

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo da Acção de Nitrosocompostos Sobre Aminoácidos
Contendo o Grupo Tiol**

Lara Sofia Marques Ribeiro

Mestrado em Química

Lisboa
2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo da Acção de Nitrosocompostos Sobre Aminoácidos
Contendo o Grupo Tiol**

Lara Sofia Marques Ribeiro

Mestrado em Química

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Maria Eduarda de Machado Araújo

Lisboa
2010

Agradecimentos

À Professora Eduarda Araújo, por todo o seu apoio científico e entusiasmo que tornou possível a concretização desta dissertação. Agradeço ainda toda a sua disponibilidade e muito em especial, a amizade e confiança que sempre depositou em mim.

Ao Professor Luis García-Río, do Departamento de Química Física da Faculdade de Química da Universidade de Santiago de Compostela, por me ter acolhido no seu laboratório e pelo seu valioso apoio científico que em muito contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho. Não posso deixar de agradecer pela amizade e todo o incentivo que sempre me concedeu.

À Professora Fátima Frazão, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que sempre esteve presente em todo o meu percurso, académico e profissional, e sempre mostrou disponibilidade para ajudar contribuindo com todo o seu conhecimento científico, experiência e amizade.

À direcção da Escola Superior de Saúde Ribeiro Sanches, pela disponibilização do laboratório e equipamento que permitiu a conclusão de alguns estudos incluídos neste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório e amigos de Santiago de Compostela que sempre me fizeram sentir como se estivesse em “casa”.

Às minhas colegas de trabalho, Marise Almeida e Patrícia Rijo, por sempre se mostrarem prestáveis em ajudar nos momentos mais difíceis e ainda por toda a amizade que me têm dedicado.

À minha mãe por todo o amor, carinho e esforço sem o qual jamais teria sido possível chegar até aqui, e a todos os meus amigos do “peito” por todo o apoio e amizade mesmo nos meus piores momentos.

Resumo

Foi estudada a transferência do grupo nitroso a partir da 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG) e 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) para vários tióis, incluindo a cisteína, num intervalo de pH entre 7 e 12.

Observou-se uma correlação sinusoidal entre as constantes de velocidade bimoleculares aparentes de transnitrosação (k_{tr}^{ap}) e a medida de pH, indicando de forma clara que as N-nitrosoguanidinas reagem na sua forma neutra e os nucleófilos na forma de anião tiolato para dar os correspondentes S-nitrosotióis.

No caso da cisteína, a existência de 3 constantes de acidez macroscópicas influenciou o comportamento cinético da reacção de transnitrosação tendo sido determinadas as constantes de velocidade de transnitrosação (k_{tr}) para as duas espécies nucleofílicas possíveis.

Foi encontrada uma menor reactividade da NOBMG na reacção de transnitrosação com tióis em toda a gama de pH, devido ao menor efeito de electroatração exercido pelo grupo benzoílo, e à possível estabilização da sua estrutura aniónica por formação de uma ponte de hidrogénio intramolecular.

Foram calculadas as constantes k_{tr} para os nucleófilos em estudo e estabeleceram-se as correlações do tipo Brønsted, tendo sido obtidos valores de $\beta_{nuc} < 0$ ($\beta_{nuc}(\text{NOBMG}) = -0,17$ e $\beta_{nuc}(\text{NOTSG}) = -0,11$). Os valores atípicos de β_{nuc} foram atribuídos à necessidade de dessolvatação prévia do nucleófilo.

Palavras-chave: Transnitrosação, S-nitrosotióis, N-nitrosocompostos, dadores de NO.

Abstract

The transfer of the nitroso group from 1-nitroso-1-methyl-3-tolylsulfonylguanidine (NOTSG) and 1-nitroso-1-methyl-3-benzoylguanidine (NOBMG) to some thiols, including cysteine, was studied in a pH range between 7 and 12.

The measured apparent bimolecular rate of transnitrosation (k_{tr}^{ap}) revealed a bell-shaped pH dependence that clearly indicates that both N-nitrosoguanidines react through the corresponding neutral form, and the nucleophiles in the thiolate anion form to give the corresponding S-nitrosothiol.

For cysteine, the existence of three macroscopic acidity constants influenced the kinetic behaviour of the transnitrosation reaction, and transnitrosation rates (k_{tr}) of the two possible nucleophilic species were obtained.

It was found that NOBMG has lower thiol transnitrosation capacity due to the lowest electron-withdrawing effect of benzoyl group and to the possible stabilization of the anionic structure due to the establishment of the intramolecular hydrogen bond.

The k_{tr} values of the studied nucleophiles were calculated and a Brønsted-type plot was established giving unexpected negatives β_{nuc} ($\beta_{nuc}(\text{NOBMG}) = -0,17$ and $\beta_{nuc}(\text{NOTSG}) = -0,11$). The atypical β_{nuc} values were attributed to the need for previous desolvation of the nucleophile.

Key words: Transnitrosation, S-nitrosothiols, N-nitrosocompounds, NO donors.

Índice

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice.....	vii
Índice de tabelas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de esquemas.....	xii
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiv
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica.....	1
1. Introdução.....	2
1.1. Óxido Nítrico.....	4
1.1.1. Propriedades do óxido nítrico.....	5
1.1.2. Papel biológico do óxido nítrico.....	8
1.2. S-nitrosação.....	10
1.2.1. Nitrosação de tióis.....	10
1.3. S-nitrosotióis.....	13
1.3.1. Propriedades dos S-nitrosotióis.....	14
1.3.2. Reacções dos S-nitrosotióis.....	16
a) Decomposição.....	16
a.1) Decomposição térmica e fotoquímica.....	16
a.2) Decomposição em solução.....	17
b) Reacções com nucleófilos.....	20
1.4. Dadores de óxido nítrico.....	23
1.4.1. S-nitrosotióis como dadores de óxido nítrico.....	26
1.4.2. Compostos híbridos contendo o grupo S-NO.....	28
1.5. Âmbito do trabalho.....	30
Capítulo 2 – Procedimento Experimental.....	33
2. Procedimento Experimental.....	34
2.1. Síntese das N-nitrosoguanidinas.....	34
2.1.1. 1- metil-3-toluenossulfonilguanidina (TSG).....	35
2.1.2. 1-metil-3-benzoílguanidina (BMG).....	35

2.1.3. 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG) e 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG).....	35
2.2. Análise preliminar dos produtos de transnitrosação.....	36
2.2.1. Transnitrosação da NOTSG para a cisteína a pH=8,6.....	37
2.3. Estudo cinético.....	39
2.3.1. Equipamento.....	39
2.3.2. Reagentes e solventes.....	39
2.3.3. Reacções de transnitrosação.....	40
a) Transnitrosação da NOTSG para a cisteína.....	43
b) Transnitrosação da NOBMG para o 2-mercaptoetanol.....	43
c) Transnitrosação da NOTSG para o 2-mercaptoetanol.....	43
d) Transnitrosação da NOTSG para metil-3-mercaptopropionato e etanotiol.....	44
e) Transnitrosação da NOBMG para metiltioglicolato, metil-3-mercaptopropionato e etanotiol.....	44
2.4. Análise de resultados cinéticos.....	44
Capítulo 3 – Resultados experimentais, discussão e conclusões.....	47
3. N-nitrosoguanidinas: Transnitrosação para tióis.....	48
3.1. Análise preliminar dos produtos de transnitrosação para tióis.....	49
3.2. Transnitrosação para tióis simples.....	50
3.2.1. Transnitrosação para o 2-mercaptoetanol.....	51
3.2.2. Transnitrosação para outros tióis de modelo simples.....	63
3.3. Transnitrosação para a cisteína.....	64
3.4. Correlações estrutura-actividade.....	74
3.5. Conclusões.....	77
Anexos.....	I
Anexo A – Tabelas.....	II
Anexo B – Ajustes.....	VII

