas alterações encaminham para a mudança estrutural da proteína, o que implica na perda de suas propriedades funcionais. Assim, é fundamental entender os mecanismos, quantificar a modificação pós-traducional da cisteína e entender o papel da formação de proteínas com pontes de dissulfeto (proteínas-SSR, proteínas-SSG e proteínas-Cys-SSG) nos eventos de sinalização redox e outros eventos celulares, associando esses fenômenos com a alteração estrutural de proteínas e perda de sua função e, conseqüentemente, relacioná-los com o surgimento de doenças.

Proteínas globulares como a β -lactoglobulina (BLG) e a albumina sérica bovina (BSA) apresentam, cada uma, apenas um resíduo de cisteína exposto ao solvente. A β -lactoglobulina (BLG) é uma proteína globular composta por 168 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 18,4 kDa. Em sua estrutura secundária, apresentam-se β -folhas (54%) e α -hélices (17%). Funcionalmente, atua no transporte de alguns compostos devido à existência de um sítio hidrofóbico na forma de cálice na sua estrutura terciária. A BLG constitui 50 % do total das proteínas do soro do leite.⁴⁵ A albumina sérica (SA) é a proteína mais abundante no sistema circulatório, respondendo por 60% do total da proteína sérica.⁴⁶ Ela atua como transportador de ácidos graxos, diversos metabólitos e drogas.⁴⁷ A albumina sérica bovina (BSA) é largamente incorporada como modelo para a SA pois é uma proteína homóloga à albumina sérica humana e, também por conta da sua importância medicinal, baixo custo, alta disponibilidade, propriedades de interação com ligantes específicos. Por exemplo, a SA pode interagir com porfirinas e, o complexo resultante dessa associação (BA-porfirina) tem potencial ação anti-tumoral e antibiótica.

Ainda entre os tios importantes no meio biológico, pode ser citado o ácido dihidrolipóico (DHHLA). O DHHLA constitui um ditiol e é a forma reduzida do ácido α -lipóico (α -LA), ácido 1,2-ditiolano-3-pentanóico. O α -LA é naturalmente sintetizado por plantas e animais em baixas quantidades e, em humanos é obtido através de diferentes fontes de alimentos. Além disso, ele é naturalmente encontrado na sua

forma livre, ligado a proteínas por ligações de hidrogênio, ou complexado a proteínas via ligação do amido entre o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina e o grupo carboxílico do α -LA. O α -LA também é uma coenzima para outras enzimas, como a piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase e, um potente antioxidante e agente desintoxicante.⁴⁸

O ácido sulfídrico (H_2S) teve recentemente atribuída a função de agente sinalizador gerado endogenamente. Ele difere de outras pequenas moléculas sinalizadoras como O_2 , NO e CO por sofrer ionização no pH do meio fisiológico. Considerando que seu primeiro pK_a é 6,75 a 25°C (que é relevantemente baixo comparativamente a tióis da forma RSH) no pH fisiológico é encontrado predominantemente na forma HS^- . O potencial de redução dos pares $\text{HS}\cdot/\text{HS}^-$ e $\cdot\text{S}-, \text{H}^+/\text{HS}^-$ foram estimados como de aproximadamente 0,9-1,1 V, similar ao dos radicais tiil alquila ($\text{RCH}_2\text{S}\cdot$). Além disso, o H_2S pode interagir com metaloproteínas na forma HS^- , e também consegue ligar-se a metais na sua forma oxidada, por exemplo, a Fe^{3+} . Pietri et al.⁴⁹ estudaram a reatividade de Hemoglobina I frente ao H_2S e determinaram as constantes de associação e dissociação como sendo, respectivamente, $k_{\text{on}} = 2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_{\text{off}} = 0,22 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, o que evidencia a alta capacidade de associação do ácido sulfídrico com ferro heme. Ao reagir com tióis na sua forma oxidada, o sulfeto de hidrogênio forma hidropersulfito, que é um importante mediador de funções enzimáticas e pode estar envolvido no conjunto de reações redox que engloba tióis (RSH), tiila ($\text{RS}\cdot$), dissulfetos (RSSR), sulfenatos (RSO^-), sulfinatos (RS(O)O^-), sulfonatos ($\text{RS(O)}_2\text{O}^-$) e nitrosotióis (RSNO).⁵⁰

As reações de transferência de átomo de oxigênio envolvendo complexos metálicos com NO_2^- coordenado e tióis são descritas na literatura³⁷, porém o mecanismo ainda permanece especulativo, além de que, grande parte desses estudos reportados baseia-se em condições que não mimetizam o meio fisiológico ou tecido muscular e carne e ainda os substratos estudados não têm relevância biológica.

Khin et al.⁵¹ estudaram a oxidação de DMS (H_3CSSCH_3 – dimetil sulfeto) e sal sódico de tris-(3-sulfonatofenil)fosfina (tppts) por nitrito mediada por Fe-porfirinas e, propuseram que a reação é dada em várias etapas, como pode ser visto no Esquema 1. Inicialmente, ocorre a associação do NO_2^- à Fe-porfirina ($\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})$) representada pela reação 12, seqüencial transferência de átomo de oxigênio aos

substratos, formando monóxidos de tpptsO e DMSO e o composto ferroso $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPTS})(\text{NO})$ (reação 13). Ao final do processo, pode ocorrer restituição de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPTS})$ (reação 14), tanto por formação concomitante de N_2O (reação 15), como por oxidação de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPTS})(\text{NO})$ proporcionada por ambiente aeróbico, como observado no Esquema 1. Ambos processos evidenciam que a Fe-porfirina participa de um ciclo catalítico para TAO por nitrito. O processo global é representado pela reação 13, onde S é o substrato.

As ferro-porfirinas ativam o NO_2^- quando este se torna um de seus ligantes de maneira a inserir átomos de O preferencialmente em ligações C – H alílicas, benzílicas e de aldeídos.⁵² O processo é termodinamicamente favorecido, considerando a estabilidade do aduto ferro(II) nitrosil porfirina ($\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})(\text{NO})$) formado, como mostra a reação 13.

Desta maneira, é de interesse o conhecimento da reatividade e mecanismos das reações mediadas por Ferro-heme envolvendo NOx coordenado, já que as mesmas podem então estar envolvidas tanto no processo de cura da carne como em processos oxidativos em sistemas biológicos e processos fisiológicos, ocasionando lesões e modificações em biomoléculas.

Esquema 1 – Ciclo catalítico proposto para reações de transferência de átomo de oxigênio a partir de complexos do tipo FeIII(P)NO_2^- para biomoléculas (substratos) com conseqüente oxidação.

Fonte: KHIN, C.; HEINECKE, J.; FORD, P. C. Oxygen Atom Transfer from Nitrite Mediated by Fe(III) Porphyrins in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 130 (42), 13830–13831, 2008.

2. Objetivos

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo investigar a reatividade de lipídeos insaturados e tióis relevantes em tecido muscular e em meio fisiológico, frente a reações de transferência de átomo de oxigênio do nitrito mediadas por Fe-heme.

3. Experimental

3.1. Metodologia

3.1.1. Reagentes

Os solventes utilizados (acetona, ácido acético, diclorometano, etanol, éter etílico, hexano, metanol, tert-butanol) assim como os outros reagentes (sais) são de grau HPLC e ACS, respectivamente, e obtidos da (Sigma-Aldrich, J.T. Baker ou Merck).

Os reagentes utilizados no preparo das soluções tampão foram adquiridos da Sigma-Aldrich e grau de pureza analítico ACS. A água foi previamente purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

A cisteína, a glutatona, as proteínas albumina sérica bovina (BSA), β -lactoglobulina (BLG) e a mioglobina do coração do cavalo (Mb), a hemina, o sal tetrasódico 4, 4', 4'', 4''' - (Porfina-5, 10, 15, 20-tetrail) tetrakis (ácido benzenesulfônico) (TPPS), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o sulfeto de ferro II (FeS), a 5,5-dimetilciclohexano-1,3-diona (dimedona), o ácido dihidrolipóico reduzido e os lipídeos metil oleato e metil linoleato foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem prévio tratamento. O nitrito de sódio (NaNO_2) de grau analítico foi obtido da Acro Organics.

Para as reações que exigiam ausência de oxigênio, os procedimentos foram realizados em sistemas fechados, utilizando balões borbulhadores, balões de fundo redondo e cânulas de teflon para a condução do gás e transferência das soluções. O gás inerte utilizado, o argônio 5.0 (procedência White Martins), foi previamente purificado para a remoção de oxigênio através de um sistema de via úmida composto de dois vasos lavadores contendo solução ácida de CrCl_3 , com amálgama de Zn(Hg) .^{53,54}

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) foi gerado a partir da adição de solução de ácido clorídrico ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$) a sulfeto de ferro contido num erlenmeyer fechado, sendo o gás gerado conduzido por cânula de teflon até soluções tamponadas adequadas durante 12 minutos. Essa solução estoque foi diluída e, posteriormente adicionada às soluções contendo o complexo de ferro na presença de nitrito.

Os reagentes utilizados nos procedimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou da Bio-Rad com grau de pureza para biologia molecular.

3.1.2. Síntese das metaloporfirinas

Complexos modelo de Ferro-heme sintetizados no presente trabalho são: FeTPPS e hemina (Figura 5). A hemina utilizada foi adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich) e utilizado sem prévio tratamento.

Figura 5 – Estrutura molecular das ferro-porfirinas FeTPPS (esquerda) e hemina (direita)

O complexo Fe^{III}TPPS foi sintetizado a partir de procedimentos descritos na literatura⁵⁵ como segue:

- adição do sal FeSO₄ · 7H₂O em excesso a uma solução quente e neutra de sal sódico de tetrasulfonato-fenil-porfirinato (TPPS) ânion (Sigma-Aldrich). Foi notada a alteração de cor da solução vermelha para marrom quase que instantaneamente à adição do sal ferroso. O pH da solução foi mantido acima de 6,0 para assegurar que a porfirina fique em sua forma protonada nos nitrogênios do anel (pK_a = 4,8).^{55,56} A solução foi aquecida em um banho a 50°

C por aproximadamente 30 minutos, até o total consumo da porfirina base livre. A solução após resfriada, foi acidificada a pH 3 e percolada em uma resina de troca catiônica Dowex® 50W X8 (50-100 mesh) para que o excesso de íon Fe(III) seja removido. A solução resultante foi imediatamente neutralizada para evitar a desmetalação ácida do complexo. Uma purificação adicional foi necessária para remover o Na₂SO₄ pela precipitação de Fe^{III}TPPS. Para tanto, foi necessário tornar o pH da solução igual a 5 e, então adicionar acetona para precipitar o complexo. O precipitado foi posteriormente redissolvido em metanol e precipitado com acetona e, então seco.

3.1.3. Caracterização dos complexos

Os complexos de íon ferro foram submetidos à análise espectrofotométrica na região do UV-vis para a verificação de transições do tipo d-d e de transferência de carga sendo os dados obtidos comparados com aqueles reportados pela literatura.^{51,55,56,57}

Considerando que procedeu-se à síntese do complexo Fe^{III}TPPS, análises adicionais foram necessárias para caracterizá-lo. Desse modo, o complexo foi submetido à análise por espectroscopia de fluorescência (para a identificação dos comprimentos de onda envolvidos na emissão) e por voltametria cíclica (para a atribuição dos potenciais de redução para o ferro da porfirina e para a verificação de impurezas remanescentes dos reagentes usados na síntese do complexo) e os dados foram comparados com a literatura.^{55,56,57,58}

3.1.4. Reações de transferência de átomo de oxigênio mediadas por íons complexos de ferro com lipídeos na presença de nitrito

A reatividade dos complexos foi investigada em mistura tert-butanol:água = 3:1 que permite que se trabalhe em meio homogêneo. Estes complexos, por sua vez,

tiveram seu comportamento estudado frente aos lipídeos na forma de éster do ácido oléico e do ácido linoléico, ilustrados na Figura 6, na presença de íons nitrito.

Figura 6 - Estrutura molecular dos ésteres dos ácidos oléico e linoléico.

As reações foram realizadas sob diferentes condições:

- Em sistema fechado, uma solução previamente deaerada com Ar contendo o éster do lipídeo na mistura tert-butanol:água = 3:1 foi transferida por meio de cânula de teflon a uma cubeta de quartzo com septo contendo uma solução com o complexo e nitrito no mesmo solvente e previamente deaerada. Os volumes a serem misturados foram ajustados de modo que as concentrações finais obtidas foram de $8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para o íon complexo (FeTPPS ou hemina); de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o NaNO_2 e de $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o lipídeo. Imediatamente após a transferência das soluções para a cubeta, esta foi levada ao espectrofotômetro com a finalidade de monitorar as alterações espectroscópicas do íon complexo de ferro. A mistura reacional foi injetada em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-MS) para analisar os produtos de reação derivados do lipídeo.
- Uma solução contendo 20 mg de lipídeo foi adicionada através de uma cânula de teflon a um balão contendo complexo e nitrito. O sistema estava fechado e constantemente borbulhado com Ar para impedir a

entrada de oxigênio. O volume final foi ajustado para 50 mL, sendo as concentrações finais de complexo ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ ou hemina) de $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; de NaNO_2 , de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e de lipídeo, de $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Foi utilizado um volume considerável de reação (50 mL) para que fosse obtida massa suficiente de substrato submetido à oxidação para poder caracterizá-lo. Alíquotas da solução foram retiradas e analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (TLC).

Com os resultados dessas reações, como será explicado no tópico dos resultados do presente relatório, decidiu-se trabalhar em sistemas heterogêneos. Em um sistema fechado, por meio de cânula de teflon foi adicionada uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2) em tampão fosfato $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de pH 5,8 a uma solução do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ no mesmo tampão, de modo que o volume final fosse 2,5 mL. Uma solução de 2,5 mL com 48 mg de metil linoleato em hexano, previamente desaerada por 5 minutos foi transferida por meio de cânula de teflon ao sistema aquoso com o complexo, de modo a formar um sistema heterogêneo constantemente borbulhado por Ar mantendo as duas fases em constante contato. O sistema bifásico foi mantido borbulhando por 24 horas para assegurar completa reação. Alíquotas da fase aquosa foram removidas para a verificação de qualquer alteração espectrofotométrica nessa fase, revelando possível formação do íon $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})(\text{NO})$.

As alterações nos complexos foram monitoradas principalmente por métodos espectroscópicos como UV-vis e Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE). Neste último caso, as reações foram feitas usando-se a mistura tert-butanol:água = 3:1 como solvente. As soluções de reação foram congeladas e, os espectros de RPE foram obtidos a baixa temperatura. As concentrações usadas foram $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_2 e $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de lipídeo.

Os produtos formados pela oxidação dos substratos foram caracterizados por métodos cromatográficos, como Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS) e Cromatografia em Camada Delgada (“thin layer chromatography” – TLC) e, espectroscópicos como infravermelho (IV) e, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D de ^{13}C e ^1H .

Previamente à caracterização dos lipídeos produtos das reações, foi feito o isolamento dos mesmos. A solução de reação foi inicialmente rota-evaporada e o

óleo obtido foi submetido à técnica de extração solvente-solvente. Água e éter foram adicionados ao óleo para aumentar os volumes e proceder-se à extração do possível produto de oxidação. Foram utilizados 10 mL de água, 5 mL de éter e 5 mL de hexano. Com o uso de um funil de separação foram separadas a fase aquosa (com o complexo Fe^{III} TPPS e NaNO_2) da fase orgânica (com o possível produto de oxidação dos lipídeos). À fase orgânica coletada foi seca com Na_2SO_4 anidro e a mistura resultante foi então filtrada e, o éter removido por roto-evaporação.