Índice de tabelas

Tabela 1.1 – Espécies químicas de azoto provenientes do óxido nítrico.....	5
Tabela 1.2 – Principais classes de compostos dadores de óxido nítrico descritas por Wang <i>et al.</i>	24
Tabela 2.1 – Caracterização espectroscópica de ^1H R.M.N. e ^{13}C R.M.N para os compostos sintetizados.....	38
Tabela 2.2 – Preparação <i>in situ</i> das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100.....	41
Tabela 2.3 – Preparação <i>in situ</i> das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100 usando tampão fosfato com regulador externo de pH.....	41
Tabela 2.4 – Preparação <i>in situ</i> das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100 usando NaOH aquoso para fixar o pH.....	42
Tabela 2.5 – Quantidades adicionadas <i>in situ</i> para as reacções seguidas no espectrofotómetro stopped-flow sequencial Applied Photophysics DX17MV..	42
Tabela 3.1 – Valores de pK_a para os nucleófilos de enxofre (RSH) estudados nas reacções de transnitrosação com as N-nitrosoguanidinas.....	51
Tabela 3.2 – Valores de k_{tr}^{ap} em função do pH para a reacção da NOTSG e NOBMG com o 2-mercaptoetanol a 25°C	55
Tabela 3.3 – Valores estimados de k , pK_a^{XNO} e pK_a^{RSH} por ajuste dos resultados experimentais às equações 3.10 e 3.11.....	61
Tabela 3.4 – Valores de k_{tr}^{ap} em função do pH para a reacção da NOTSG com a cisteína.....	67
Tabela 3.5 – Valores das constantes de velocidade para as reacções de transnitrosação da NOTSG e NOBMG com os vários tióis estudados.....	74
Tabela A.1 – Valores de k_{obs} em função de $[\text{2-mercaptoetanol}]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOTSG.....	III
Tabela A.2 – Valores de k_{obs} em função de $[\text{2-mercaptoetanol}]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOBMG.....	III
Tabela A.3 – Valores de k_{tr}^{ap} , pH, $[\text{H}^+]$ e quociente $[\text{H}^+] / k_{tr}^{ap}$ para as reacções da NOTSG e NOBMG com o 2-mercaptoetanol.....	IV
Tabela A.4 – Valores de k_{obs} em função de $[\text{Nucleófilo}]_T$ e correspondentes valores de k_{tr}^{ap} para as reacções da NOTSG com os vários tióis simples estudados.....	V

Tabela A.5 – Valores de k_{obs} em função de $[Nucleófilo]_T$ e correspondentes valores de k_{tr}^{ap} para as reacções da NOBMG com os vários tióis simples estudados.....V

Tabela A.6 – Valores de k_{obs} em função de $[Cys]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOTSG.....VI

Tabela A.7 – Valores de k_{tr}^{ap} , pH, $[H^+]$, denominador e denominador x k_{tr}^{ap} para a reacção da NOTSG com cisteína.....VI

Índice de figuras

Figura 1.1 – Estruturas dos RSNO SNAP e GSNO.....11

Figura 1.2 – Estruturas de alguns RSNO estáveis no seu estado puro.....14

Figura 1.3 – Efeito da $[Cu^{2+}]$ na decomposição do SNAP.....18

Figura 1.4 – Complexo formado pelo ião Cu^{2+} e os iões tiolato de N-acetilpenicilamina presentes em solução.....19

Figura 1.5 – Influência da concentração de N-acetilpenicilamina (NAP) na constante k_{obs} para a decomposição do SNAP.....20

Figura 1.6 – Estruturas de alguns derivados do SNAP por associação a unidades de açúcar da família da glucose.....26

Figura 1.7 – Estruturas de alguns 1-nitrosotioaçúcares.....27

Figura 1.8 – Estrutura geral dos S-nitrosopéptidos.....27

Figura 1.9 – Estruturas do S-nitrosodiclofenac (1) e S-nitrosoibuprofeno (3)...28

Figura 1.10 – Estrutura da S-nitrosoflucasona.....29

Figura 1.11 – NO híbridos para tratamento da impotência sexual.....29

Figura 1.12 – Estruturas da N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e N-metil-N-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (MNTS).....31

Figura 1.13 – Estruturas da 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) e da 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG).....32

Figura 2.1 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.3 para a reacção de transnitroação da NOTSG para a cisteína a pH=11,11.....45

Figura 2.2 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.4 para a reacção de transnitrosação da NOTSG na presença de metil-3-mercaptopropionato a pH=10,05.....	46
Figura 2.3 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.3 para a reacção de transnitrosação da NOTSG na presença de etanotiol a pH=12,15.....	46
Figura 3.1 – Estrutura da N-metil-N-nitroso- <i>p</i> -toluenossulfonamida (MNTS)...	49
Figura 3.2 – Estruturas das N-nitrosoguanidinas: 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) e 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG).....	49
Figura 3.3 – Estruturas das guanidinas: 1-metil-3-benzoilguanidina (BMG) e 1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (TSG).....	50
Figura 3.4 – Estrutura do aminoácido L-cisteína. Funções ionizáveis assinaladas a vermelho. Carbono assimétrico α assinalado com *	50
Figura 3.5 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOTSG em tampão de 2-mercaptoetanol a pH=8,80.....	51
Figura 3.6 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOBMG em tampão de 2-mercaptoetanol a pH=9,60.....	52
Figura 3.7 – Influência da concentração total 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOTSG a 25°C; pH=[8,78 - 10,07]..	53
Figura 3.8 – Influência da concentração total 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOBMG a 25°C; pH=[8,66 - 10,57].	53
Figura 3.9 – Influência da concentração total de 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOTSG a 25°C; pH=[10,48 - 11,00].....	54
Figura 3.10 – Influência da concentração total de 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOBMG a 25°C; pH=[11,00 - 12,00].....	54
Figura 3.11 – Influência do pH na constante de velocidade bimolecular aparente de transnitrosação, k_{tr}^{ap} , da NOTSG e da NOBMG para o 2-mercaptoetanol a 25°C.....	56
Figura 3.12 – Influência da $[H^+]$ (eixo do xx em escala logarítmica) na constante k_{tr}^{ap} para as reacções de transnitrosação da NOTSG, e da NOBMG, para o 2-mercaptoetanol a 25°C, com linhas de ajuste à equação 3.10.....	60

Figura 3.13 – Variação do quociente $[H^+]/k_{tr}^{ap}$ em função de $[H^+]$ (eixo do xx e yy em escala logarítmica) relativa à reacção de transnitrosação da NOTSG, e da NOBMG, para o 2-mercaptoetanol a 25°C, com linhas ajuste à equação 3.11.....	60
Figura 3.14 – Estabilização do anião da NOBMG por ponte de hidrogénio intramolecular (I) e estrutura ressonante possível para sulfonamidas (II).....	62
Figura 3.15 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOTSG em tampão de cisteína a pH=11.....	65
Figura 3.16 – Influência da concentração total cisteína na constante k_{obs} para a reacção com a NOTSG a 25°C; pH=[8,48-10,36].....	65
Figura 3.17 – Influência da concentração total cisteína na constante k_{obs} para a reacção com a NOTSG a 25°C; pH=10,75;10,90 e 11,11.....	66
Figura 3.18 – Influência do pH na constante de velocidade bimolecular aparente de transnitrosação, k_{tr}^{ap} , da NOTSG para a cisteína a 25°C.....	67
Figura 3.19 – Influência da $[H^+]$ na constante k_{tr} , na reacção de transnitrosação da NOTSG para a cisteína a 25°C, com linha de ajuste à equação 3.20.....	71
Figura 3.20 – Influência da $[H^+]$ (eixo do xx em escala logarítmica) na constante k_{tr} , na reacção de transnitrosação da NOTSG para a cisteína a 25°C, com linha de ajuste à equação 3.20.....	71
Figura 3.21 – Variação de denominador x k_{tr}^{ap} em função de $[H^+]$, com linha de ajuste à equação 3.21. a) ampliação com escala logarítmica no eixo dos xx. Intervalo assinalado a vermelho: $8 \times 10^{-12} < [H^+] < 8 \times 10^{-10}$ M.....	73
Figura 3.22 – Correlações de Brønsted relativas às reacções de transnitrosação da NOBMG e NOTSG para alguns nucleófilos de enxofre.....	75
Figura 3.23 – Estado de transição da reacção de transnitrosação das N-nitrosoguanidinas para nucleófilo.....	77

Índice de esquemas

Esquema 1.1 – Possíveis reacções do NO em solução aquosa.....	6
Esquema 1.2 – Possíveis reacções do NO ⁺ em solução aquosa.....	6
Esquema 1.3 – Possíveis reacções do NO ⁺ em solução aquosa.....	7
Esquema 1.4 – Síntese de NO endógeno realizada pelas enzimas NOS.....	7

Lista de abreviaturas e símbolos

A ⁻	base conjugada de um ácido
AA	aminoácido
Abs	absorvância
Ac	acetil
ACN	acetonitrilo
A _f	absorvância final
AH	ácido
A _i	absorvância inicial
AINES	anti-inflamatórios não esteróides
Ala	alanina
Asp	aspartato
BMG	1-metil-3-benzoílguanidina
<i>b</i>	ordenada na origem
c.c.f.	cromatografia em camada fina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CDO	comprimento de onda
Cys	cisteína
<i>d</i>	duplete
DNA	ácido 2-desoxirribonucleico
DMSO	dimetilssulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
Gly	glicina
Glu	glutamato
GSNO	S-nitrosoglutamina
HNOTSG	NOTSG na forma neutra
HXNO	N-nitrosoguanidina na forma neutra
I.V.	Infravermelho
IECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
Ile	isoleucina
J	constante de acoplamento
<i>k</i>	constante de velocidade de transnitrosação
<i>k</i> ₁	constante de velocidade de transnitrosação 1
<i>k</i> ₂	constante de velocidade de transnitrosação 2
K _a	constante de acidez
K _d	constante de equilíbrio de dessolvatação
K _{obs}	constante de velocidade observada
K _{OH⁻}	constante de velocidade bimolecular de hidrólise básica

k_{tr}^{ap}	constante de velocidade bimolecular aparente de transnitrosação
L-Arg	L-arginina
L-Cit	L-citrulina
Leu	leucina
M	molar (mol/dm ³)
m	declive
<i>m</i>	multiplete
Met	metionina
MNNG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
MNTS	N-metil-N-nitroso- <i>p</i> -toluenossulfonamida
NADP ⁺	nicotina adenina dinucleótido (estado oxidado)
NADPH	nicotina adenina dinucleótido (estado reduzido)
NOBMG	1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina
NOS	NO sintetase
NOTSG	1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina
NOTSG ⁻	NOTSG na forma aniónica
NOX	agente nitrosante
Nu	Nucleófilo
p.a.	pure analysis
p.f.	ponto de fusão
Phe	fenilalanina
ppm	partes por milhão
Pro	prolina
R.M.N.	ressonância magnética nuclear
RS ⁻	ião tiolato
RSH	tióis
RSNO	S-nitrosotióis
RSSR	dissulfureto
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
CuZn-SOD	Cu/Zn superoxidase dismutase
t	tempo
<i>t</i>	tripleto
T	total
TSG	1- metil-3-toluenossulfonilguanidina
U.V.	ultravioleta
U.V.-Vis	ultravioleta-vísivel
V	volume
XNO	N-nitrosoguanidina
XNO ⁻	N-nitrosoguanidina na forma aniónica
Δ	calor

β_d	parâmetro de Brønsted de dessolvatação
β_{nuc}	parâmetro de Brønsted nucleofílico observado
β'_{nuc}	parâmetro de Brønsted nucleofílico
δ	desvio químico
ε	absortividade molar
η	rendimento
λ	comprimento de onda

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. Introdução

Compostos de nitrosilo ou nitrosocompostos, são compostos orgânicos contendo o grupo funcional nitroso ($-N=O$) o qual pode estar directamente ligado a um átomo de carbono, azoto, oxigénio, enxofre, halogénio ou ainda a um metal de transição, dando origem uma variedade de nitrosocompostos chamados de C-, N-, O- ou S-nitroso, de haletos de nitrosilo ou de complexos de nitrosilo metálicos, respectivamente.

Os nitrosocompostos são conhecidos há mais de cem anos e o interesse pela sua química, assim como pelas reacções de nitrosação, despertou na década de 1950 com a descoberta do potencial carcinogénico dos N-nitrosocompostos,¹ primeiramente da nitrosodimetilamina, e posteriormente de uma centena de compostos semelhantes incluindo as nitrosoamidas.²

Por este motivo, a exposição a compostos do tipo N-nitroso acrescida da possível formação dos mesmos *in vivo*, a partir de substratos nitrosáveis de ocorrência natural (aminas, aminoácidos, ureias, guanidinas, etc.) e agentes nitrosantes eventualmente presentes no organismo (como o ião nitrito o qual em condições acídicas do estômago gera ácido nitroso³), tornou-se um elevado risco para a saúde pública e, como consequência, este tipo de compostos têm sido alvo de amplo interesse científico.

Para além do interesse biomédico, a nível físico-químico, os processos de nitrosação também se têm revelado muito ricos do ponto de vista mecanístico, sendo muitas dessas reacções já conhecidas e claramente compreendidas.⁴ Inicialmente, devido aos riscos de citotoxicidade associados, muitas das reacções estudadas concentraram-se apenas na nitrosação de

¹ P. N. Magee, J. N. Barnes, *Brit. J. Cancer*, 1956, **10**, 114-122.

² H. Drukei, R. Prussman, D. Schmahl, R. Preussman, H. Hampel, *Naturwissenschaften*, 1960, **47**, 89.

³ a) S. S. Mirvish, *Toxicol. & Appl. Pharmacol*, 1975, **31**, 325-351. b) S. S. Mirvish, *Cancer Letters*, 1995, 93,17-48. c) Y. L. Kostyukoskii, D. B. Melamed, *Russ. Cem. Rev.*, 1988, **57**, 350.