Nas caracterizações dos lipídeos por TLC foram utilizadas placas de sílica gel suportada em alumínio com 200 mm de espessura de camada e com indicador fluorescente (254nm) (Sigma-Aldrich). Os eluentes utilizados foram solução de éter etílico e hexano 1:4(v/v) e 1:10(v/v) e permanganato de potássio (KMnO_4) foi utilizado como revelador.

3.1.5. Reações de transferência de átomo de oxigênio mediadas por íon de complexos de ferro com tióis na presença de íons de nitrito

A reatividade do íon complexo Fe^{III} TPPS frente aos tióis foi investigada em solução fosfato $10,0 \text{ mol } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,8. Os tióis (RSH) avaliados foram a cisteína, glutathiona, e ácido dihidrolipóico, e as proteínas albumina sérica bovina (BSA) e β -lactoglobulina (BLG), que são dotadas de resíduos de cisteína expostos ao solvente. O ácido sulfídrico, considerando sua atual importância biológica constatada e reatividade para a formação de nitrosotióis (RSNO), foi inserido no conjunto de substratos avaliados. Para as reações com o ácido dihidrolipóico a solução de fosfato $10,0 \text{ mol } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,8 continha ainda $1 \text{ mol } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de EDTA.

As estruturas moleculares da cisteína, da glutathiona e do ácido dihidrolipóico estão apresentadas na Figura 7 e as estruturas cristalográficas das proteínas estão representadas nas Figuras 8 e 9.

Figura 7 – Estrutura molecular para cisteína, glutatona e ácido dihidrolipóico.

As reações foram feitas na presença e na ausência de oxigênio. No primeiro caso, os sistemas foram mantidos deareados em atmosfera de argônio com fluxo constante de Ar. Tampão fosfato previamente deaerado foi transferido a um balão contendo certa massa para cada tiol investigando. O volume necessário dessa solução, de modo a fornecer as concentrações finais desejadas para cada respectivo tiol, foi adicionado a uma cela de quartzo com septo (também deaerada previamente) contendo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e nitrito. Imediatamente após a mistura, a cubeta foi levada ao espectrofotômetro e foram obtidos espectros eletrônico de absorção em determinados intervalos de tempo para acompanhar as alterações do sistema. As concentrações finais na mistura reacional foram: $8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e de $10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para o NaNO_2 . Quando o tiol utilizado era cisteína, glutatona e/ou ácido dihidrolipóico, a concentração final de tiol foi de $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Para as proteínas BSA e BLG, a concentração final na reação foi de $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Para avaliar a influência da presença de oxigênio, os sistemas fechados foram abertos e então, foram registrados espectros eletrônicos de absorção em diferentes intervalos de tempo. Também foram realizadas reações em sistemas abertos, com contato direto da reação com oxigênio molecular.

Figura 8 – Estrutura cristalográfica da BSA desenhada no software UCSF Chimera a partir do número de identificação 1e7h no Protein Data Bank. Os resíduos de cisteína foram destacados.

Figura 9 – Estrutura cristalográfica da BLG desenhada no software UCSF Chimera a partir do número de identificação 1bsq no Protein Data Bank. Os resíduos de cisteína foram destacados.

Adicionalmente foram feitas reações substituindo o íon complexo Fe^{III} TPPS pela mioglobina ($\text{metMb}^{\text{III}}$). Os substratos utilizados foram a cisteína, o ácido

dihidrolipóico e o sulfeto de hidrogênio (H_2S). Os sistemas foram inicialmente monitorados por espectroscopia de absorção no UV-vis. O sistema foi mantido fechado para impedir a entrada de O_2 e as concentrações utilizadas foram $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cisteína, $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de nitrito e $25,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (quando a cisteína é o substrato) ou $36,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (quando o ácido dihidrolipóico ou H_2S é o substrato) de metMb^{III} para monitorar as alterações das bandas Q de absorção do espectro eletrônico da heme proteína.

Enquanto o monitoramento das alterações espectroscópicas do sistema foi acompanhado via espectrofotometria UV-vis, os produtos da possível oxidação de cisteína, ácido dihidrolipóico e glutatona foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com interface de ionização por eletrospray (LC-MS). Nesse caso, as reações foram realizadas nas mesmas condições utilizadas no monitoramento do complexo por UV-vis, com o diferencial de ser realizada na presença de dimedona (5,5-dimetilciclohexano-1,3-diona)⁵⁷, uma armadilha química específica para ácidos sulfênicos RS(O)H . A possível oxidação das proteínas foi também avaliada por SDS-PAGE.

As alterações no complexo, ainda, foram avaliadas por Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE). As reações foram feitas usando-se 25% de etilenoglicol à mistura de reação (solução fosfato $50,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,8), para favorecer o processo de vitrificação, considerando que foram congeladas e, os espectros de RPE foram obtidos a baixa temperatura. As concentrações usadas foram $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_2 . As concentrações usadas foram $10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ quando o substrato oxidável era cisteína e glutatona; $4,80 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ quando o substrato era o ácido dihidrolipóico e, $10,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para BSA e BLG. Para as reações utilizando a mioglobina como ferro-heme modelo, não foi adicionado etilenoglicol, as reações foram mantidas sob atmosfera de argônio e, a concentração de Mb foi $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de ácido dihidrolipóico de $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Espectrofotometria de UV-vis

As medidas de espectrofotometria de UV-vis foram realizadas nos espectrofotômetros Hitachi, modelo U-3105 e em um leitor de placas Thermo Scientific modelo Multiskan GO com acessório para leitura de cubetas. Foram utilizadas celas de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm. Todos os sistemas foram apropriadamente termostatizados a 25° C.

3.2.2. Espectroscopia de Emissão Molecular

Os experimentos de emissão molecular foram conduzidos em um espectrofluorímetro Hitach modelo F-4500 utilizando-se de cubetas de quartzo (Hellma GmbH & Co.KG) com quatro faces polidas e de caminho óptico de 1,0 cm. O comprimento de onda de excitação para o complexo foi 413 nm e a emissão foi registrada no intervalo de 423 – 800 nm.

3.2.3. Voltametria cíclica

Foi utilizado um potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT100 para a realização das medidas eletroquímicas que foram feitas em uma cela de vidro encamisada de volume de 5,0 mL. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono vítreo de área superficial de 3,0 mm². O eletrodo de referência utilizado foi o de calomelano saturado (Hg₂Cl₂/Hg/KCl_{sat}) e o contra-eletrodo foi uma placa de platina de área superficial de 8,0 mm². As medidas foram realizadas em meio aquoso ácido (pH=3, m=0,1 mol L⁻¹, ácido trifluoracético CF₃CO₂Na/ CF₃CO₂H).

3.2.4. Ressonância Paramagnética de Elétrons (RPE)

Foi utilizado um espectrômetro Bruker, modelo EMXplus. Os experimentos a 77 K foram realizados pela imersão do tubo (4 mm) contendo a amostra, em criostato de quartzo preenchido com N₂ líquido e posicionado na cavidade padrão TE₁₀₂ de ressonância operando na banda-X.

Os espectros foram varridos em duas regiões distintas; uma situada a 600,0 – 2000,0 G e outra a 2800,0 – 4000,0 G. Os parâmetros utilizados no experimento foram: campo magnético central: 1300,0 (600,0 – 2000,0 G) ou 3400,0 G (2800,0 – 4000,0 G); frequência: 9,4 GHz; potência: 6,3 mW; modulação de frequência: 100,00 kHz; modulação da amplitude: 3,00 G. Foram acumulados oito varreduras para cada espectro.

3.2.5. Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de IV foram obtidos através de um espectrofotômetro BOMEM, modelo FT-IR MB – 102, na região de 4000 a 400 cm⁻¹. Os lipídeos e produtos de reação foram aplicados a pastilhas de silício, evaporadas para formação de filme fino e então o espectro adquirido.

3.2.6. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu GC-17A, equipado com um detector de massas Shimadzu QP-5050A operando no modo de impacto eletrônico com 70 eV e monitoramento por análise em varredura linear (*scan*).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma HP-FFAP (50 m x 0,20 mm x 0,33 µm de espessura do filme da fase estacionária de polietileno glicol esterificado). A programação de temperatura usada para o forno: temperatura inicial de 35° C elevada a 5° C min⁻¹ até 180° C, elevada a 20° C min⁻¹ até 220° C e mantida por 5

minutos. A temperatura do injetor e da interface do detector foi de 220° C. o volume de injeção foi de 1,0 µL em modo “split” de 1:15 utilizando hélio como gás de arraste com rampa de pressão para manutenção da vazão constante de 1,0 mL min⁻¹.

3.2.7. Cromatografia Líquida hifenada ao Espectrômetro de Massas (LC-ESI-MS)

As análises foram realizadas em um sistema de HPLC Shimadzu Prominence LC20AD hifenado ao espectrômetro de massas com analisador de múltiplo estágio do tipo “ion-trap” Bruker modelo Esquire 4000, equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS). A coluna utilizada foi Shim-pack (VP-ODS) C18 (150 × 2.0 mm, 5 µm), mantida a 20° C. As amostras foram separadas usando água/0,1% de ácido fórmico (v/v) (solvente A) e acetonitrila/0,1% de ácido fórmico (v/v) (solvente B) a um fluxo 0,2 mL min⁻¹, sendo a razão inicial entre as fases de 5:95 (A:B). A solução foi dessalinizada por 5 minutos e então analisada por ESI. A separação cromatográfica foi efetuada com um gradiente de eluição linear de 5% do solvente B em A até 95% do solvente B em A em 44 minutos. As condições de nebulização foram: pressão de 40 psi, fluxo de gás (N₂) 9 . L min⁻¹, temperatura de dessolvatação de 350° C, voltagem do capilar 3000 V, operando no modo de detecção de íons positivo nas análises dos produtos das reações com glutatona e cisteína e, no modo negativo nas análises dos produtos das reações com o ácido dihidrolipóico. As amostras foram preparadas em tampão fosfato 10 mM (pH=5,8) e diluídas em solução água/0,1% de ácido fórmico (v/v) (solvente A).

3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A avaliação da possível oxidação das proteínas submetidas à reação com o Fe^{III}TPPS na presença de nitrito foi acompanhada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As amostras foram diluídas em dois tampões Tris-HCl 50×10⁻³ mol L⁻¹ pH 6,8; SDS 2%;

azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%, um contendo $100 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ditionitrito (DTT) e o outro sem DTT. Elas foram aplicadas juntamente com um marcador de massa molecular (*PageRuler™ Unstained Protein Ladder* – Fermentas) no gel e então submetidas a uma voltagem de 200 V durante aproximadamente 90 minutos. O uso do DTT tem a finalidade de quebrar as pontes de dissulfeto nas proteínas. A oxidação da BSA e da BLG em seus resíduos de cisteína formaria dímeros de proteína que seriam clivados na presença do DTT e, isso justifica a ausência dele na aplicação das amostras ao gel. Esse método foi utilizado para avaliar oxidação da proteína miosina e é descrito na literatura.⁵⁹

A eletroforese foi conduzida em equipamento *Mini-Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad), com gel de empacotamento 5% e gel de separação 10%.

3.2.9. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-¹H) e de carbono (RMN-¹³C)

As medidas de RMN foram executadas em um espectrômetro Bruker Avance III “Nanobay” de 9,4 Tesla equipado com uma sonda BBFO de 5 mm de diâmetro interno e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z. Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 303 K utilizando a sequência de pulso de pré-saturação do solvente NOESYGPPR1D para suprimir o sinal da água. Como solvente foi utilizado clorofórmio deuterado contendo TMS como referência interna.

4. Resultados e discussão

Com o intuito de facilitar o entendimento das reações investigadas, os dados experimentais coletados e a discussão dos resultados obtidos, foram divididos em conjuntos de acordo com a classe do substrato submetido a oxidação por reação de transferência de átomo de oxigênio do íon nitrito coordenado ao complexo Fe(III)-porfirina. Inicialmente será discutida a caracterização da Fe^{III}TPPS sintetizada.

4.1. Caracterização do complexo Fe^{III} TPPS

4.1.1. Espectroscopia de Absorção eletrônica UV-Vis

A Figura 10 apresenta o espectro eletrônico de absorção da porfirina TPPS na forma livre e do íon complexo Fe^{III} TPPS em tampão fosfato pH 5,8 formado 45 minutos após a adição de excesso de íons de $\text{Fe}(\text{III})$ a solução da porfirina base livre. Claramente, observa-se pela análise da Figura 10 a existência de alterações espectroscópicas sugerindo a formação do íon complexo Fe^{III} TPPS. A porfirina livre TPPS, em meio aquoso com pH 7, apresenta banda Soret centrada em 413 nm com coeficiente de absorvidade molar de $5,00 \cdot 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e bandas Q centradas em 515, 550, 580, e 633 nm ($\epsilon_{515} = 1,72 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{550} = 7,9 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{580} = 7,5 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{633} = 4,2 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^{51,55} Para o espectro de absorção eletrônico do íon complexo Fe^{III} TPPS são reportadas a presença da banda Soret centrada em 393 nm e da banda Q em 528 nm, em meio aquoso com $C_{\text{H}^+} = 10^{-5,8} \text{ mol L}^{-1}$.^{51,52} Como pode ser observado na Figura 10, as alterações no espectro de absorção eletrônico durante o curso da reação de metalação da porfirina são condizentes com a formação do íon complexo Fe^{III} TPPS. Nota-se que durante esse intervalo de tempo ocorreu a completa complexação do íon férrico pela porfirina base livre.

Figura 10 – Espectro de UV-vis das soluções de porfirina (preto) e solução aquosa diluída do complexo ao final da síntese (vermelho). [TPPS] = 6,8 μM ; [FeTPPS] = 9,8 μM .

4.1.2. Espectroscopia de emissão molecular

Para confirmar a inexistência de porfirina base livre ao final da reação de metalação, foram preparadas soluções de TPPS base livre e do íon complexo isolado as quais foram submetidas a análise por espectroscopia de emissão molecular (fluorescência). A Figura 11 ilustra o espectro de emissão de fluorescência, excitação em 413 nm com largura de fenda de 10 nm, registrado para ambas soluções.

Figura 11 – Espectro de emissão por fluorescência para soluções de TPPS (vermelho) e de Fe^{III} TPPS (preto).

Observa-se, na Figura 11, as bandas de emissão de fluorescência centradas em 647 e 706 nm característicos da porfirina TPPS⁶⁰ em meio aquoso, enquanto que para o produto final isolado da reação de metalação, não se observa emissão de fluorescência condizente com a complexação do íon férrico no anel porfirínico ocasionando supressão de fluorescência por associação a átomo pesado.

4.1.3. Voltametria cíclica (VC)

A Figura 12 apresenta o voltamograma cíclico para o íon complexo Fe^{III} TPPS em solução aquosa ácida ($\text{CF}_3\text{COONa}/\text{CF}_3\text{COOH}$; pH=3,0; $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O complexo porfirínico férrico apresenta um processo eletroquímico na faixa de potencial de -

0,6V a 1,0V. Observa-se a redução do centro metálico Fe(III) do complexo porfirínico Fe^{III}TPPS a Fe(II), processo eletroquímico representado por E1 que está centrado a -0,3V e é atribuído à componente catódica do par redox Fe(II)/Fe(III). A onda a -0,11V representado pelo processo eletroquímico denominado E2, está relacionado à oxidação do centro metálico Fe(II) formado no processo E1 a Fe(III). A análise do voltamograma cíclico apresentado na Figura 12 apontando a existência de apenas duas ondas referentes aos processos acima mencionados corrobora a ausência de demais impurezas oriundas da síntese do íon complexo Fe^{III}TPPS e a identidade da espécie.