⁴ C. M. C. Faustino, in *Benzoílnitrosoureias-Reacções de Hidrólise e de Trans-Nitrosação*, Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2002, 71.

aminas contudo, nos últimos tempos, os estudos têm sido alargados à nitroação de outros centros diferentes do azoto,⁵ nomeadamente o enxofre.

Com a surpreendente descoberta da síntese *in vivo* do óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina,^{6,7,8} e da sua participação em inúmeros processos biológicos como a vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão e função erétil,^{9,10,11} vários estudos têm sido realizados no que respeita à química e biologia do NO endógeno, levando progressivamente a uma melhor compreensão do seu papel nos sistemas vivos e das suas possíveis potencialidades terapêuticas. Muitos desses estudos levaram também à identificação de S-nitrosotióis (RSNO) existentes *in vivo* como participantes no metabolismo do óxido nítrico,^{12,13,14} e com potencialidades idênticas às do próprio óxido nítrico livre.^{13,15} Deste modo, a química dos nitrosocompostos adquiriu uma nova perspectiva, muito em especial no que diz respeito à possível capacidade de doação de NO quer *in vivo*, quer *in vitro*.

Ainda relacionado com este tema, também aumentou o interesse pelas reacções de S-nitroação de tióis com formação de RSNO, assim como o estudo do envolvimento destas espécies químicas no metabolismo do próprio NO.

⁵ D. L. H. Williams in *Nitrosation Reactions and The Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier: B. V., Amsterdam, 2004, 137-160.

⁶ R. F. Furchgott., *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, **38**, 1870-80.

⁷ L. J. Ignarro, *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, **38**, 1882-92.

⁸ F. Murad, *Angew. Chem., Int. Ed.* 1999, **38**, 1856-68.

⁹ A. R. Butler, D. L. H. Williams, *Chem. Soc. Rev.*, 1993, **22**, 233-241.

¹⁰ L. J. Ignarro, *J. Physiology and Pharmacology*, 2002, **53**, 4, 503-514.

¹¹ D. L. H. Williams, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 441-449.

¹² N. Hogg, *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, **28**, 10, 1478-1486.

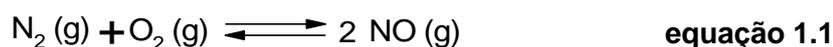
¹³ N. Hogg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, **42**, 585-600.

¹⁴ G. Richardson, N. Benjamin, *Clinical Science*, 2002, **102**, 99-105.

¹⁵ D. L. H. Williams, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 869-76.

1.1. Óxido Nítrico

Até 1987 o óxido nítrico era visto como um poluente atmosférico gerado a elevadas temperaturas a partir do azoto e oxigénio (equação 1.1), capaz de originar problemas respiratórios, quando oxidado no ar, devido à formação dos gases $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$, e irritabilidade ocular devido à formação de compostos provenientes da sua reacção com hidrocarbonetos.



As elevadas temperaturas encontradas em processos industriais e motores de carros são potenciais geradores de óxido nítrico e por esse motivo, como forma de minimizar a formação e libertação do óxido nítrico, foram criados catalisadores nos tubos de escape dos carros capazes de converter o NO em N_2 assim como, o monóxido de carbono (CO) em dióxido de carbono (CO_2). A nível industrial, também com o mesmo objectivo, foi possível a diminuição da temperatura de muitos processos químicos e consequentemente diminuir a emissão do óxido nítrico. Ainda assim, nos dias de hoje, a nível mundial, são produzidas anualmente várias toneladas de NO o qual, naturalmente se dissipa na atmosfera.⁵

De 1987 em diante, mediante a descoberta de que o NO é sintetizado *in vivo* e é um mensageiro biológico de elevada importância, a visão negativa acerca deste composto foi rapidamente substituída por um crescente interesse científico.

Actualmente, ao realizar uma pesquisa na PubMed com a palavra-chave “nitric oxide” surgem cerca de 100.000 referências tornando um pouco difícil a elaboração de uma revisão bibliográfica actual acerca do tema.

No ponto 1.1.1 deste capítulo serão abordadas as questões que pareceram ser mais relevantes acerca deste composto, encontradas essencialmente em trabalhos de revisão.

Na tabela 1.1 encontram-se descritas algumas espécies resultantes da oxidação ou redução do óxido nítrico que poderão vir a ser mencionadas ao longo deste trabalho.

Tabela 1.1 – Espécies químicas de azoto provenientes do óxido nítrico.

<i>Espécie química</i>	<i>Fórmula Química</i>	<i>Grupo funcional</i>	<i>Nome</i>	<i>Tipo de ligação</i>
Óxido nítrico	NO ou NO.	R-NO	Nitroso	Covalente
Ião nitrosónio	NO ⁺	R-NO ₂	Nitro	Covalente
Ião nitrito	NO ₂ ⁻	R-ONO	Nitrito	Covalente
Ião nitrato	NO ₃ ⁻	R·NO	Nitrosilo	Coordenação (R=metal)
Tetróxido de azoto	N ₂ O ₄			
Trióxido de azoto	N ₂ O ₃			
Óxido nitroso	N ₂ O			
Dióxido de azoto	NO ₂ ou NO ₂ .			
Peroxinitrito	ONOO ⁻			
Peroxinitrato	O ₂ NOO ⁻			
Amónia	NH ₃			

1.1.1. Propriedades do óxido nítrico

O óxido nítrico é uma das moléculas mais pequenas encontradas *in vivo*, é electricamente neutra e de carácter radicalar. À temperatura ambiente é um gás incolor, com solubilidade satisfatória em água mas cerca de 70 vezes mais solúvel em solventes hidrofóbicos,^{16,17} permitindo assim a fácil difusão em compartimentos celulares e transmissão de informação em diferentes alvos celulares.

O seu electrão desemparelhado confere-lhe propriedades paramagnéticas responsáveis pela inibição da sua possível dimerização e consequente aumento da reactividade com uma variedade de átomos e outros radicais.¹⁸

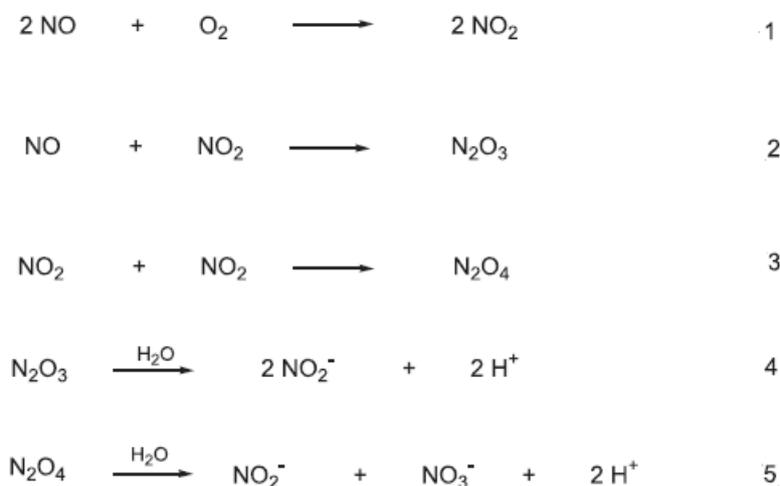
Tanto na fase gasosa como na fase aquosa, o óxido nítrico reage com o oxigénio molecular formando o dióxido de azoto (NO₂) o qual, por sua vez, pode reagir com nova molécula de NO e produzir o trióxido de azoto (N₂O₃), ou pode reagir com o próprio NO₂ gerando o tetróxido de azoto (N₂O₄) por um processo de dimerização (equações 1 a 3 do esquema 1.1). Estas espécies

¹⁶ H. Al-Sa'Doni and A. Ferro, *Clinical Science*, 2000, **98**, 507-20.

¹⁷ D. Giustarini, A. Milzani, R. Colombo, I. Dalle-Donne, R. Rossi, *Clinica Chimica Acta*, 2003, **330**, 85-98.

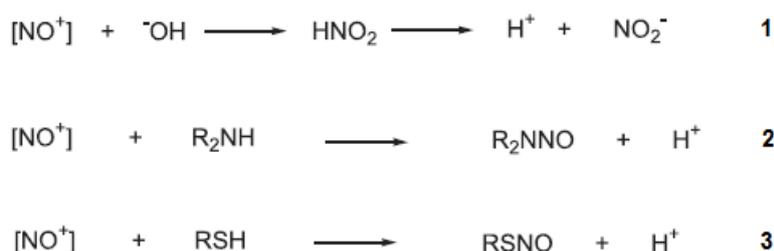
¹⁸ A. Butler, D. L. H. Williams, *Chem. Soc. Rev.*, 1993, **22**, 233-41.

reagem rapidamente com a água para originar os iões nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (equações 4 e 5 do esquema 1.1).



Esquema 1.1 – Possíveis reacções do NO em solução aquosa.¹⁹

Tanto o N_2O_3 como o N_2O_4 são considerados potenciais dadores de ião nitrosónio (NO^+).^{5,19} Este intermediário pode ser transferido para vários nucleófilos presentes em moléculas (grupos hidroxilo, aminas ou tióis) podendo levar à formação de nitrito, N-nitrosoaminas e S-nitrosotióis respectivamente, de acordo com as equações 1 a 3 do esquema 1.2¹⁹ (este assunto será discutido mais à frente neste capítulo em 1.3.2 alínea b).



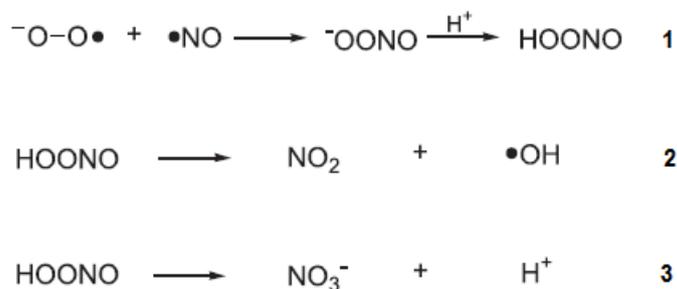
Esquema 1.2 – Possíveis reacções do NO^+ em solução aquosa.¹⁹

Ainda pode ocorrer reacção do NO com o radical superóxido ($\text{}^-\text{O}_2$) formando-se peroxinitrito (ONO_2^-) o qual, a pH neutro, é rapidamente protonado para formar o ácido peroxinitroso (HONO_2) (equação 1 do esquema 1.3). O

¹⁹ R. L. Barreto, C. R. D. Correia, *Química Nova*, 2005, **28**, 6, 1046-54.

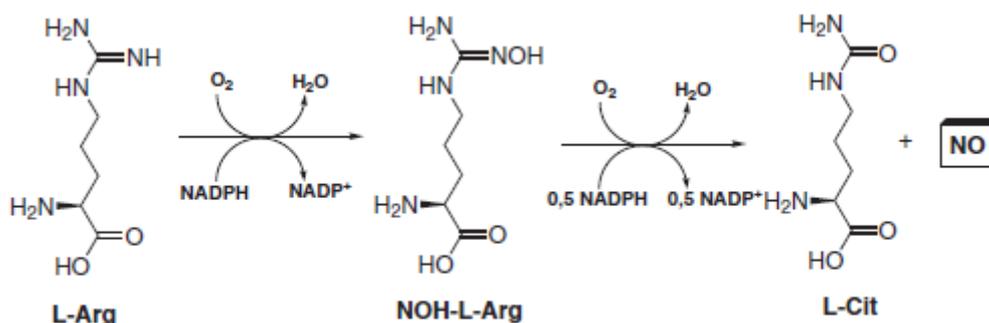
ácido peroxinitroso, devido à sua elevada instabilidade, decompõe-se rapidamente para dar o ião nitrato (equações 2 e 3 do esquema 1.3).

A participação do óxido nítrico na formação de espécies altamente oxidantes, como o peroxinitrito e ácido peroxinitroso, tem elevado impacto biológico uma vez que estas espécies estão associados a processos oxidativos que provocam dano celular.^{5,19}



Esquema 1.3 – Possíveis reacções do NO⁺ em solução aquosa.¹⁹

O óxido nítrico é sintetizado *in vivo* pela família das enzimas NO sintetases (NOS), as quais são responsáveis pela oxidação da L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-Cit), de acordo com o esquema 1.4.



Esquema 1.4 – Síntese de NO endógeno realizada pelas enzimas NOS.¹⁹

O tempo de vida médio do NO *in vivo* é de poucos milissegundos (ms) e a sua velocidade de difusão é 50 μm s⁻¹.¹⁷ Estes dados sugerem que o óxido nítrico é capaz de exercer a sua acção biológica apenas a poucos μm do seu local de formação contudo, ainda que pouco esclarecida, sabe-se que ocorre a conversão *in vivo* do NO em S-nitrosotióis.¹⁶ Os RSNO formados, por serem mais estáveis do que o próprio NO livre, mostraram ser uma forma de

preservar o NO endógeno e permitir a transferência dos seus efeitos para outros locais alvo.^{17,20,21}

1.1.2. Papel biológico do óxido nítrico

A importância biológica do óxido nítrico deve-se ao facto deste actuar como um segundo mensageiro, activando ou inibindo diversas moléculas alvo envolvidas em processos fisiológicos tão diversos como vasodilatação, neurotransmissão, controlo imunológico, inflamação, e morte celular.^{9-11,19,22}

O óxido nítrico afecta a maioria destes processos ligando-se a receptores acoplados à enzima guanilato ciclase citosólica promovendo a sua activação. Esta enzima quando activada sintetiza o mensageiro GMP cíclico (cGMP) que por sua vez activa uma série de outras enzimas envolvidas na transdução de sinal.

Assim, o NO é o responsável, nas células endoteliais, pelo relaxamento do músculo liso, pela vasodilatação e consequentemente pela inibição dos processos de adesão e agregação plaquetária.^{12,13,19}

Relativamente à resposta inflamatória, o NO é produzido em quantidades significativas em macrófagos e outras células do sistema imunitário, provocando danos oxidativos letais nas células-alvo tal como as cancerosas e bactérias.^{19,22} Como exemplo, em situações de artrite reumatóide ocorre a formação NO e é possível a sua detecção nas articulações afectadas.¹⁶

A nível do sistema nervoso central e periférico, o NO, ainda que de modo não totalmente elucidado, actua como neurotransmissor, mediando a capacidade sináptica na transmissão de impulsos nervosos¹⁹ e potenciando a libertação de outros neurotransmissores e hormonas.