Figura 12 – Voltamograma cíclico do íon complexo Fe^{III}TPPS; CF₃COONa/CF₃COOH; pH=3,0; $\mu=0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $V=20 \text{ mV s}^{-1}$; eletrodo de trabalho carbono vítreo.

A análise conjunta dos dados coletados de UV-vis, fluorescência e voltametria cíclica permitiram confirmar a formação do íon complexo Fe^{III}TPPS e concluir que as etapas envolvidas na síntese e purificação desse íon complexo foram adequadas ao propósito.

4.2. Reações envolvendo Fe-heme coordenado a nitrito e lipídeos

4.2.1. Metil Oleato (C18:1(9))

O monitoramento da reação de transferência de átomo de oxigênio do íon nitrito coordenado a Fe^{III} TPPS promovendo a oxidação do lipídeo insaturado foi monitorada em um primeiro momento pela análise das alterações do espectro de absorção eletrônico no sentido da verificação do aparecimento de uma banda centrada ao redor de 413 nm correspondente à formação do complexo Fe^{II} TPPS(NO).^{51,52} Com relação as possíveis modificações oxidativas no lipídeo insaturado, os produtos de oxidação do substrato orgânico foram avaliados por CG-MS e RMN de ^1H e ^{13}C .

Na Figura 13 é apresentado o espectro eletrônico de absorção para a possível reação de oxidação do metil oleato via TAO na ausência (A) e na presença de O_2 (B). Quando apenas nitrito de sódio, em excesso, é adicionado à solução de Fe^{III} TPPS em meio de tert-butanol:água 3:1 v/v, observa-se o aparecimento de uma banda ao redor de 414 nm que mantém-se persistente mesmo após a adição do lipídeo insaturado, porém com uma densidade óptica menor. À medida que a reação prossegue nota-se o deslocamento desta banda para menores comprimentos de onda (407 nm) em conjunto com a diminuição da sua intensidade. Esta alteração é observada tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, porém o deslocamento da banda ocorre em uma taxa de velocidade maior em meio aerado. Os dois processos ocorrem lentamente, uma vez que o último espectro foi coletado dois dias após o início da reação, mas a presença de oxigênio acelera o processo.

O aparecimento da banda de absorção centrada em 414 nm pode ser atribuída à possivelmente formação do íon complexo Fe^{II} TPPS(NO) ou ainda à ao complexo Fe^{II} TPPS.

Figura 13 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, metil oleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O_2 . Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{metil oleato}] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Espectros coletados em intervalos de 30 minutos.

É apresentado na Figura 14 os cromatogramas e os respectivos espectros de massas registrados para os lipídeos insaturados e para os produtos de reação. Como pode ser observado na Figura 14, não houve alteração entre os tempos de retenção (indicados ao lado dos respectivos espectros de massas em cada caso) entre o precursor metil oleato e os produtos de reação com o complexo na presença de íons nitrito. Ainda, os espectros de massas apresentam os mesmos padrões de fragmentação para todos os casos, padrões estes correspondentes ao fragmentograma obtido por impacto de elétrons para o metil oleato^{61,62} sugerindo fortemente que a reação de TAO do nitrito para o lipídeo insaturado mediado pelo complexo Fe^{III} TPPS não ocorreu mesmo após longos tempos de reação.

Figura 14 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos por GC-MS para o produto da reação entre Fe^{III} TPPS, metil oleato e nitrito na ausência de O_2 (A), na presença de O_2 (B) e, para o metil oleato padrão (C).

(B) Espectro de massas para o produto da reação na presença de O₂

(C) Espectro de massas para o metil oleato padrão

Desta forma a banda de absorção centrada em 414 nm formada na reação em questão pode ser atribuída a formação do complexo $\text{H}_2\text{O}-\text{FeTPPS}-\text{H}_2\text{O}$ ⁶³. A Figura 15 apresenta os espectros de RPE para as reações de TAO com o metil oleato.

Figura 15 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) FeTPPS, (B) FeTPPS e nitrito, (C) FeTPPS e metil oleato e, (D) FeTPPS, metil oleato e nitrito. Concentrações: $[\text{FeTPPS}] = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{metil oleato}] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Solvente: mistura tert-butanol/água = 7:3.

Como observado na Figura 15, não há diferença entre a intensidade dos sinais com $g = 5,8$ (característico de Fe^{III} alto spin $S = 5/2$) entre os espectros da FeTPPS e da FeTPPS na presença de metil oleato. Ao, mesmo tempo, esse sinal tem sua amplitude diminuída quando da adição de íons nitrito, independente da presença do lipídeo insaturado, sugerindo apenas a formação da espécie

$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})(\text{NO}_2^-)$ ($\text{Fe}(\text{III})$ baixo spin, $S = \frac{1}{2}$) apenas observável a temperaturas abaixo de 15 K.^{63,64,65}

Na Figura 16 estão apresentados os espectros das reações envolvendo a hemina e o metil oleato na presença de íons nitrito. O espectro final foi registrado 24 horas após da reação.

Figura 16 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre hemina, metil oleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O_2 (B); concentrações: $[\text{hemina}] = 11,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{metil oleato}] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em (C) está o sistema apenas com a hemina e nitrito; concentrações: $[\text{hemina}] = 7,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Espectros coletados em intervalos de 30 minutos.

Comportamento similar, porém um processo mais rápido, ao do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ é observado para a hemina: quando nitrito é adicionado ao sistema observa-se o aparecimento de uma banda centrada em 358 nm possivelmente referente à associação do íon NO_2^- ao complexo hemina.⁵⁸ A análise mais detalhada do espectro eletrônico evidencia que o centro metálico da hemina não sofreu processo de redução formando $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})$ ou $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})(\text{NO})$, pois as bandas Q (na região de 550 nm a 600 nm), que são indicativo da redução da hemina^{64,65}, não mostraram

qualquer alteração no espectro eletrônico. Não há possível interação entre o lipídeo e a hemina, como mostra a Figura 16C, na qual o complexo foi deixado apenas com nitrito no meio reacional e o mesmo comportamento é notado quando o lipídeo insaturado é adicionado.

Na Figura 17 estão os resultados da análise dos produtos da reação entre hemina e metil oleato na presença de nitrito.

Figura 17 – Cromatogramas e espectros de massas obtidos por GC-MS para o produto da reação entre hemina, metil oleato e nitrito na ausência de O_2 (A), na presença de O_2 (B) e, para o metil oleato padrão (C).

Com relação aos cromatogramas, Figura 17, observa-se que o pico com tempo de retenção de aproximadamente 25 minutos atribuído ao metil oleato (veja-se espectro de massas) é consumido após a reação tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio, sugerindo uma possível reação envolvendo o precursor. Considerando que a relação m/z obtida para um dos produtos de reação (que aparece no tempo de retenção de aproximadamente 14 min) é equivalente a 281 e, a intensidade do pico referente a essa espécie não foi expressiva, as análises por GC-MS não permitiram caracterizar totalmente o produto, a reação foi promovida em larga escala para permitir o uso de outras técnicas de caracterização.

Desta forma a reação, em sistema fechado e dearado, foi efetuada em larga escala utilizando-se a hemina com complexo mediador. A formação do produto oriundo do lipídico insaturado foi inicialmente monitorada por TLC, e após doze horas de reação não foi encontrada evidência da existência do precursor metil oleato. O provável produto da reação foi então isolado por cromatografia em coluna aberta e caracterizado por infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C .

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos pela análise de IV. Como é observado na Figura 17, o produto de reação exibe uma banda larga na região entre 3400 cm^{-1} a 3000 cm^{-1} característica de estiramento da ligação O – H de ácidos carboxílicos.⁶²

Na Figura 19 está o espectro de IV para o ácido oléico da literatura.^{61,62} As mesmas bandas de estiramento são verificadas para o produto de reação e o espectro da literatura do ácido oléico.

Figura 18 – Espectro de IV para o metil oleato padrão (A) e para o produto de reação com a hemina na presença de nitrito (B).

Figura 19 – Espectro de IV para ácido oléico da literatura.⁶¹

Fonte: Integrated spectral database system for organic compounds. Fonte: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Estão apresentado na Figura 20 os espectros de RMN-¹³C e na Figura 21 os espectros de RMN-¹H para o produto de reação isolado. Cada uma delas, ainda, apresenta a estrutura da molécula, com a atribuição dos deslocamentos químicos presentes na Tabela 2 e na Tabela 3.

Figura 20 – Espectro de RMN - ^{13}C para o produto de reação entre hemina, metil oleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura (abaixo).⁵⁶

Fonte: Integrated spectral database system for organic compounds. Fonte: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Tabela 2 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN-¹³C para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil oleato.

Numeração do carbono	Deslocamento químico (δ ppm)
1	180,6
2	130,0
3	129,7
4	34,2
5	31,9
6	29,7
7	29,7
8	29,6
9	29,4
10	29,4
11	29,1
12	29,1
13	29,1
14	27,2
15	27,2
16	24,7
17	22,7
18	14,1

Os sinais a aproximadamente 80 ppm são referentes ao solvente. Nas duas figuras são adicionados os espectros encontrados na base de dados para o ácido oléico. Como é notado, os precursores somente se diferenciam dos produtos pela ausência de uma metila do éster original nos produtos de reação. Os espectros dos produtos exibem os mesmos deslocamentos químicos do ácido oléico.

Figura 21 – Espectro de RMN-¹H para o produto de reação entre hemina, metil oleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura⁶¹ (abaixo).

Fonte: Integrated spectral database system for organic compounds. Fonte: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Tabela 3 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN-¹H para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil oleato.

Numeração dos hidrogênios	Deslocamento químico (δ ppm)
1	5,34
2	2,34
3	2,01
4	1,63
5	1,35
6	1,31
7	1,27
8	0,88

Tal resultado juntamente com os espectros de IV permitem concluir que ocorreu hidrólise do éster, formando o ácido orgânico insaturado correspondente. Esse fato é confirmado pelo composto identificado no espectro de massas, com massa/carga de 281, que é correspondente ao do ácido oléico e está de acordo com os fragmentogramas reportados na literatura.^{61,62} Assim, conclui-se que provavelmente as condições ligeiramente alcalinas utilizadas para permitir a solubilização do complexo promoveram a hidrólise do éster convertendo-o a ácido oléico. Assim como nas reações utilizando a Fe^{III}TPPS, não foi observada reação de oxidação via TAO do íon nitrito coordenado para o lipídeo insaturado. Neste sentido, o substrato lipídico foi substituído por um lipídeo insaturado de maior reatividade, metil linoleato (C18:2(9,12)).

4.2.2. Metil Linoleato (C18:2(9,12))

A Figura 22 apresenta os espectros eletrônicos de absorção para a reação entre a hemina, nitrito e metil linoleato na ausência (A) e na presença de oxigênio (B). O resultado é similar àquele observado para o metil oleato que foi discutido no tópico anterior. Desta forma, o produto da reação foi isolado de modo similar ao reportado acima para o metil oleato.

Figura 22 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre hemina, metil linoleato e nitrito na ausência (A) e na presença de O_2 (B); concentrações: $[hemina] = 6,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[NO_2^-] = 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[metil \text{ linoleato}] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Espectros coletados em intervalos de 30 min.

Na Figura 23 estão os resultados da análise de produtos por espectroscopia no infravermelho e a Figura 24 mostra o espectro de infravermelho para o ácido linoléico reportado na literatura.^{61,62}

Figura 23 – Espectro de IV para o produto de reação do metil linoleato com a hemina na presença de nitrito.

Figura 24 – Espectro de IV para ácido linoléico da literatura.⁶¹

Fonte: Integrated spectral database system for organic compounds. Fonte: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Como pode se observar, o produto de reação possui as mesmas bandas de estiramento correspondentes ao ácido linoléico.

Os resultados de RMN-¹³C e RMN-¹H estão apresentados nas Figuras 25 e 26, respectivamente. A Tabela 4 e a Tabela 5 fazem a atribuição dos deslocamentos químicos para os carbonos e hidrogênios.

Figura 25 – Espectro de RMN-¹³C para o produto de reação entre hemina, metil linoleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura⁶² (abaixo).

Fonte: The Lipid Library. Fonte: <http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/1NMRdb/index.htm>

Tabela 4 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN-¹³C para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil linoleato.

Numeração do carbono	Deslocamento químico (δ ppm)
1	181,5
2	130,1
3	130,0
4	128,7
5	128,2
6	34,2
7	32,5
8	26,3
9	26,3
10	25,2
11	25,2
12	25,2
13	25,2
14	29,2
15	29,2
16	24,8
17	23,7
18	14,1

Tabela 5 – Deslocamentos químicos do espectro de RMN-¹H para o produto de reação entre hemina, nitrito e o metil linoleato.

Numeração do hidrogênio	Deslocamento químico (δ ppm)
1	O–H
2	2,33
3	1,63
4	1,10
5	2,03
6	5,58
7	2,76
8	0,91

Figura 26 – Espectro de RMN-¹H para o produto de reação entre hemina, metil linoleato e nitrito (acima) e comparação com a literatura⁶² (abaixo).

Fonte: The Lipid Library. Fonte: <http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/1NMRdbs/index.htm>

Como pode ser observado nos resultados de RMN e de IV, o produto de reação do metil linoleato é o ácido do correspondente éster, que tem origem na hidrólise do éster em função da quantidade de base no meio reacional necessária à solubilização da hemina. Para confirmar esse resultado, foi realizada a reação do

complexo Fe^{III} TPPS com o metil linoleato na presença de nitrito em sistema heterogêneo, considerando que na literatura há descrita oxidação desse lipídio com diferentes íon complexos de Fe .³¹ Optou-se por realizar a reação com o metil linoleato e não com o metil oleato, pela maior reatividade descrita na literatura³² do primeiro considerando seu maior grau de insaturação.

A Figura 27 mostra o espectro de IV para o metil linoleato padrão (A) e para o produto de reação (B) dele com a Fe^{III} TPPS e nitrito em sistema heterogêneo.

Figura 27 – Espectro de IV para o metil linoleato padrão (A) e para o produto de reação com Fe^{III} TPPS na presença de nitrito em sistema heterogêneo (B).

Adicionalmente, foram obtidos os espectros de RPE os quais são apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) FeTPPS, (B) FeTPPS e nitrito, (C) FeTPPS e metil oleato e, (D) FeTPPS, metil linoleato e nitrito. Concentrações: $[\text{FeTPPS}] = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{metil linoleato}] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$. Solvente: mistura tert-butanol/água = 7:3.

Os espectros de RPE para as reações envolvendo o metil linoleato apresentam o mesmo comportamento observado para o metil oleato, no sentido em que a presença de nitrito no meio é o fator responsável pelo desaparecimento do sinal com $g = 5,8$ referente a Fe^{III} de alto spin, que é convertido à Fe^{III} de baixo spin pela coordenação do íon nitrito (veja-se discussão anterior). Observa-se que o sinal

em $g = 5,8$ apresenta intensidade equivalente no espectro para a ferro-porfirina na ausência e na presença do lipídeo insaturado. Através da análise do espectro apresentado na Figura 28, não se observa o espectro característico da $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO})$ sugerindo que a reação de TAO do íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)$ para o substrato orgânico não ocorre nestas condições.

Como é observado nas Figuras 26 e 27, não há diferença entre o lipídeo insaturado precursor e o produto e, a Figura 28 mostra que não houve a formação da nitrosil porfirina, o que permite concluir que não acontece reação de transferência de átomo de oxigênio ou qualquer reação oxidativa com o metil linoleato nas condições dos procedimentos, não apresentando reatividade com $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e com a hemina coordenados a nitrito.

Assim, nenhum dos lipídeos insaturados utilizados apresenta reatividade para esse tipo de sistema, o que pode estar relacionado ao seu potencial de oxidação frente aos complexos investigados.

4.2.3. Cisteína e Glutathione

Heinecke e colaboradores investigaram a reação de transferência de átomo de oxigênio mediadas pelo complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ coordenado a nitrito com cisteína e glutathione.⁵⁷ Os mesmos autores através de uma análise cinética preliminar propuseram o mecanismo descrito no Esquema 1 e reportaram a constante de associação da cisteína com o íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ ($K = 2,8 \cdot 10^{-3} \text{ L mol}^{-1}$). Ao mesmo tempo, reportaram espectro de RPE o qual atribuíram a formação de um complexo resultante da associação da ferro-porfirina com a cisteína, representada por $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{RS}^-)$, fato este não evidenciado em nossas condições experimentais. Com intuito de uma melhor compreensão desta reação de TAO do íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)$ para a cisteína e outros tióis de relevância biológica, efetuamos investigações adicionais tais como a influência da presença de oxigênio molecular no meio reacional e investigamos a reatividade da cisteína presente na cadeia lateral das proteínas BSA e beta-lactoglobulina e exposta ao solvente.

A Figura 29 apresenta os espectros eletrônicos de absorção para a reação entre o íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, nitrito e cisteína na ausência de oxigênio (A) e na presença de oxigênio molecular (B). Na mesma figura são destacados os detalhes

das bandas Q. Como pode ser observado, no sistema isento de O₂, há um decaimento da banda centrada em 393 nm correspondente ao íon complexo Fe^{III}TPPS acompanhado por um simultâneo aparecimento de uma banda centrada em 413 nm correspondente à formação do íon complexo Fe^{II}TPPS(NO). Nota-se ainda um ponto isosbéstico em 403 nm. A banda Q centrada em 598 nm, característica do íon complexo Fe^{III}TPPS dá lugar ao aparecimento da banda centrada em 543 nm. Tanto a banda Soret centrada em 413 nm quanto a banda centrada em 543 nm são características da nitrosilporfirina Fe^{II}(TPPS)(NO).⁵⁷ Não foi observada, na presente condição experimental, a redução do íon complexo Fe^{III}TPPS na ausência de íons nitrito. Na ausência de íons e presença de tióis RSH observa-se um deslocamento na banda Soret de 393 nm para 417 nm com ponto isosbéstico em 408 nm sugerindo uma reação direta formando o íon complexo Fe^{III}(TPPS)(RS⁻) reportado por Heinecke.⁵⁷

Ainda, com o intuito de investigar a influência da presença de oxigênio molecular, a reação foi realizada em sistema fechado e, após a banda centrada em 413 nm atingir absorvância máxima, ou seja a reação se completou, o sistema foi aberto e, os espectros eletrônicos de absorção foram registrados em intervalos de 2 minutos durante 60 minutos (Figura 29C).

Figura 29 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III}TPPS, cisteína (cys) e nitrito na ausência (A), na presença de O₂ (B) e abertura do sistema (C). Concentrações: [Fe^{III}TPPS] = 8,9 10⁻⁶ mol L⁻¹; [NO₂⁻] = 10,0 10⁻³ mol L⁻¹; [cys] = 0,5 10⁻³ mol L⁻¹. Solução fosfato 10 mM pH 5,8.

A Figura 30 apresenta os resultados da reação entre o íon complexo Fe^{III} TPPS, glutationa e nitrito na presença (A) e ausência de O_2 molecular (B), e na exposição do sistema reacional ao oxigênio molecular após a reação ter se completado (C). É importante mencionar que observa-se comportamento idêntico ao apresentado para a reação com a cisteína.

Figura 30 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, glutatona (GSH) e nitrito na ausência (A), na presença de O_2 (B) e quando o sistema é aberto (C). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Solução fosfato 10 mM pH 5,8.

Como observado nas Figuras 29B e 30B a presença de oxigênio molecular é um fator influente na reação. Os tióis cisteína e glutathiona são facilmente oxidáveis pelo oxigênio molecular do meio na presença de metais de transição, tal como o ferro.⁷² Assim, nos sistemas abertos, uma oxidação dos tióis paralela à da reação de TAO pode ocorrer via O_2 presente na solução, reduzindo a quantidade de substrato disponível para participar efetivamente da reação de TAO com o íon complexo $Fe^{III}TPPS(NO_2^-)$. Esse é um fator limitante e com efeito mais pronunciado na reação com a glutathiona, como notado na Figura 29B em que a formação da nitrosilporfirina não chega a ser expressiva e, a quantidade total de $Fe^{III}TPPS$ inicial pouco se altera (Figura 30B). Outro processo que limita a reação de TAO na presença de O_2 é a oxidação da nitrosilporfirina ($Fe^{II}TPPS(NO)$) pelo oxigênio em solução. Assim, paralelamente à reação de TAO que forma $Fe^{II}TPPS(NO)$, ocorre a oxidação da mesma espécie regenerando o íon complexo $Fe^{III}TPPS$ (Esquema 1) que passa a ser o íon complexo em maior concentração. Para confirmar a sensibilidade da $Fe^{II}TPPS(NO)$ à presença de oxigênio, os sistemas, após a completa reação de TAO, foram abertos e, como observado nas Figuras 29C e 30C, ocorre a regeneração da $Fe^{III}(TPPS)$, pois o contato com o O_2 faz com que a ferro-porfirina nitrosilada seja oxidada, provavelmente, com concomitante liberação de NO (Esquema 1), peroxinitrito ou nitrato.²³

As reações acima apresentadas tiveram sua cinética investigada por Heinecke e colaboradores.⁷³ Foi verificado que a reação de TAO do íon nitrito para tióis mediada pelo íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ tem sua velocidade influenciada pela concentração de íons nitrito. Nos momentos iniciais da reação, a velocidade de reação apresentou uma dependência linear à $[\text{NO}_2^-]$, que foi variada entre 1,0 e 10,0 mM nos experimentos para avaliar essa dependência. Ao mesmo tempo, foi constatado que a velocidade da reação é praticamente independente de $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]$, sendo que esse íon complexo pode ser considerado um catalisador do processo. O mecanismo de TAO para Cys e GSH proposto ocorre via formação prévia do íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)$. Considerando as alterações dos substratos, o mecanismo proposto pelos mesmos autores, ainda, sugere que os produtos iniciais da TAO do íon nitrito coordenado para os tióis correspondem a ácidos sulfênicos $\text{RS}(\text{O})\text{H}$, que seqüencialmente reagem com tióis livres remanescentes no meio reacional para formar os respectivos dissulfetos. Ainda, foi proposto que a reação de TAO para os tióis estudados é de pseudo-primeira ordem relativamente à concentração de íon nitrito. Considerando esta última alternativa, experimentos foram executados com a concentração de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ constante em 8,7 μM e de substrato em 1,0 mM e variando a concentração do íon nitrito de 1,0 mM a 10,0 mM, visando monitorar o crescimento da absorbância da banda centrada em 413 nm referente à formação do íon complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$.

São apresentados na Figura 31 os gráficos de absorbância versus tempo para a reação de TAO com a cisteína em diferentes concentrações de nitrito (à esquerda) e de constantes de velocidades observada (k_{obs}) versus concentração de íon nitrito (à direita). As constantes de velocidade observadas foram determinadas utilizando o método de ajuste não linear ao gráfico da Figura 31. Obtendo-se o coeficiente angular da reta do gráfico de k_{obs} versus $[\text{NO}_2^-]$ pode-se determinar a constante de velocidade bimolecular para as reações de TAO do íon nitrito coordenado para o tiol.

Como observado da Figura 31, obtém-se uma boa aproximação linear entre a concentração de nitrito e k_{obs} versus $[\text{NO}_2^-]$ da reação de TAO envolvendo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$ e cisteína na presença de íons nitrito. A constante de velocidade bimolecular obtida foi de $20,76 \pm 2,40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo a velocidade de formação da $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO})$ expressa pela equação $v = 20,76 \pm 2,40 (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}) \times [\text{NO}_2^-]$.

Figura 31 – Traços cinéticos para a formação da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ a 413 nm a partir da reação de OAT entre $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$, cisteína e nitrito a diferentes concentrações de nitrito e velocidades iniciais da reação em função da concentração de nitrito. Concentrações fixas: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{cisteína}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 32 apresenta o gráfico de absorvância *versus* tempo correspondente à formação do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO})$ a partir da reação de TAO do nitrito coordenado a $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$ para a glutatona e o gráfico de k_{obs} *versus* $[\text{NO}_2^-]$ envolvido na determinação da constante de velocidade de reação. Com os dados, foi obtido o valor para constante de velocidade bimolecular de $9,27 \pm 0,62 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo que a velocidade de reação de formação da nitrosil porfirina pode ser expressa por $v = 9,27 \pm 0,62 (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}) \times [\text{NO}_2^-]$.

Figura 32 – Traços cinéticos para a formação da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ a 413 nm a partir de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$, nitrito e glutatona e velocidades iniciais da reação em função da concentração de nitrito. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Comparando o resultado obtido com a proposta de que a reação de TAO para os tióis é de pseudo-primeira ordem em relação a $[\text{NO}_2^-]$ ⁵⁷, pode-se notar que há uma boa aproximação dos resultados e, as constantes de velocidade das reações com a cisteína e glutathione possuem valores muito próximos, sugerindo que seu comportamento reativo frente à TAO segue o mecanismo proposto. Tal fato é confirmado quando se analisa a dependência da velocidade com relação à quantidade de substrato. Heinecke et al.⁷³ investigaram o mecanismo da reação de TAO pela abordagem dos equilíbrios químicos presentes no sistema de maneira a determinar a dependência da velocidade de reação relativamente à concentração dos substratos. Foi observado que há uma tendência linear a essa dependência em concentrações de RSH na faixa de 0,001 mM a 1,0 mM, isto é, apenas para baixas concentrações de ordem sub-milimolar. Tal pressuposto está baseado no fato de que há um equilíbrio competitivo referente à associação do tiol ao íon complexo FeTPPS, de maneira a formar $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{RS}^-)$, cuja constante de associação Fe-porfirina–RSH foi determinada com valor de $230 \pm 50 \text{ M}^{-1}$, quando o tiol utilizado foi a cisteína. No mesmo trabalho, há relato da dependência dessa reação com a concentração hidrogeniônica do meio reacional.

Considerando que a reação também é de primeira ordem em relação à concentração de substrato, foi analisada a dependência da velocidade a diferentes concentrações de substrato. Foi observada a tendência de velocidade de reações de TAO para a glutathione variando as concentrações de substrato entre 1,8 mM e 10 mM, considerando uma reação de pseudo-primeira ordem em relação à $[\text{GSH}]$. Nessa faixa de concentração, não houve uma boa aproximação pelo uso da Equação 1. Além disso, não há alteração significativa das constantes aparentes de velocidade (k_{obs}), não viabilizando a obtenção de uma relação linear entre k_{obs} e $[\text{GSH}]$, o que sugere que essa faixa de concentração não é adequada para estudar a influência de $[\text{RSH}]$ sobre a velocidade de reação. Dessa maneira, seguindo o mecanismo proposto na literatura⁷³, foram realizados experimentos avaliando a dependência da reação em relação à concentração de substrato para cisteína e glutathione, com os resultados apresentados nas Figuras 34 e 35, respectivamente. As constantes de velocidade obtidas foram de $159,28 \pm 13,07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $148,04 \pm 12,81 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para cisteína e glutathione, respectivamente.

Figura 33 – Traços cinéticos para a formação da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ a 413 nm a partir de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$, nitrito e cisteína e velocidades iniciais da reação em função da concentração de cisteína. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 34 – Traços cinéticos para a formação da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ a 413 nm a partir de $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})$, nitrito e glutatona e velocidades iniciais da reação em função da concentração de glutatona. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Com esses resultados e os mecanismos propostos foram tomadas as seguintes considerações, de maneira a determinar as constantes de velocidade de reação de transferência de átomo de oxigênio:

- Equilíbrios inerentes ao sistema:

Onde:

K_{nitrito} = constante de associação do nitrito ao íon complexo (determinado na literatura, pH 5,81);

k_{TAO} = constante de velocidade de reação de transferência de átomo de oxigênio ao substrato S.

- Lei de velocidade:

$$v_{\text{TAO}} = d[\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})]/dt$$

Onde:

v_{TAO} = velocidade de reação de transferência de átomo de oxigênio ao substrato S;
 $d[\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})]/dt$ = taxa de formação de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ no tempo.

- Concentrações no sistema e relações:

$$\text{Se,} \quad [\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})] = k_{\text{TAO}} [\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)] [\text{S}]$$

$$v_{\text{TAO}} = d[\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})]/dt = k_{\text{TAO}} [\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)] [\text{S}]$$

$$\text{Mas como,} \quad d[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)]/dt = k_{\text{nitrito}} [\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] [\text{NO}_2^-]$$

$$\text{segue que} \quad v_{\text{TAO}} = k_{\text{TAO}} K_{\text{nitrito}} [\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] [\text{NO}_2^-] [\text{S}]$$

Mas como nos experimentos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]$ é muito baixa, o complexo atua apenas como catalisador, portanto a velocidade independe da concentração do íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e, a seguinte aproximação pode ser feita:

$$v_{\text{TAO}} = k_{\text{TAO}} k_{\text{nitrito}} [\text{NO}_2^-] [\text{S}]$$

Dessa forma, a velocidade de reação pode ser expressa em termos das concentrações de íons nitrito e do substrato. Considerando os dados obtidos nos experimentos variando as concentrações de íons nitrito e de substrato apresentados nas Figuras 32, 33, 34 e 35, que $k_{\text{nitrito}} = 3 \text{ M}^{-1}$ foram calculadas as constantes de velocidade para a reação de transferência de átomo de oxigênio k_{TAO} para cisteína e glutathione e os resultados são apresentados na Tabela 6. É importante mencionar que não foi observada alteração ou qualquer variação na concentração hidrogênica do meio reacional.

Tabela 6 – Constantes de velocidade para a reação de transferência de átomo de oxigênio a 25° C em solução fosfato 50 mM pH 5,8.

substrato	$k_{\text{TAO}}^a \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{\text{TAO}}^b \text{ (s}^{-1}\text{)}$
cys	$6,91 \cdot 10^3$	$5,30 \cdot 10^3$
GSH	$3,09 \cdot 10^3$	$4,93 \cdot 10^3$

^a [S] = constante = 1,0 mM; ^b $[\text{NO}_2^-]$ = constante = 10,0 mM

Ainda considerando o monitoramento das alterações do complexo em função da ocorrência da reação de OAT nos sistemas estudados, foram feitas reações em condições propícias para serem analisadas por RPE.

A Figura 35 traz os espectros de RPE para a Fe^{III} TPPS e o sistema reacional envolvendo a cisteína, sendo consideradas duas regiões: 600,0 G a 2000,0 G e 2800,0 G a 4000,0 G. Na Figura 36 são apresentados os espectros de RPE para a Fe^{III} TPPS e as reações envolvendo a glutathiona. Tanto na Figura 35 quanto na Figura 36, as amostras foram congeladas 5 minutos após o início da mistura de reagentes.

Figura 35 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e cisteína; (C) Fe^{III} TPPS, cisteína e nitrito.