²⁰ A. Hirayama, A. A. Noronha-Dutra, M. P. Gordge, G. H. Neild and J. S. Hothersall, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1999, **3**, 2, 95-104.

²¹ Y. Zhang, N. Hogg, *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, **38**, 831-38.

²² B. Bonavida, S. Khineche, S. Huerta-Yepez, H. Garbán, *Drug Resistance Updates*, 2006, **9**, 157-73.

Sabe-se ainda que consoante os níveis celulares de óxido nítrico, este é capaz de regular a produção de uma série de factores de transcrição e ainda está envolvido na activação/inibição da apoptose celular.²²

Em condições de elevada concentração de NO endógeno, como forma de armazenar esse excesso, ocorre a reacção do óxido nítrico com tióis como a cisteína ou grupos tiol de outras biomoléculas (glutathiona, albumina e hemoglobina) dando origem aos S-nitrosotióis os quais, como já referido, apresentam capacidades fisiológicas idênticas às do próprio óxido nítrico¹²⁻¹⁵ uma vez que se assume a sua possível decomposição para gerar NO. No entanto, existem também evidências de que estas espécies químicas podem exhibir efeitos directos não envolvendo a libertação do NO ou então, a libertação de óxido nítrico tem lugar em determinado local apresentando funcionalidades distintas do óxido nítrico livre.¹²

Deste modo, sendo o óxido nítrico uma molécula mensageira *in vivo*, qualquer alteração endógena nos seus níveis de concentração, pode ser a causa de vários processos fisiopatológicos. Por exemplo, em situações de diminuição da produção de NO pode resultar em situações de hipertensão, angina de peito e impotência sexual. Em casos de superprodução do NO podem ocorrer respostas inflamatórias severas ou até mesmo o enfarte do miocárdio. Neste sentido, surgem duas possíveis abordagens terapêuticas para o tratamento destas doenças: a inibição da NO sintetase (no caso da superprodução de NO) e o uso de espécies químicas dadoras de NO como forma de aumentar a sua biodisponibilidade (no caso de diminuição da produção de NO).

Nesta última abordagem terapêutica, existem muitos tipos de compostos que podem funcionar como dadores de óxido nítrico onde estão incluídos os S-nitrosotióis e por este motivo, os pontos 1.2 e 1.3 deste capítulo serão dedicados às reacções de formação de S-nitrosotióis, características e reactividade dos mesmos, em especial sob o ponto de vista de formação do óxido nítrico. No ponto 1.4 será feito um resumo sobre alguns compostos considerados dadores de NO com especial ênfase para os RSNO e as suas potencialidades terapêuticas.

1.2. S-nitrosação

De todas as reacções de nitrosação, as mais conhecidas e mais bem documentadas durante um longo período foram as de N-nitrosação, facto que tem sido de elevada importância quer a nível sintético, industrial, biológico, assim como mecanisticamente. A C-nitrosação de sistemas alifáticos e aromáticos também se encontra bem documentada⁵ e a síntese de nitritos de alquilo (RONO) a partir de álcoois representa um bom exemplo de O-nitrosação.²³

Relativamente à S-nitrosação pouco era conhecido muito em parte devido à instabilidade das espécies S-nitroso formadas. Só mais tarde, motivado pela descoberta das propriedades biológicas em torno do óxido nítrico e dos S-nitrosotióis, é que aumentou o interesse pela área da S-nitrosação quer do ponto de vista sintético, quer do mecanístico, tendo sido facilitado o seu estudo com o desenvolvimento de técnicas de manuseamento de compostos instáveis, métodos e equipamento que permitiram o seguimento das reacções envolvidas que até então, por serem demasiado rápidas, era impossível a determinação das suas constantes de velocidade.

1.2.1. Nitrosação de tióis

O exemplo mais simples de S-nitrosação na química orgânica deverá ser a nitrosação de tióis (RSH) com formação de RSNO, também designados de tionitritos. A reacção de tióis, quer alifáticos, quer aromáticos, com qualquer um dos agentes nitrosantes (NOX) amplamente descritos na literatura⁵ (ácido nitroso, haletos de nitrosilo, sais de nitrosónio, nitritos de alquilo, óxidos de azoto, ião nitrito e complexos de nitrosilo de metais de transição) é possível e deve ocorrer de acordo com a equação 1.2.



²³ D. L. H. Williams, *Chemical Society Reviews*, 1985, **2**, 171-96.

Aparentemente a reacção parece ser bastante generalizada para todos os tióis a nitrosar, assim como para todo o leque de agentes nitrosantes incluindo os nitritos de alquilo.²³ Por exemplo, a formação de dois RSNO bastante conhecidos e estáveis no seu estado sólido, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e S-nitrosoglutationa (GSNO), é rapidamente conseguida colocando os correspondentes tióis livres na presença de ácido nitroso proveniente de soluções acidificadas de ácido nitroso e usando o metanol como co-solvente.^{24,25}

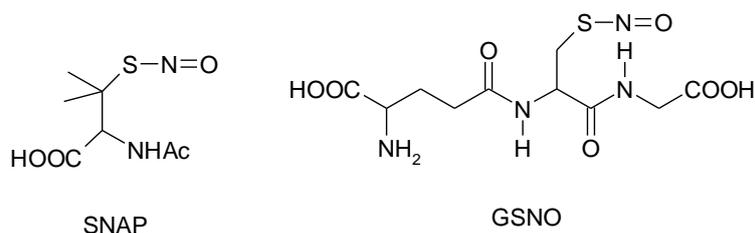


Figura 1.1 – Estruturas dos RSNO SNAP e GSNO.

As soluções de outros RSNO não estáveis no seu estado puro podem ser rapidamente geradas em solução usando o mesmo modo de nitrosação (equação 1.3) e podem ser utilizadas *in situ*, para realização de estudos sintéticos e mecanísticos.



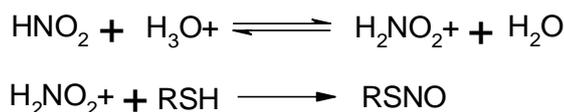
Um estudo cinético da reacção do ácido nitroso com vários tióis mostrou que a equação de velocidade de terceira ordem era obedecida (equação 1.4), sendo efectivamente responsáveis pela nitrosação as espécies H_2NO_2^+ e NO^+ (esquemas 1.5 e 1.6).^{5,26}

$$V = k[\text{HNO}_2][\text{H}_3\text{O}^+][\text{RSH}] \quad \text{equação 1.4}$$

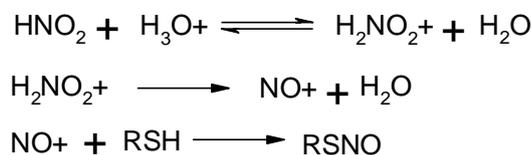
²⁴ L. Field, R. V. Dilts, R. Ravichandran, P. G. Lendhert and G. E. Carnahan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1978, 249-50.

²⁵ T. W. Hart, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 2013-2016.

²⁶ L. Grossi and P. C. Montevicchi, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 8625-30.



Esquema 1.5 – Formação de RSNO por nitroação de tióis com a espécie H_2NO_2^+ .



Esquema 1.6 – Formação de RSNO por nitroação de tióis com a espécie NO^+ .