Figura 36 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e glutatona; (C) Fe^{III} TPPS, glutatona e nitrito.

Na Figura 35 nota-se que os sistemas com cisteína o sinal característico de ferro alto spin e $g = 5,8$ desaparece. No sistema que contém nitrito, a Fe^{III} TPPS foi reduzida a Fe^{II} TPPS(NO) e isso justifica a ausência do sinal com $g = 5,8$. Ao mesmo tempo, nota-se a formação do espectro característico do complexo Fe^{II} TPPS(NO) na região entre 2800,0 G a 4000,0 G. O espectro é razoavelmente anisotrópico com valores de g (g_1 , g_2 e g_3) característicos de um complexo Fe^{II} (P)(NO) pentacoordenado.^{63,64} Observam-se na região de alto campo três linhas hiperfinas centradas a $g = 2,012$ com uma constante hiperfina $A = 2.15$ mT devido à interação

de um elétron desemparelhado com um momento magnético nuclear de um átomo de nitrogênio ^{14}N ($I=1$) do NO coordenado no complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$.⁶⁵ O mesmo não é observado em relação ao sistema com glutathiona e nitrito (Figura 36). Neste caso, o sinal característico de Fe^{III} ainda persiste, apesar de também aparecer o espectro característico da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$. Assim, pode ser que a reação apesar de completa, na presença de O_2 (considerando que o sistema não estava fechado) tenha oxidado parte da porfirina nitrolisada à $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ assim como demonstrado pelo espectro eletrônico de absorção da Figura 30C.

Tanto para cisteína quanto para glutathiona, quando o íon nitrito está ausente, nenhum sinal é observado na região de alto campo (2800,0 G a 4000,0 G). Nesses sistemas, considerando a região de 600,0 G a 2000,0 G, aparece apenas o sinal de $g = 4,3$.

Em continuidade às análises por RPE, foram feitos experimentos visando à determinação de parâmetros cinéticos das reações de TAO. Soluções (com 25% de etilenoglicol) contendo $1,2 \cdot 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e $10,0 \cdot 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrito foram congeladas em diferentes intervalos de tempo após a adição de $1,0 \cdot 10^3 \text{ mol L}^{-1}$ do respectivo tiol (cisteína ou glutathiona) e então obtidos os espectros de RPE. Os sistemas foram mantidos abertos para permitir que a intensidade do sinal com $g = 5,8$ fosse mensurável.

Considerando a existência da transição um estado inicial de alto spin relativo a Fe^{III} penta ou hexacoordenado⁶³ para um estado final característico de um sistema $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})$ que fornece um padrão característico de sinais, medindo as intensidades desses sinais nos diferentes intervalos de tempo considerados, pode-se determinar a constante de velocidade de reação.⁶⁶ Para cada tempo intermediário de reação pode ser calculada uma razão entre a amplitude do sinal do estado inicial (H_0) e a amplitude do estado final (L_0), nomeada R_0 , tal que, para uma reação que segue uma cinética de primeira ordem, as seguintes regras são obedecidas:

$$R(t) = H(t) / (L(t))$$

$$h(t) = R(t) / (R_0 + R(t)) = \exp(-k t)$$

$$l(t) = R_0 / (R_0 + R(t)) = 1 - \exp(-k t)$$

Com essas regras, é estabelecida uma relação entre os dois sinais característicos atribuídos à alteração no complexo, que estão apresentados na Figura 37(A) e (B), respectivamente.

Figura 37 – Espectros de RPE para o estado inicial da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ (A) e para o estado final da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$, com a indicação das amplitudes dos sinais representadas por H_0 e L_0 .

A Figura 38 apresenta os espectros de RPE para soluções da reação de TAO com a cisteína como substrato, congeladas em diferentes intervalos de tempo a temperatura de 77K. Como pode ser observado pela análise dos espectros de RPE, há pouca variação na intensidade do sinal com $g = 5,8$ na região de 600,0–2000,0 G, mas é significativa a alteração do espectro de RPE na região de 2800,0–4000,0 G,

na qual nota-se a formação do espectro característico da nitrosilporfirina; o padrão de hiperfinas pode ser visualizado em 45 segundos após o início da reação e, a intensidade dos sinais aumenta conforme aumenta o tempo, indicando que a concentração do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ é maior nos tempos maiores, isto é, parte do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ com nitrito coordenado é reduzida à nitrosilporfirina.

Figura 38 – Detalhes dos espectros de RPE nas regiões de (A) 600,0–2000,0 G e (B) 2800,0–4000,0 G para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, cisteína e nitrito, com tempos de reação de 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos e 3 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{cys}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

A Figura 39 traz os espectros de RPE de soluções congeladas em diferentes tempos após adição de glutatona a sistemas contendo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e NO_2^- . As mesmas alterações observadas nos sistemas contendo cisteína ocorrem.

Dos resultados das Figuras 38 e 39 e das relações apresentadas anteriormente, foram determinadas as constantes de velocidade k_{obs} da reação de OAT de $2,91 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $3,33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para Cys e GSH, respectivamente. Os resultados são apresentados na Figura 40.

Figura 39 – Detalhes dos espectros de RPE nas regiões de (A) 600,0–2000,0 G e (B) 2800,0–4000,0 G para Fe^{III} TPPS, cisteína e nitrito, com tempos de reação de 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos e 5 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{GSH}] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 40 – Gráficos de $-\ln[R_t/(R_0+R_t)]$ vs. tempo partir da reação de OAT entre Fe^{III} (TPPS), nitrito e (A) cisteína ou (B) glutathiona. Medidas obtidas por espectroscopia paramagnética de elétrons a 77 K. Soluções congeladas em diferentes tempos de reação. Concentrações fixas: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}]_{\text{inicial}} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{RSH}] = [\text{NO}_2^-] = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Mistura 3:1 = tampão fosfato 10 mM (pH=5,8) / etilenoglicol (v/v).

Além das alterações no complexo que podem ser avaliadas por métodos espectroscópicos, faz-se necessário desenvolver análises que revelem as mudanças nos substratos submetidos à oxidação via OAT. A cromatografia em fase líquida hifenada à espectrometria de massas permitiu a caracterização dos produtos de reação tanto originados pela oxidação dos tióis precursores quanto formados por meio de reações paralelas.

De modo a confirmar a transferência de átomo de oxigênio do íon nitrito coordenado aos tióis formando espécies RS(O)H , foram realizadas reações na presença de dimedona (5,5-dimetilciclohexano-1,3-diona), que reage especificamente com ácidos sulfênicos^{67,68,69} via reação de adição de Michael.

As reações realizadas na presença de dimedona não alteram as alterações no complexo monitoradas pelos métodos espectroscópicos descritos, mas a dimedona intercepta as espécies RS(O)H , que venham a reagir com os tióis RSH para formar RS-SR . O Esquema 2 ilustra o processo. Assim, a identificação do aduto tiol-quinona pela técnica de HPLC-ESI-MS permite comprovar a ocorrência da reação de TAO.

Esquema 2 – Oxidação do tiol via TAO resultando na formação de ácidos sulfênicos que são interceptados pela dimedona e/ou que reagem com os tióis em excesso do meio reacional formando dissulfetos.

Na Figura 41 estão os resultados das análises dos produtos de reação de TAO para glutathione por HPLC-ESI-MS, com o espectrômetro de massas operando no modo de detecção de íons positivo. Foram identificadas três espécies nos tempos de retenção de 2,7 minutos, 4,5 minutos e 16,1 minutos, com m/z identificados de 613, 337 e 445, respectivamente.

Figura 41 – (a) Cromatograma total de íons das amostras com o produto de reação de TAO com glutathiona como substrato (preto) e com o produto de reação de TAO com glutathiona como substrato na presença de dimedona (vermelho). (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutathiona oxidada). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2 (GSNO). (d) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 3 (aduto do ácido sulfênico GS(O)H com a dimedona).

A transferência de átomo de oxigênio do complexo de ferro com nitrito coordenado $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}(\text{NO}_2^-)$ para o tiol RSH inicialmente forma $\text{RS}(\text{O})\text{H}$ que são sensíveis ao excesso de tiol do meio reacional, formando os correspondentes dissulfetos RS-SR . Concomitantemente a esse processo, ocorre a redução da ferro-

porfirina a $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$, que na presença de O_2 é oxidada, regenerando a $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ e liberando NO . Ainda, durante o processo, são geradas espécies nitrosantes (considerando o excesso de nitrito do meio reacional) capazes de nitrosilar os tióis produzindo espécies RSNO .^{23,70} Tais hipóteses são confirmadas pela análise dos dados obtidos por HPLC-ESI-MS. Para as reações com a glutatona como substrato, o dissulfeto formado identificado foi a glutatona oxidada GSSG , que aparece com tempo de retenção de 2,7 minutos e apresenta espectro de massas com íon pseudo-molecular com m/z 613 e idêntico ao padrão analítico (Apêndice 1). Uma espécie com m/z 337 e tempo de retenção de 4,5 minutos foi atribuída ao produto de reação da nitrosação da glutatona GSNO , como ilustra o Esquema 3.

Esquema 3 – Ciclo catalítico proposto para reações de transferência de átomo de oxigênio a partir de complexos do tipo $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{P})\text{NO}_2^-$ com formação de espécies nitrosantes e, concomitante formação de espécies nitrosiladas. Adaptado de Heinecke et al. 2010.

Fonte: KHIN, C.; HEINECKE, J.; FORD, P. C. Oxygen Atom Transfer from Nitrite Mediated by $\text{Fe}(\text{III})$ Porphyrins in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130 (42), 13830–13831, 2008.

Foram efetuadas análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas tanto dos padrões analíticos dos precursores bem como dos possíveis produtos de reação e das respectivas soluções, nomeadas controles, para que as atribuições feitas às espécies detectadas fossem inequívocas (Apêndice 1).

Adicionalmente à reação com a cisteína, o complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ foi substituído pela mioglobina para verificar se é possível a ocorrência da reação de TAO.

A Figura 42 apresenta o espectro eletrônico para a reação entre a mioglobina, nitrito e a cisteína; ela considera duas regiões diferentes do espectro e, portanto, houve a necessidade de se trabalhar com concentrações diferentes de mioglobina a fim visualizar as duas regiões. Como pode ser observado, não há diferença entre o espectro eletrônico de absorção para a solução contendo apenas a mioglobina e íon nitrito e aquele obtido para mioglobina com nitrito e adição de cisteína. Está ocorrendo a formação de $\text{metMb}^{\text{III}}(\text{NO}_2^-)$, pois não o espectro não revela formação da Mb^{II} que se caracteriza por bandas com máximos de absorção centrados em 540 nm e 577 nm⁷¹ e além disso, o espectro está de acordo com a literatura^{72, 74}.

Diversos relatos na literatura mostraram que a cisteína é incapaz de reduzir a $\text{metMb}^{\text{III}}$ a Mb^{II} , apesar de reagir com seus estados hipervalentes (ferril e perferril mioglobina).^{72,74} Isso ocorre pela ausência de um resíduo de cisteína na mioglobina aqui investigada, isolada do coração do cavalo, que tem um papel essencial na redução do ferro heme da Mb. Este resíduo de cisteína atua como “ponte” para a transferência de elétrons em processos redox envolvendo o centro metálico da metaloproteína. A mioglobina humana possui esse resíduo de cisteína e, isso confere a ela propriedades diferenciadas em relação à Mb bovina. Hirota et. al. exploraram a redução do grupo heme de mioglobinas mutantes através de transferência intermolecular de elétrons sob atmosfera de monóxido de carbono.⁷⁵ Os autores concluíram que a existência de uma cisteína nessas mioglobinas mutantes, bem como sua distância relativa ao grupo heme da proteína, é influente na redução do grupo heme por CO. Em analogia com o nosso sistema, a ausência da cisteína na mioglobina impede que um elétron seja transferido à proteína com o nitrito coordenado, reduzindo o grupo heme e, ao mesmo tempo, que a não acessibilidade da cisteína ao bolsão hidrofóbico contendo o grupo heme impede a oxidação do substrato via TAO.

Figura 42 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre mioglobina, cisteína (cys) e nitrito na ausência de O_2 . Concentrações: $[Mb] = 7,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A), $25,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B); $[NO_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[cys] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.4. Ácido dihidrolipóico

Romero et. al. reportam a redução da mioglobina com emprego do ácido dihidrolipóico como redutor.⁷⁶ Estão apresentados na Figura 43 os espectros eletrônicos de absorção para a reação envolvendo o íon complexo $Fe^{III}TPPS$, o íon nitrito e o ácido dihidrolipóico (DHHLA) na ausência de oxigênio (A) e apos a exposição do sistema ao ar atmosférico (B). A reação efetuada na presença de oxigênio permitiu que se obtivesse um espectro idêntico àquele feito na ausência de O_2 , por isso o seu resultado foi omitido.

Figura 43 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre $Fe^{III}TPPS$, ácido dihidrolipóico e nitrito na ausência de O_2 (A) e com abertura do sistema (B). Concentrações: $[Fe^{III}TPPS] = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[NO_2^-] = 10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[DHHLA] = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado na Figura 43A, imediatamente após o contato do ácido dihidrolipóico com o complexo na presença de nitrito, ocorre a formação de uma banda centrada em 413 nm que como será mostrado na Figura 44 (que exhibe os espectros de RPE) corresponde ao complexo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$. Através da análise da Figura 44B, nota-se que similarmente à cisteína e à glutatona, o oxigênio é um fator influente e faz com que ocorra a reação posterior de regeneração do íon complexo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$ pela oxidação da nitrosilporfirina ocorra assim que o sistema é aberto.

Considerando que a reação monitorada por espectroscopia na região do UV-Vis foi rápida o suficiente para não permitir determinação de constantes de velocidade, as amostras submetidas à análise por RPE foram congeladas em diferentes tempos de reação para eventual possibilidade de acompanhar as mudanças do sistema em função do tempo de reação. Assim, na Figura 44 são apresentados os espectros de RPE para a reação entre $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, nitrito e o ácido dihidrolipóico, considerando as regiões entre 600,0 G a 2000,0 G e 2800,0 G a 4000,0 G e considerando diferentes tempos de reação. As amostras foram congeladas 3 segundos, 5 minutos e 10 minutos após a mistura inicial dos reagentes.

Figura 44 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0-2000,0G (A) e na região de 2800,0-4000,0 G (B) para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, ácido dihidrolipóico e nitrito, com tempos de reação de 3 segundos, 5 minutos e 10 minutos. Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2] = 9,4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{DHLLA}] = 4,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

De modo geral, não há diferença significativa entre os espectros de 5 minutos a 10 minutos nas duas regiões. Assim como nos casos anteriores, nota-se a formação da $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$ com seu espectro característico na região de alto campo. Entretanto, com apenas 3 segundos de reação, nota-se que as hiperfinas apresentam uma pequena diferença relativamente aos maiores tempos de formação, o que sugere que nesse tempo pode ter uma mistura de espécies. Na região de 600,0 G a 2000,0 G também nota-se diferenciação da reação congelada com 3 segundos em relação aos outros tempos, sobretudo na intensidade do sinal com $g = 4,3$ que é bem maior em relação aos tempos maiores. Em nenhum dos espectros verifica-se o sinal com $g = 5,8$ correspondente à $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, indicando que apesar do contato com oxigênio, a oxidação da $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{P})(\text{NO})$ é menos pronunciada que no caso das reações com cisteína e glutathione, isto é, o complexo reduzido e nitrosilado fica menos sensível à presença de O_2 . Tal evidência é confirmada pelo espectro de UV-vis apresentado na Figura 43B, onde nota-se que não há completa regeneração da $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, pois a concentração final desta, quando o sistema é aberto, é inferior à concentração original ao início da reação. Além disso, considerando que a reação realizada na presença de oxigênio apresenta comportamento similar àquela realizada em sistema fechado, pode-se considerar que esse tipo de sistema é menos sensível à presença de O_2 e isso pode ser justificado pelo fato do ácido

dihidrolipóico ser um eficiente antioxidante e, provavelmente pode estar atuando na inibição da autooxidação do complexo $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO})$.^{77,78}

Os produtos de reação foram analisados por HPLC-ESI-MS. A Figura 45 apresenta o cromatograma e os espectros de massas obtidos no modo de detecção negativa de íons com as respectivas espécies identificadas.

Figura 45 – (a) Cromatograma total de íons das amostras com o ácido dihidrolipóico padrão (preto), com os produtos de reação de TAO com o ácido dihidrolipóico como substrato (vermelho) e com o produto de reação de TAO com o ácido dihidrolipóico como substrato na presença de dimedona (azul). (b) Espectro de massas (ESI(-)MS) da espécie 1 (ácido dihidrolipóico). (c) Espectro de massas (ESI(-)MS) da espécie 2 (ácido dihidrolipóico oxidado). (d) Espectro de massas (ESI(-)MS) da espécie 3 (aduto do ácido sulfênico DAcidS(O)H com a dimedona). (e) Espectro de massas (ESI(-)MS) da espécie 4.

Como pode ser observado na Figura 46, o ácido dihidrolipóico foi identificado como a espécie 1, com tempo de retenção de aproximadamente 21,4 minutos no cromatograma de íon total e com íon pseudo-molecular de m/z 207 no espectro de massas (ESI(-)MS). A análise dos produtos de reação permitiu identificar o dihidrolipoato (ácido dihidrolipóico oxidado) como produto da oxidação do ácido dihidrolipóico das reações de TAO na presença e na ausência de dimedona. O dihidrolipoato é o único produto identificado na reação de TAO na ausência de dimedona e, majoritário da reação na presença de dimedona. Para esta reação, ainda, foi identificado o aduto formado pela reação do ácido dihidrolipóico com a dimedona apresentando íon pseudo-molecular com m/z 346 eluindo com 21,0 minutos. Uma outra espécie aparece no tempo de eluição de 13,2 minutos com espectro de massas apresentando o íon com m/z 292, esta espécie aparece somente na reação na presença de dimedona e não foi possível até o momento de identificação.

Conhecendo-se ainda, o potencial para redução do centro metálico, íon de Fe^{3+} , da metMb a Fe^{2+} , o complexo FeTPPS foi substituído pela mioglobina e, foram analisadas as reações entre Mb e ácido dihidrolipóico, na presença de nitrito, em solução com 50 mM de fosfato pH 5,8 e na ausência de oxigênio. Os resultados das análises dessas reações por espectroscopia eletrônica de absorção na região do UV-Vis são apresentados na Figura 46. Como observado, quando nitrito de sódio é adicionado à uma solução de metMb o espectro eletrônico de absorção sofre uma leve alteração no sentido de formação de uma banda centrada em 356 nm e outra

em 574 nm (Figura 46B) referentes à formação da espécie resultante da coordenação do íon nitrito à mioglobina, representada por $\text{metMb}(\text{NO}_2^-)$.⁷⁹ Wanat et al. estudaram a formação da $\text{metMb}(\text{NO}_2^-)$ a partir da reação reversível da metmioglobina com nitrito em pH neutro, sendo a constante de velocidade de associação do NO_2^- ao centro metálico determinada com valor de $156 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, considerando uma reação de pseudo-primeira ordem em relação à concentração de nitrito.⁷⁹ Os mesmos autores, determinaram a razão entre a constante de associação e dissociação como sendo de 60 mol L^{-1} , o que sugere que no sistema de trabalho à coordenação do nitrito ao centro metálico da proteína antecede a reação de TAO.

Quando da adição do ácido dihidrolipóico a uma solução de Mb contendo nitrito, as bandas características da metMb na região de 450 nm a 700 nm (máximo a 502 nm, Figura 46A) não mais aparecem, sendo as mesmas substituídas por um espectro eletrônico com dois máximos de absorção em 542 nm e 580 nm, similares ao espectro eletrônico de absorção da espécie nitrosilmioglobina ($\text{Mb}(\text{NO})$). Esta última espécie corresponde à mioglobina com o íon de ferro complexado ao grupo heme no estado de oxidação Fe^{2+} e com o ligante NO em sua esfera de coordenação.

Figura 46 – Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (azul), metMb na presença de nitrito com DHLA adicionado em $t=1$ min (verde), metMb na presença de nitrito com DHLA adicionado em $t=20$ min (vermelho). Concentrações: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 36,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{final}} = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{DHLA}]_{\text{inicial}} = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

O complexo $\text{Mb}(\text{NO})$ pode ser formado a partir da $\text{metMb}(\text{NO}_2^-)$ pela transferência de um átomo de oxigênio dessa última espécie ao ácido dihidrolipóico, reduzindo o íon de Fe^{3+} para Fe^{2+} sob um mecanismo de TAO. Contudo, o espectro

eletrônico da espécie Mb(NO) é idêntico ao da espécie oximioglobina (MbO₂), que pode ser formada pela direta redução do centro metálico de ferro heme pelo ácido dihidrolipóico, na presença de oxigênio.⁷⁵ Para validar a ausência de O₂ durante o processamento das reações e, assegurar que a o espectro eletrônico de absorção verificado é realmente atribuído à formação da Mb(NO) através de reação de TAO, foram obtidos espectros de RPE de uma solução contendo Mb e nitrito à qual foi adicionado o DHLA (mantendo o sistema isento de O₂) e congelada 1 minuto após a mistura. O espectro de RPE obtido está apresentado na Figura 47, na qual pode ser observado o espectro característico da Mb(NO) com seu padrão de hiperfinas característico com valor g de aproximadamente 2,012, que ocorre devido à interação do elétron desemparelhado com o spin nuclear do nitrogênio (*I*=1).^{65,80}

Figura 47 – Espectro de RPE na região de 600-4000G para Mb, ácido dihidrolipóico e nitrito em tampão na ausência de O₂. Concentrações: [Mb] = 0,8 10⁻³ mol.L⁻¹; [NO₂⁻] = 10,0 10⁻³ mol.L⁻¹; [DHLA] = 0,1 10⁻³ mol.L⁻¹.

Ao contrário da FeTPPS, que apresenta sinais com g=5,8 referente ao íon Fe³⁺, a Mb apenas exibe esse sinal à temperatura do hélio líquido (4K)⁸⁰; portanto, nas condições analisadas, não foram obtidos sinais nas regiões de 600,0 G a 2000,0 G.

Desta forma podemos concluir que a mioglobina reage com o DHLA na presença de nitrito via TAO e, isso está diretamente relacionado à capacidade de interação dessa molécula com o grupo heme da mioglobina. A Tabela 7 apresenta

os potenciais dos tióis investigados nas reações de TAO e algumas propriedades reativas dos mesmos frente à mioglobina nos seus diferentes estados redox.

Tabela 7. Constantes de velocidade para reações de tióis com diferentes estados redox da mioglobina.⁷⁶

Tiol	E (–SH/–SS–) (mV)	Transições redox para a mioglobina		
		Mb ^{IV} → Mb ^{III}	Mb ^{III} → Mb ^{II}	Mb ^{IV} → Mb ^{II}
DHLA	-320		2,47±0,34 10 ³	1,85±0,19 10 ³
Cys	-220	2,19±0,28 10 ⁵	ND	ND
GSH	-240	1,09±0,17 10 ⁴	ND	ND

Fonte: Romero et al. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267(3), p. 1680-1688, 1992.

Como pode ser observado, o potencial de redução do DHLA é próximo aos demais substratos analisados, entretanto somente o DHLA apresenta reatividade para reduzir a metMb ou a ferrilmioglobina à MbFe^{II}. Analogamente, somente esse substrato consegue reduzir a espécie MbFe^{III}(NO₂⁻), viabilizando a transferência de átomo de oxigênio do nitrito coordenado à proteína.

A Figura 48 apresenta o estudo cinético da reação de TAO envolvendo mioglobina, nitrito e o ácido dihidrolipóico. Foram reportados os traços cinéticos referentes à formação da nitrosilmioglobina a partir do aumento da absorbância da banda centrada em 580 nm⁷⁶ com as reações realizadas em diferentes concentrações de íon nitrito ([NO₂⁻]). Considerando uma cinética de pseudo-primeira ordem, foram obtidas as k_{obs} para a reação sob diferentes [NO₂⁻] (Equação 1) e, a partir destas foi determinada a constante bimolecular de velocidade (pelo coeficiente linear do gráfico da Figura 48B) com valor de 43,47 M⁻¹ s⁻¹.

Da mesma forma, foi investigada a dependência da velocidade de reação em relação à concentração de DHLA, sendo os resultados apresentados na Figura 49. Nesse caso, as concentrações de DHLA foram variadas de 1,2 mol L⁻¹ a 6,0 mol L⁻¹, pois para concentrações abaixo dessa faixa, não foi verificada reação em tempo considerável, ao mesmo tempo que para concentrações superiores a reação mostrou-se muito rápida para ser mensurada pelas técnicas utilizadas.

Figura 48 - (A) Traços cinéticos para a formação da Mb(II)(NO) a partir reação de OAT entre metMb, DHLA e nitrito a diferentes concentrações de nitrito. (B) k_{obs} em função da concentração de nitrito. Concentrações fixas: $[metMb]_{inicial} = 36,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[DHLA] = 0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Figura 49 - (A) Traços cinéticos para a formação da Mb(II)(NO) a partir reação de OAT entre metMb, DAcid e nitrito a diferentes concentrações de DHLA. (B) k_{obs} em função da concentração de DHLA. Concentrações fixas: $[metMb]_{inicial} = 39,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $[NO_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

Como observado na Figura 49, o aumento da absorbância da banda a 480 nm inicia-se a partir de determinado intervalo de tempo, que, por sua vez, depende da concentração do substrato. Esse intervalo de tempo aparenta ser um tempo de indução para a formação de um intermediário reativo e, após esse intervalo, a reação de TAO se comporta como de pseudo-primeira ordem, permitindo a obtenção

de k_{obs} a partir da variação da absorbância em 580 nm no tempo (Equação 1). Do coeficiente linear obtido no gráfico da Figura 49B, a constante de velocidade de TAO em relação à [DHLA] foi determinada como $59,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

4.2.5. Albumina Sérica Bovina (BSA) e β -Lactoglobulina (BLG)

A escolha das proteínas BSA e BLG como substratos na reação de TAO mediadas por Fe-porfirinas coordenadas a nitrito está relacionada à existência de resíduos de cisteína em sua estrutura. A BSA apresenta um resíduo de cisteína (cys₃₄; destacada na Figura 8) exposto ao solvente e, portanto, susceptível a ser oxidada por esse tipo de reação. Para esta proteína ainda existem outros resíduos de cisteína, mas estas estão indisponíveis, uma vez que estão comprometidas em ligações de ponte de dissulfeto (S-S). Quanto à BLG, esta proteína apresenta uma cisteína exposta ao solvente (cys₁₂₁; destacada na Figura 9) e os demais resíduos (cys₁₆₀-cys₆₆ e a cys₁₁₉-cys₁₀₆) comprometidos em pontes de S-S. A ponte dissulfeto entre as cys₁₁₉-cys₁₀₆ é a que está mais próxima da cisteína exposta (também destacadas na Figura 8).

O monitoramento da reação, através de espectrofotometria, entre o complexo Fe^{III}TPPS, o íon de NO₂⁻ coordenado e a BSA em sistema fechado é apresentado na Figura 50A, enquanto a reação na presença de O₂ molecular e a reação somente entre o complexo FeTPPS e a proteína BSA na ausência de íons nitrito estão apresentadas na Figura 50B e na Figura 50C, respectivamente. As concentrações das soluções de proteínas foram determinadas espectrofotometricamente a partir de seus coeficientes de absorvidade molar iguais a $\epsilon_{280\text{nm}} = 4,45 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BSA)⁸¹ e $\epsilon_{280\text{nm}} = 1,76 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BLG)⁸².

Figura 50 – Espectro eletrônico de absorção da reação entre FeTPPS, BSA e nitrito na ausência (A), na presença de O₂ (B) e para a reação apenas entre FeTPPS e BSA (C). Concentrações: [FeTPPS] = 8,9 10⁻⁶ mol L⁻¹; [NO₂⁻] = 10,0 10⁻³ mol L⁻¹; [BSA] = 83,5 10⁻⁶ mol L⁻¹.

Como pode ser notado na Figura 50, ocorre um deslocamento da banda centrada em 393 nm para 416 nm após a adição da solução contendo a proteína BSA nos sistemas com e sem nitrito e também na presença e ausência de O₂. A reação monitorada e apresentada na Figura 50A é diferente das outras duas, pois há um pequeno aumento na intensidade da absorbância nos momentos iniciais da reação. Nas reações das Figuras 50B e 50C, a absorbância da banda centrada em 416 nm é praticamente igual. Nesse caso, pode-se considerar que o oxigênio não é um fator influente e, isso, como será mostrado ocorre, porque não há formação da espécie Fe^{II}(TPPS)(NO), mas possivelmente pode ocorrer a formação de um complexo do tipo Fe^{III}(TPPS)(RS)⁻⁵⁷ ou ainda de um radical orgânico formado a partir da oxidação da proteína.

A Figura 51 traz os espectros de RPE para a reação entre Fe^{III}TPPS e BSA, na presença e na ausência de nitrito, considerando as regiões de 600,0 G a 2000,0 G e 2800,0 a 4000,0 G.

Figura 51 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (acima) e na região de 2800,0–4000,0 G (abaixo) para (A) Fe^{III} TPPS; (B) Fe^{III} TPPS e BSA; (C) Fe^{III} TPPS, BSA e nitrito.

A Figura 51 mostra que os dois sinais com $g = 5,8$ e $g = 4,3$ atribuídos à Fe^{III} TPPS, como já discutido anteriormente, estão presentes no espectro da reação entre o complexo e a proteína BSA e no espectro da reação entre o complexo Fe^{III} TPPS, íons de nitrito e a proteína BSA. Na região de 2800,0 G a 4000,0 G aparece um sinal intenso, com $g = 2,007$ para o sistema com Fe^{III} TPPS e BSA, que pode ser atribuído a um radical orgânico formado pela oxidação de algum amino ácido residual da BSA pela transferência de um de seus elétrons à Fe-porfirina,

reduzindo-a à Fe^{II}TPPS (reação 18). A existência desse sinal e a ausência de sinal da nitrosilporfirina permitem sugerir que o deslocamento da banda da Fe^{III}TPPS centrada em 393 nm para 416 nm ocorre pela formação do complexo Fe^{II}TPPS. Ao mesmo tempo, a largura de linha (L_w) do radical detectado por RPE foi de 13,5 G, valor este característico para radicais orgânicos. Desta forma diferentemente do observado por Heinecke et. al.⁵⁷ não foi observado a formação do complexo Fe^{III}TPPS(RS⁻), mas sim a redução do do centro metálico do complexo Fe^{III}TPPS a Fe^{II}TPPS com conseqüente oxidação provavelmente do resíduo cys₃₄ da proteína. Esta oxidação ocorreu aparentemente em uma pequena fração molar da proteína. Tal resultado é confirmado por SDS-PAGE, como será exposto posteriormente à discussão dos resultados da β -lactoglobulina (Figura 53).