Na nitroação de tióis a reacção parece ter lugar através de um passo reaccional limitante da velocidade de ataque da espécie nitrosante ao átomo de enxofre do tiol, tal como também acontece na nitroação de aminas, não existindo nenhuma evidência de formação de intermediário ou transferência protónica limitante da velocidade.⁵

As reacções de S-nitroação são processos muito rápidos, sendo necessárias técnicas como a espectrofotometria de stopped-flow para a sua monitorização e determinação das constantes de velocidade. Comparativamente com o processo de N-nitroação, a nitroação de tióis é em geral muito mais rápida do que a nitroação de aminas uma vez que, para as últimas, existe a possibilidade de ligeira protonação no local de ataque provocando repulsões do tipo electrostáticas. Assim sendo, em reagentes contendo ambos os centros de enxofre e azoto, a S-nitroação será a reacção preferencial, contudo, poderá ocorrer posteriormente rearranjo interno com formação da ligação N-NO como já foi provado para o caso da S-nitrosocisteína.^{27,28}

A S-nitroação em soluções aquosas, ou na presença de solventes orgânicos, usando como agentes nitrosantes os nitritos de alquilo também está bem documentada, sendo o nitrito de *t*-butilo e o nitrito de etilo os mais utilizados para este fim.²⁹ Os nitritos de alquilo são capazes de S-nitroação

²⁷ C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis and L. Ribeiro, *J. Org. Chem.*, 2005, **70** (16), 6353-61

²⁸ L. A. Peterson, T. Wagener, H. Sies, and W. Stahl, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 721-23.

²⁹ P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai and A. Janczuk, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 4, 1091-134.

selectiva, mesmo quando na presença de grupos amina primários.²⁹ Para esta reacção verificou-se que a capacidade nitrosante dos nitritos de alquilo é claramente influenciada pelo efeito electroatractor do grupo substituinte, ou seja, quanto maior a electroatracção do grupo substituinte, maior a capacidade nitrosante do nitrito de alquilo. A velocidade da S-nitrosação com estes reagentes é ainda dependente do pH até valores de pH≈10, permanecendo depois constante para valores de pH superiores o que sugere que a reacção decorre via ião tiolato.³⁰ A nitrosação dos resíduos β Cys93 da hemoglobina reportada por Doyle em 1984,³¹ é um dos exemplos de S-nitrosação, usando nitritos de alquilo, com importância biológica.

Existem também referências à nitrosação directa de tióis, incluindo a cisteína e glutathiona, usando NO/O₂ a diversos valores de pH, nomeadamente o fisiológico.^{5,32,33} Sharma e seus colaboradores mostraram que a pH=7,0 o NO não era capaz de promover nitrosação de tióis a não ser que estivesse na presença de oxigénio, sugerindo que a espécie nitrosante activa seria o N₂O₃,³⁴ com formação de RSNO e ião nitrito em solução (equação 1.5).



Outras vias menos comuns para a formação de S-nitrosotióis incluem a reacção entre o radical RS• (formado por reacção fotolítica de dissulfuretos) e o óxido nítrico,³⁵ ou a reacção de dissulfuretos com o gás N₂O₄.³¹

1.3. S-nitrosotióis

Os S-nitrosotióis foram pela primeira vez sintetizados em 1909.²⁹ Estes compostos são na maioria bastante instáveis, especialmente os RSNO

³⁰ H. M. S. Patel, D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1989, 339-41.

³¹ J. Lee, L. Chen, A. H. West and G. B. Richter-Addo, *Chemical Reviews*, 2002, **102**, 4, 1019-65.

³² A. Keszler, Y. Zhang, N. Hogg, *Free radical Biology & Medicine*, 2010, **48**, 55-64

³³ A. Schramel, A. C. F. Gorren, K. Schmidt, S. Pfeiffer and B. Mayer, *Free radical Biology & Medicine*, 2003, **34**, 8, 1078-88.

³⁴ V. G. Kharitonov, A. R. Sundquist, V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 28158-64.

³⁵ D. L. H. Williams, *Nitric Oxid: Biology and Chemistry*, 1997, **1**, 6, 522-27.

primários e secundários. Nas figuras 1.1 e 1.2 encontram-se representados alguns RSNO que já foram isolados e caracterizados,^{5,29} como por exemplo o derivado da cisteína (3), derivados dos açúcares glucose (4) e galactose (5), derivado do SNAP contendo o grupo amidina (7) e ainda o S-nitrosocaptopril (8).

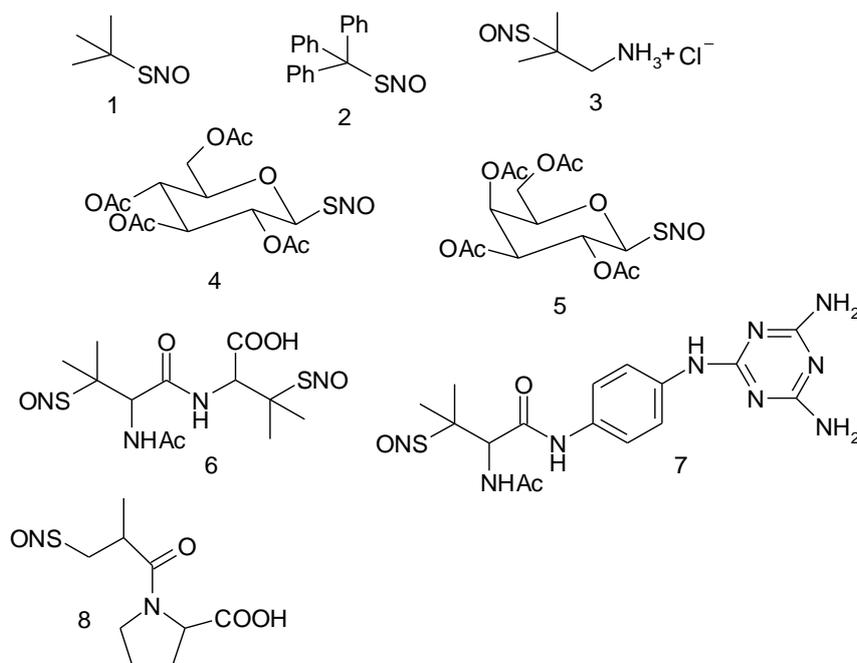


Figura 1.2 – Estruturas de alguns RSNO estáveis no seu estado puro.

1.3.1. Propriedades dos S-nitrosotióis

Os RSNO, em geral, são compostos de cor rosa ou avermelhada quando são estruturas primárias (do tipo GSNO) ou secundárias (como os derivados 4 e 5 da figura 1.2). No caso dos S-nitrosotióis terciários (como o SNAP ou os compostos 1, 2 e 3 da figura 1.2) a cor geralmente é verde.

Os espectros de U.V.-Vis dos S-nitrosotióis apresentam normalmente três bandas de absorção típicas^{15,29,31}: duas bandas intensas na zona do ultravioleta e uma mais fraca na zona do visível. A primeira banda geralmente encontra-se entre os 225-261 nm ($\epsilon \approx 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e é devida à transição electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$. A segunda banda de absorção ocorre entre os 300-350 nm ($\epsilon \approx 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e é devida à transição electrónica $n \rightarrow \pi^*$. Finalmente a terceira banda, responsável pela cor dos compostos, encontra-se na região entre 550-

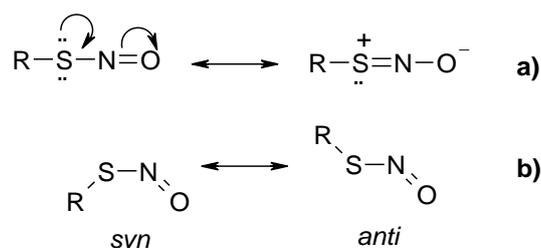
600 nm e é atribuída à transição $n_N \rightarrow \pi^*$. As duas últimas, em especial a que se encontra entre os 300-350 nm, são frequentemente utilizadas na monitorização da formação dos RSNO assim como das suas reacções em solução.