Na presença de íons nitrito, o sinal de RPE referente ao radical da proteína não é observado. A mistura de íons de nitrito com o complexo resulta em Fe^{III}TPPS(NO₂⁻) no qual o nitrito coordenado provavelmente impede a interação da proteína BSA com o complexo de ferro heme e, portanto, impede a transferência de elétron da proteína para o complexo, reduzindo o complexo de ferro e gerando o radical da proteína.

São apresentados na Figura 52 os espectros eletrônicos de absorção para a reação entre a β -lactoglobulina (BLG) e o complexo Fe^{III}TPPS, com íons nitrito e na ausência de O₂ molecular. Como nessas condições não foi notada nenhuma alteração espectroscópica e, considerando que a mesma reação na presença de oxigênio e a reação somente entre a BLG e a porfirina mostraram o mesmo resultado da Figura 52, isto é, não foi vista nenhuma evidência espectroscópica de reação, foi apresentado apenas o gráfico da Figura 52.

Figura 52 - Espectro eletrônico de absorção para a reação entre Fe^{III} TPPS, BLG e nitrito na ausência de O_2 . Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BLG}] = 98,5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

São apresentados na Figura 53 os resultados obtidos da análise por SDS-PAGE para averiguar se ocorreu oxidação das proteínas.

Figura 53 – Resultados de gel de poliácridamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as reações com BSA e BLG.

A Tabela 8 faz a atribuição das bandas às amostras aplicadas.

Tabela 8 – Nomeação das amostras analisadas por SDS-Page.

Numeração	Amostra
1	Marcador
2	BSA (sem redutor)
3	BSA (com DTT)
4	FeTPPS + NO ₂ ⁻ + BSA (sem redutor)
5	FeTPPS + NO ₂ ⁻ + BSA (com DTT)
6	FeTPPS + BSA (sem redutor)
7	FeTPPS + BSA (com DTT)
8	BLG (sem redutor)
9	BLG (com DTT)
10	FeTPPS + NO ₂ ⁻ + BLG (sem redutor)
11	FeTPPS + NO ₂ ⁻ + BLG (com DTT)
12	FeTPPS + BLG (sem redutor)
13	FeTPPS + BLG (com DTT)

Como pode se observar, não houve oxidação com conseqüente dimerização da proteína por meio da formação de pontes de dissulfeto. A BSA possui massa de 66,6 kDa e em todos os casos (banda 2 a banda 7) as bandas ficaram na posição correspondente a essa massa no marcador, logo não ocorreu oxidação por TAO. O mesmo é verificado com a BLG, que possui massa de 18,4 kDa, e a posição da banda no marcador correspondente a essa massa é a mesma para todas as bandas das amostras aplicadas.

O conjunto de dados coletados por espectrofotometria UV-vis, SDS-PAGE e RPE sugerem que a BLG não sofre oxidação e também não se associa com a porfirina investigada. Em contrapartida, a proteína BSA forma a espécie (BSA-RS[•]) e, isso gera o sinal detectável por RPE e provavelmente é responsável pelo deslocamento da banda do espectro eletrônico de absorção no UV-vis pela redução da do centro de Fe^{III}(P) à Fe^{II}(P). Na literatura está reportado que a BSA pode

interagir com Fe-porfirinas⁸³ e isto provavelmente é que responde pela diferença de comportamento entre as duas proteínas.

4.2.6. Sulfeto de hidrogênio

Considerando a importância atual que vem sendo atribuída ao sulfeto de hidrogênio devido à descoberta das funções que pode desempenhar no organismo, principalmente relacionada à iniciação na formação de nitrosotióis (RSNO) [40], esta molécula foi submetida à análise quanto a reatividade como substrato para reações de TAO.

A Figura 54 apresenta os espectros de absorção eletrônica no UV-vis para a reação de TAO envolvendo o complexo FeTPPS, íons de nitrito e o ácido sulfídrico. Analogamente ao DHLA, é observada a formação de uma banda a 413 nm que pode ser atribuída à espécie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$, como confirmado pelos espectros de RPE apresentados na Figura 55. A reação é rápida e não foi possível estudar sua cinética nas condições em que os experimentos foram desenvolvidos apresentando a necessidade do emprego da técnica de stopped-flow para esta finalidade.

Figura 54 – Espectro eletrônico de absorção para a reação entre $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, H_2S e nitrito na ausência de O_2 (A) e com abertura do sistema (B). Concentrações: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}] = 8,7 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 55A ilustra a ausência de sinais para os espectros de RPE na região de 600,0 G a 2000,0 G sugerindo que todo o centro metálico de Fe^{III} do complexo foi

reduzido a Fe^{II} e, o perfil característico visualizado na Figura 55B, demonstra a formação da espécie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{TPPS}(\text{NO})$. A ausência de sinais na região de 600,0G a 2000,0G sugerem que houve completa redução da Fe-porfirina.

Figura 55 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600,0–2000,0 G (A) e na região de 3000,0–3800,0 G (B) para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPS}$, H_2S e nitrito. $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{H}_2\text{S}] = 5,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Da mesma maneira que o ácido dihidrolipóico, o H_2S é capaz de reduzir o íon de Fe^{III} da mioglobina a Fe^{II} .⁴⁹ Desta maneira, foram apresentados na Figura 56 os espectros eletrônicos de absorção UV-vis para a reação entre a mioglobina, na presença de íons nitrito empregando-se o ácido sulfídrico como substrato para reação de TAO.

Figura 56 – Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (vermelho), metMb na presença de nitrito com H_2S adicionado (azul). Concentrações: $[\text{metMb}]_{\text{inicial}} = 41,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-]_{\text{final}} = 10,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado, há a formação de bandas centradas em 542 nm e 580 nm, que podem ser atribuídas à redução do centro de Fe^{III} da mioglobina a Fe^{II} ⁴⁹, e formação de nitrosilmioglobina. Para confirmar tal proposta, foram obtidos os espectros de RPE para essas reações.

São apresentados na Figura 57 os espectros de RPE para solução congelada contendo Mb e íons de nitrito à qual foi borbulhado o gás H_2S com o sistema aberto. O resultado é inconsistente com a formação da $\text{MbFe}^{\text{II}}(\text{NO})$, entretanto consistente com a provável formação de um complexo do tipo MbFeSNO ⁸⁴. A banda centrada em 352 nm pode ser atribuída à formação do complexo coordenando ao nitrosotiol (MbFeSNO).^{84,85} Além disso, interações do H_2S com mioglobina (e também hemoglobina) são conhecidas por resultar em modificações covalentes de um dos anéis pirrólicos do grupo heme produzindo a então chamada sulfmioglobina e sulfhemoglobina e seus derivados.⁸⁶

Figura 57 – Detalhes dos espectros de RPE na região de 600-2000G (A) e de 3000-4000G (B) para Mb, H_2S e nitrito. Concentrações: $[\text{metMb}] = 0,8 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $[\text{NO}_2^-] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$.

São apresentados na Figura 58 os resultados para as reações nas quais foram utilizadas soluções saturadas de H_2S e não o borbulhamento direto com o gás no sistema.

Figura 58 – (A) Espectro eletrônico para metMb (preto), metMb na presença de nitrito (verde), metMb na presença de nitrito com H₂S adicionado (vermelho). Concentrações: [metMb]_{inicial} = 41,6 10⁻⁶ mol.L⁻¹; [NO₂]_{final} = 10,0 mM; [H₂S] = 2,3 10⁻³ mol.L⁻¹. (B) Detalhes dos espectros de RPE na região 2800,0 – 4000,0 G para Mb, H₂S e nitrito. Concentrações: [metMb] = 0,8 10⁻³ mol.L⁻¹; [NO₂]⁻ = 10,0 10⁻³ mol.L⁻¹; [H₂S] = 5,3 10⁻³ mol.L⁻¹.

Apesar do espectro eletrônico de absorção ser semelhante ao apresentado na Figura 56 o espectro de RPE mostra a ausência de sinais na região de 2800,0 a 4000,0 G (Figura 58B), sugerindo que, nessas condições, não ocorreu a formação da espécie nitrosilmioglobina. Nesse caso, possivelmente o espectro eletrônico de absorção resultante da reação pode ser atribuído à redução do centro de Fe^{III} da mioglobina a Fe^{II}.⁴⁹ O H₂S sabidamente é capaz de reduzir o centro de ferro coordenado ao grupo heme da mioglobina nessas condições.⁴⁹

O mecanismo proposto para a redução da metMb pelo ácido sulfídrico está baseado na associação do H₂S ao centro metálico pela coordenação do enxofre ao ferro heme, de modo que a disposição espacial da molécula H₂S coordenada é favorecida pelos resíduos de aminoácidos próximos ao grupo heme. Tal premissa se baseia na similaridade da mioglobina com a hemoglobina, cuja interação com o H₂S é reportada na literatura.⁴⁹ Para a hemoglobina resíduos de aminoácidos que estão localizados próximos e que estabilizam essa coordenação.⁴⁹ Após a transferência de um elétron e conseqüente redução, o H₂S se dissocia do centro metálico. Considerando que, a constante de associação do ácido sulfídrico a ferro Mb reportada na literatura é da ordem de 10⁵ – 10⁶⁷⁶ enquanto que para a associação do íon nitrito ao Fe é de 156 M⁻¹ s⁻¹ ⁷⁹, provavelmente o excesso de H₂S no meio reacional desloca o equilíbrio beneficiando a coordenação do H₂S ao centro metálico em detrimento da formação da espécie MbFe^{III}(NO₂⁻), inviabilizando portanto a

reação de transferência de átomo de oxigênio e, conseqüentemente a formação da nitrosilmioglobina. Outro fator que pode estar controlando a reação, é a maior estabilização do H_2S ao centro de ferro heme, o que é devido à presença dos resíduos proximais capazes de interagir com o substrato comparativamente ao nitrito. Isso também explica a formação do complexo $MbFeSNO$, pois sua formação depende da prévia associação do enxofre ao ferro. Dessa forma, a concentração de H_2S no meio reacional é determinante para controlar o processo que irá ocorrer.

Ao final das reações foi verificada a formação de um precipitado que pode ser devido à mudanças na estrutura primária ou secundária da proteína mioglobina. Como as condições do meio reacional (pH e temperatura) não foram alterados, a precipitação pode ocorrer devido à reações nas cadeias laterais na Mb. As soluções finais de reação foram, então, analisadas por SDS-Page para verificar se ocorreu *cross-link* da proteína, por exemplo, por formação de pontes de dissulfeto ou geração de radicais em partes protéicas levando à *cross-link*. Os resultados são apresentados na Figura 59 e a legenda está na Tabela 9.

Figura 59 – Resultados de gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para as reações com a metMb e H_2S na presença de nitrito.

Tabela 9 – Nomeação das amostras das reações entre mioglobina e H_2S analisadas por SDS-Page.

numeração	1	2	3	4
amostra	marcador	metMb (padrão)	Reação Mb + $NO_2^- + H_2S$	Reação Mb + $NO_2^- +$ H_2S (concentrado)

Como pode ser observado, não houve *cross-link* na proteína uma vez que todas as amostras a proteína identificada tem uma massa equivalente à massa da metmioglobina (18 kDa) e, a precipitação pode acontecer por alterações na sua conformação, estrutura secundária e terciária, em função da ocorrência de outras reações que modifiquem suas cadeias laterais que beneficiam outro tipo de estrutura, insolúvel nas condições do meio.

5. Conclusões

Os resultados das reações e caracterizações para os sistemas empregando-se FeTPPS, íons nitrito e lipídeos insaturados permitem concluir que a reação de TAO não ocorre para esse tipo de sistema. Esse tipo de reação é termodinamicamente inviável ou ocorre muito lentamente para ser mensurada.

Os tióis cisteína, glutatona, ácido dihidrolipóico e o H₂S reagem por meio de reações de TAO com a espécie FeTPPS na presença de íons nitrito, sendo a presença de oxigênio um fator importante para este tipo de reação. O ácido dihidrolipóico é o tiol no qual o processo é mais rápido dentre as três espécies mencionadas, e isso está relacionado ao fato de ser um potente redutor. A técnica de RPE permitiu a identificação da formação do aduto Fe^{II}TPPS(NO) originado pela redução da porfirina coordenada a nitrito.

A BLG não se mostrou reativa frente às condições do sistema e a BSA se associa com a espécie FeTPPS sendo prontamente oxidada gerando um radical de proteína antes de permitir que a reação de TAO ocorra.

Em termos de relevância em meio biológico, as reações de TAO estudadas ocorrem apenas para tióis de baixa massa molecular e pequenas moléculas não carregadas. As reações de TAO podem ocorrer para pequenos peptídeos, mas não são observadas para proteínas globulares. Com essas considerações, é de interesse estudar esse tipo de reação para proteínas fibrilares com tióis, a exemplo da miosina.

Quando a ferro-porfirina utilizada é a metaloproteína mioglobina, a reação de TAO ocorre apenas com os substratos H₂S e para o ácido dihidrolipóico, que são pequenas moléculas não carregadas que estão aptas a interagir diretamente com o

grupo heme da mioglobina permitindo a transferência de átomo de oxigênio do complexo com nitrito coordenado $\text{MbFe}^{\text{III}}(\text{NO}_2^-)$.

6. Referências bibliográficas

1. ISHIKAWA, S.; TAMAKI, S.; OHATA, M.; ARIHARA, K.; ITOH, M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: A possible mechanism of heme-induced colon cancer. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. 1-10, 2010.
2. TOYOKUNI, S. molecular mechanism of oxidative stress-induced carcinogenesis: from epidemiology to oxygenomics. **Life**, v. 60, p. 441-447, 2008.
3. NORAT, T.; LUKANOVA, A.; FERRARI, P.; RIBOLI, E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, v. 98, p. 241-256, 2002.
4. CARLSEN, C. U.; MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Heme-iron in lipid oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 485-498, 2005.
5. PAN, M.; LAI, C.; HO, C. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. **Food & Function**, v. 1, n. 1, p. 15-31, 2010.
6. GORBUNOV, N. V.; OSIPOV, A. N.; DAY, B. W.; ZAYAS-RIVERA, B.; KAGAN, V. E.; ELSAYED, N. M. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. **Biochemistry**, v. 34, p. 6689-6699, 1995.
7. LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 156-167, 2008.
8. RUBBO, H.; DARLEY-USMAR, V.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chemical Research Toxicology**, v. 9, p. 809-820, 1996.
9. BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V. B.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of free radical– and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 1707-1715, 2000.
10. HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 378-384, 1999.
11. VAZ, S. M.; PRADO, F. M.; DI MASCIO, P.; AUGUSTO, O. Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, p. 127–133, 2009.

12. BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A.. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences** (Medical Sciences), v. 87, p. 1620-1624, 1990.
13. NORONHA-DUTRA, A. A.; EPPERLEIN, M. M.; WOOLF, N. Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing. **FEBS Letters**, v. 321, n. 1, p. 59-62, 1993.
14. TOLEDO JR., J. C.; AUGUSTO, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, p. 975-989, 2012.
15. PADMAJA S.; HUIE, R. E. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, p. 539-544, 1993.
16. KANNER, J.; HAREL, S.; SHAGALOVICH, J.; BERMAN, S. antioxidative effect of nitrite in cured meat products: nitric oxide-iron complexes of low molecular weight. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 32, p. 512-515, 1984.
17. LIMA, E. S.; DI MASCI, P.; RUBBO, H.; ABDALLA, D. S. P. Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. **Biochemistry (Easton)**, v. 41, p. 10717-10722, 2002.
18. MARTÍNEZ, A. Donator-acceptor map and work function for linear polyene-conjugated molecules. a density functional approximation study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 3212-3217, 2009.
19. KRÖGER-OHLSSEN, M. V.; Skibsted, L. H. Deactivation of hypervalent meat pigments. Kinetics of reduction of ferrylmyoglobin by nitrite and iodide. **Food Chemistry**, v. 70, p. 209-214, 2000.
20. MØLLER, J. K. S.; SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and myoglobins. **Chemical Review**, v. 102, p. 1167-1178, 2002.
21. EUROPEAN COMMISSION, SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD. **Opinion of the scientific committee on food on the use of carbon monoxide as component of packaging gases in modified atmosphere packaging for fresh meat.** (2001). Disponível em: http://www.foodsafetynetwork.ca/aspx/public/publication_detail.aspx?id=74. Acesso em: 20 nov. 2012.
22. HUANG, K. T.; KESZLER, A.; PATEL, N.; GLADWIN, M. T.; KIM-SHAPIRO, D. B.; HOGG, N. The Reaction between nitrite and deoxyhemoglobin: reassessment of reaction kinetics and stoichiometry. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 280, p. 31126-31131, 2005.

23. MØLLER, J. S.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of nitrosylmyoglobin autoxidation: temperature and oxygen pressure effects on the two consecutive reactions. **Chemical European Journal**, v. 10, p. 2291-2300, 2004.
24. SANTAMARIA, P. Contributo degli ortaggi all' assunzione giornaliera di nitrato – nitrito e nitrosamina). **Industrie-Alimentari**, v. 36, p. 1329-1334, 1997.
25. MAYNARD, D.N; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. **Advances in Agronomy**, v. 28, p. 71-118, 1976.
26. WINK, D. A.; HANBAUER, I.; GRISHAM, M. B.; LAVAL, F.; NIMS, R. W.; LAVAL, J.; COOK, J.; PACELLI, R.; LIEBMANN, J.; KRISHNA, M.; FORD, P. C.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic Mechanisms. **Current topics in cellular regulation**, v. 34, p. 159-187, 1996.
27. CHALLIS, B. C.; EDWARDS, A.; HUNMA, R. R.; KYRTOPOULOS, S. A.; OUTRAM, J. R. Rapid formation of N-nitrosamines from nitrogen oxides under neutral and alkaline conditions. **IARC Scientific Publications**, v. 19, p. 127-142, 1978.
28. TANNENBAUM, S. R.; WEISMAN, M.; FETT, D. Effect of nitrate intake of nitrite formation in human saliva. **Food and Cosmetics Toxicologic**, v. 14, p. 549-552, 1976.
29. RIFKIND, J. M.; NAGABU, E.; RASAMANY. Nitric oxide reodx reactions and red cell biology. **Antioxidants and redox Signalin**, v. 8, p. 1193-1203, 2006.
30. VOLK, J.; GORELIK, S.; GRANIT, R.; KOHEN, R.; KANNER, J. The dual function of nitrite under stomach conditions is modulated by reducing compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 496-502, 2009.
31. COMBET, E.; MESMARI, A. E.; PRESTON, T.; CROZIER, A.; MCCOLL, K. E. L. Dietary phenolic acids and ascorbic acid: Influence on acid-catalyzed nitrosative chemistry in the presence and absence of lipids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 6, p. 763-771, 2010.
32. HUVAERE, K.; CARDOSO, D. R.; HOMEM-DE-MELLO, P.; WESTERMANN, S.; SKIBSTED, L. H. Light-Induced Oxidation of Unsaturated Lipids as Sensitized by Flavins. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 5583–5593, 2010.
33. SILAGHI-DUMITRESCU, R.; REEDER, B. J.; NICHOLLS, P.; COOPER, C. E.; WILSON, M. T. Ferryl haem protonation gates peroxidatic reactivity in globins. **Biochemical Journal**, v. 403, p. 391–395, 2007.

34. TRIVERDI, M. V.; LAURENCE, J. S.; SIAHAAN T. J. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, p. 614-625, 2009.
35. KERSCHER, R.; GROSCH, W. Quantification of 2-Methyl-3-furanthiol, 2-Furfurylthiol, 3-Mercapto-2-pentanone, and 2-Mercapto-3-pentanone in Heated Meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1954-1958, 1998.
36. BOELEN, M.; LINDE, L. M. VAN DER; VALOIS, P. J.; DORT, H. M. VAN; TAKKEN, H. J. Organic Sulfur Compounds from Fatty Aldehydes, Hydrogen Sulfide, Thiols, and Ammonia as Flavor Constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1071-1076, 1974.
37. SIMIC, M. G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 220, p. 377-386, 1988.
38. SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DAWSON, J. H. Heme-containing oxygenases, **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2841-2888, 1996.
39. BAINS, J. S.; SHAW, C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. **Brain research reviews**, v. 25, p. 335-358, 1997.
40. WINTHER, J. R.; JAKOB, U. A black hole for oxidized glutathione. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 69-70, 2013.
41. MORGAN, B.; EZERIŃA, D.; AMOAKO, T. N. E.; RIEMER, J.; SEEDORF, M.; DICK, T. P. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. **Nature Chemical Biology**, v. 9, p. 119-125, 2013.
42. WALSH, C. posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory. **Roberts and Company Publishers**, p. 6-24, 2006.
43. MIEYAL, J. J.; CHOCK, P. B. Posttranslational modification of cysteine in redox signaling and oxidative stress: focus on s-glutathionylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 6, p. 471-475, 2012.
44. SETHURAMAN, M.; CLAVREUL, N.; HUANG, H.; MCCOMB, M.E.; COSTELLO, C.E.; COHEN, R. A. Quantification of oxidative posttranslational modifications of cysteine thiols of p21ras associated with redox modulation of activity using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. **Free radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 6, p. 823-829, 2006.

45. FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: **Thomson Science**, p. 478, 1998.
46. GELAMO, E. L.; TABAK, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, **Spectrochim. Acta, Part A**, 56, p. 2255–2271, 2000.
47. CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P.; FRANKS, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites, **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 5, n. 9, p. 827–835, 1998.
48. SONTANG, G.; SCHWARTZ, H. Chapter 37: Analytical methods for determination of α -lipoic acid, dihydrolipoic acid, and lipoyllysine in dietary supplements and foodstuffs. In: **Handbook of Analysis of Compounds in Functional Foods**. Boca Raton. Editor: CRC, 2012.
49. PIETRI, R.; LEWIS, A.; LEÓN, R.G.; CASABONA, G.; KIGER, L.; YEH, S.-R.; FERNANDEZ-ALBERTI, S.; MARDEN, M.C.; CADILLA, C.L.; LÓPEZ-GARRIGA, J. Factors controlling the reactivity of hydrogen sulfide with heme proteins. **Biochemistry**, v. 48, n. 22, p. 4881–4894, 2009.
50. FUKUTO, J.M.; CARRINGTON, S.J.; TANTILLO, D. J.; HARRISON, J. G.; IGNARRO, L. J.; FREEMAN, B. A.; CHEN, A.; WINK, D. A. Small molecule signaling agents: the integrated chemistry and biochemistry of nitrogen oxides, oxides of carbon, dioxygen, hydrogen sulfide, and their derived species. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, p. 769–793, 2012.
51. KHIN, C.; HEINECKE, J.; FORD, P. C. Oxygen atom transfer from nitrite mediated by Fe(III) porphyrins in aqueous solution. **Journal American Chemical Society**, v. 130, n. 42, p. 13830–13831, 2008.
52. O'SHEA, K. S.; WANG, W.; WADE, R. S.; CASTRO, C. E. Selective oxygen transfers with iron(III) porphyrin nitrite. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 6388–6395, 1996.
53. PERRIN, D.D.; ALMARGE, W.L.; PERRIN, D.P. **Purification of laboratory chemicals**. New York: Pergamon Press, 1983, p. 56.
54. SHRIVER, D.F.; DREZDZON, M.A. **The manipulation of air-sensitive compounds**. New York: Wiley, 1986, p. 22–57.

55. FLEISCHER, E. B.; PALMER, J. M.; SRIVASTAVA, T. S.; CHATTERJEE, A. Thermodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 3162-3167, 1971.
56. K. KALYANASUNDARAM. **Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes**. Boca Raton: **Academic Press**, London, 1992.
57. HEINECKE, J.; FORD, P. C. Formation of cysteine sulfenic acid by oxygen atom transfer from nitrite. **Journal American Chemical Society**, v. 132, n. 27, p. 9240–9243, 2010.
58. BEDIQUI, F.; TREVIN, S.; ALBIN, V.; VILLEGAS, M.G.G.; DEVYNCK, J. Design and characterization of chemically modified electrodes with iron(III) porphyrinic-based polymers: Study of their reactivity toward nitrites and nitric oxide in aqueous solution. **Analytica Chimica Acta**, v. 341, p. 177-185, 1997.
59. FREDERIKSEN, A.M.; LUND, M.N.; ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED, L.H. Oxidation of porcine myosin by hypervalent myoglobin: the role of thiol groups. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 56, p. 3297-3304, 2008.
60. RAHMAN, M.; HARMON, H. J. Absorbance change and static quenching of fluorescence of meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin (TPPS) by trinitrotoluene (TNT). **Spectrochimica Acta Part A**, v. 65, p. 901–906, 2006.
61. Integrated spectral database system for organic compounds. Disponível em: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Acesso em 10 maio 2012.
62. The lipid library. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/1NMRdbs/index.htm>>. Acesso em 10 de maio 2012.
63. VILHENA, F.S.D.S.; SILVA, A.W.S.; LOURO, S.R.W. Reductive nitrosilation of water-soluble iron porphyrins by S-nitroso-N-acetylpenicillamine: Rate constants and EPR characterization. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 1722-1729, 2006.
64. GANDINI, S.C.M.; VIDOTO, E.A.; NASCIMENTO, O.R.; TABAK, M. Spectroscopy study of water-soluble iron (III) meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin in aqueous solution: effects of pH and salt. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, p. 127-137, 2003.

65. KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. Handbook of Porphyrin Science with applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, **Biology and Medicine** (Volumes 6-10), World Scientific Publishing Company, 2010.
66. EATON, G. R.; EATON, S. S.; BARR, D. P.; WEBER, R. T. **Quantitative EPR**. New York: Springer, 2010.
67. BENITEZ, L. V.; ALLISON, W. S. The inactivation of the acyl phosphatase activity catalyzed by the sulfenic acid form of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by dimedone and olefins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 19, p. 6234-6243, 1974.
68. KLOMSIRI, C.; NELSON, K.J.; BECHTOLD, E.; SOITO, L.; JOHNSON, L.C.; LOWTHER, W. T.; RYU, S.E.; KING, S. B.; FURDUI, C. M.; POOLE, L. B. Use of dimedone-based chemical probes for sulfenic acid detection: evaluation of conditions affecting probe incorporation into redox-sensitive proteins. **Methods in Enzymology**, v. 473, p. 77-94, 2010.
69. JONGBERG, S.; GISLASON, N. E.; LUND, M. N.; SKIBSTED, L. H.; WATERHOUSE, A. L. Thiol quinone adduct formation in myofibrillar proteins detected by LC-MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 59, p. 6900–6905, 2011.
70. MARTÍNEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 43-52, 2004.
71. HAYAH, A.; SUZUKI, T.; SHIN, M. An enzymic reduction system for metmyoglobin and methemoglobin, and its application to functional studies of oxygen carries. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 31, p. 309-316, 1973.
72. GALARIS, D.; CADENAS, E.; HOCHSTEIN, P. Glutathione dependent reduction of peroxides during ferryl- and met-myoglobin interconversion: A potential protective mechanism in muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, 6, p. 473-478, 1989.
73. HEINECKE, J. L. **Filling in the crossword puzzle: evaluation of various routes to ferrous nitrosyl formation**. 2011. 256 f. Tese (Doutorado em Filosofia em Química), University of California, Santa Barbara, 2011.
74. ARDUINI, A.; EDDY, L.; HOCHSTEIN, P. The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: A novel function for ergothioneine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 281, p. 41-43, 1990.

75. HIROTA, S.; AZUMA, K.; FUKUBA, M.; KUROIWA, S.; FUNASAKI, N. Heme reduction by intramolecular electron transfer in cysteine mutant myoglobin under carbon monoxide atmosphere. **Biochemistry**, v. 44, p. 10322-10327, 2005.

76. ROMERO, F. J.; ORDOÑEZ, I.; ARDUINI, A.; ADENAS, E. The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1680-1688, 1992.

77. SCHOLICH, H.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on α -tocopherol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1001, p. 256-261, 1989.

78. SUZUKI, Y.; TSUCHIYA, M.; PACKER, L. Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. **Free Radical Research Communications**, v. 15, n. 5, p. 255-63, 1991.

79. Wanat, A.; Gdula-Argasińska, J.; Rutkowska-Zbik, D.; Witko, M.; Stochel, G.; van Eldik, R. Nitrite binding to metmyoglobin and methemoglobin in comparison to nitric oxide binding. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, p. 165-76, 2002.

80. Paul J. M. van Kan , Eric van der Horst , Eduard J. Reijerse , P. Jan M. van Bentum and Wilfred R. Hagen. Multi-frequency EPR spectroscopy of myoglobin. Spectral effects for high-spin iron(III) ion at high magnetic fields. *J. Chem. Soc., Faraday Transactions*, 1998, 94, 2975- 2978

81. PETERS, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 432.

82. GILL, C. G.; HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, p. 319-326, 1989.

83. XIAO, C.-Q.; JIANG F.-L.; ZHOU, B; LIA, R.; LIUA, Y. Interaction between a cationic porphyrin and bovine serum albumin studied by surface plasmon resonance, fluorescence spectroscopy and cyclic voltammetry. **Photochemical & Photobiological Science**, v. 10, p. 1110, 2011.

84. WITTING, P. K.; DOUGLAS, D. J.; MAUK, A. G. Reaction of human myoglobin and nitric oxide. heme iron or protein sulfhydryl (S) nitrosation dependence on the absence or presence of oxygen. **JBC Papers in Press**, v. 276, n. 6, p. 3991-3998, 2000.

85. SULLIVAN, G.A.; SEBRANEK, J. G. Nitrosylation of myoglobin and nitrosation of cysteine by nitrite in a model system simulating meat curing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 1748-1754, 2012.
86. JOHNSON, E. A. The reversion to haemoglobin of sulphhaemoglobin and its coordination derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 207, p.207, 1970.

APÊNDICE

Figura 60 - (a) Cromatograma total de íons das amostras padrão de dimedona (verde) e glutathiona oxidada (azul). (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutathiona oxidada). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2 (dimedona).

Figura 61 - (a) Cromatograma total de íons da amostra controle contendo glutatona, dimedona e nitrito. (b) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 1 (glutatona). (c) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 2. (d) Espectro de massas (ESI(+))MS da espécie 3.

Figura 62 - Espectro de massas por CID do eluato a $t_r = 16,1$ min apresentado na Figura 41(a).

Todas as amostras foram preparadas em solução de água com 0,01% de ácido fórmico (v/v) e foram diluídas de modo a fornecer uma concentração de aproximadamente 10 ppm para cada analito.

A amostra controle foi preparada nas mesmas condições das reações de TAO (25° C, solução fosfato 50 mM pH 5,8) contendo 1,0 mM de GSH, 1,0 mM de dimedona e 10,0 mM de $NaNO_2$, sendo posteriormente diluída em solução de água com 0,01% de ácido fórmico (v/v) para fornecer a concentração final de GSH de 10 ppm.