A espectroscopia de I.V. também é útil na caracterização do grupo S-NO dado que para a maioria dos S-nitrosotióis a absorção da ligação NO ocorre entre 1480-1530 cm^{-1} .

Relativamente aos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN, verifica-se que a S-nitrosação provoca desblindagem quer nos prótons α , relativamente aos mesmos prótons dos tióis ou dissulfuretos correspondentes (≈ 1 ppm), quer nos carbonos α ($\approx 7-13$ ppm), sendo bastante acentuado o efeito de desblindagem no espectro de ^{13}C RMN dos RSNO terciários.³¹

Estudos de ^{15}N RMN mostraram que os desvios químicos do ^{15}N para RSNO primários e terciários são respectivamente à volta dos 730 ppm e 790 ppm. Verificou-se ainda que existe uma relação linear entre os seus potenciais de redução dos RSNO e os desvios químicos de ^{15}N RMN, assim como com os valores dos pK_a dos correspondentes tióis,⁵ o que torna possível prever a capacidade redox e acídica de novas estruturas.

A ligação S-NO nestes compostos apresenta significativo carácter de ligação dupla devido à deslocalização dos pares de electrões do enxofre para o grupo nitroso. Por este motivo, os RSNO podem apresentar duas formas isoméricas do tipo *syn* e *anti* (esquema 1.7). Por exemplo, a estrutura do S-nitrosocaptopril revelou ser do tipo *syn* relativamente ao grupo SNO enquanto que, por exemplo, a estrutura do SNAP revelou a orientação *anti*. No caso do S-nitrosotiol 1 da figura 1.2, já existe a possibilidade das duas orientações sendo a orientação *anti* a mais estável, no entanto, para o seu análogo 2 o isómero *syn* é de maior estabilidade.³¹



Esquema 1.7 – a) Deslocalização electrónica na ligação S-NO dos RSNO.

b) Isómeros do tipo *syn* e *anti* para os RSNO.

1.3.2. Reacções dos S-nitrosotióis

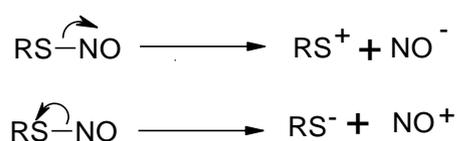
a) Decomposição

A decomposição dos RSNO pode envolver a quebra homolítica ou heterolítica da ligação S-NO. Na decomposição homolítica ocorre a libertação de óxido nítrico (NO) enquanto que, na quebra heterolítica, podem ser geradas as espécies NO^+ ou NO^- (esquema 1.8). A possibilidade de formação de óxido nítrico por decomposição de S-nitrosotióis como a S-nitrosoglutationa e a S-nitrosocisteína, pode então representar um mecanismo para o armazenamento e transporte de óxido nítrico *in vivo*.

Decomposição homolítica:



Decomposição heterolítica:



Esquema 1.8 – Decomposição homolítica/heterolítica da ligação S-NO.

Estão descritas na bibliografia várias formas de induzir a quebra da ligação S-NO (pelo calor, luz ultra-violeta e alguns iões metálicos) as quais serão em seguida brevemente referidas nos pontos a.1) e a.2).

a.1) Decomposição térmica e fotoquímica

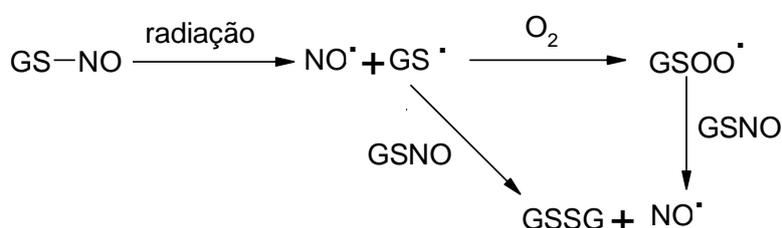
Os RSNO, na maioria, são instáveis à temperatura ambiente ocorrendo decomposição espontânea que origina o correspondente dissulfureto (RSSR) e óxido nítrico. Para os mais estáveis, a decomposição pelo calor também está descrita como um processo que produz os mesmos produtos de reacção (equação 1.6).

O óxido nítrico formado quando na presença de oxigénio molecular é de seguida oxidado para dar dióxido de azoto (NO_2).¹⁵



Para a decomposição térmica destes compostos está proposto um processo que envolve duas etapas: a quebra homolítica da ligação S-NO seguida da dimerização do radical RS^{\bullet} formado com formação do dissulfureto correspondente. Estudos comprovaram que, na etapa da dimerização, quanto maior o impedimento estereoquímico, maior será a estabilidade do RSNO, ou seja, radicais RS^{\bullet} menos impedidos dimerizam mais facilmente do que os radicais mais impedidos.²⁹

Os RSNO são bastante fotossensíveis, em especial à radiação U.V., e está proposta o mesmo tipo de reação para a sua fotodecomposição. Por exemplo, a irradiação da GSNO, em qualquer um dos seus máximos de absorção (340 ou 545 nm) dá origem à libertação de óxido nítrico através de um processo cinético de aproximadamente primeira ordem.³⁶ Os resultados mostraram-se consistentes com o mecanismo proposto no esquema 1.9, ou seja, na ausência de O_2 o radical RS^{\bullet} dimeriza para dar o RSSR correspondente e óxido nítrico, enquanto que, na presença de O_2 , ocorre formação do radical $GSOO^{\bullet}$ o qual posteriormente reage para gerar os mesmos produtos finais que se formam em condições anaeróbicas.³⁷



Esquema 1.9 – Decomposição fotoquímica da GSNO na presença e ausência de O_2 .

a.2) Decomposição em solução

Ainda que a decomposição térmica e fotoquímica dos RSNO ocorra com formação de óxido nítrico, à temperatura ambiente este tipo de cisão não é muito significativa, e para que ocorra a degradação fotoquímica é mesmo necessária a incidência de radiação U.V. Deste modo, talvez seja de maior

³⁶ D. J. Sexton, A. Muruganandam, D. J. Mckenney, B. Mutus, *Photochem. Photobiol.*, 1994, **59**, 463-67.

³⁷ P. D. Wood, B. Mutus, R. W. Redmond, *Photochem. Photobiol.*, 1996, **64**, 518-24.

relevância *in vivo* a eventual decomposição espontânea em solução a pH fisiológico.

Williams e seus colaboradores mostraram que a decomposição dos RSNO em soluções tamponadas e na presença do íon metálico Cu^{2+} (mesmo em quantidades vestigiais) gera óxido nítrico.³⁸ O efeito de catálise por parte do Cu^{2+} mostrou-se claramente marcado ao se realizarem reacções de decomposição na ausência total do íon metálico (por adição do agente quelante EDTA), sem adição de íon e com adição de íon metálico em diversas concentrações como mostra a figura 1.3.

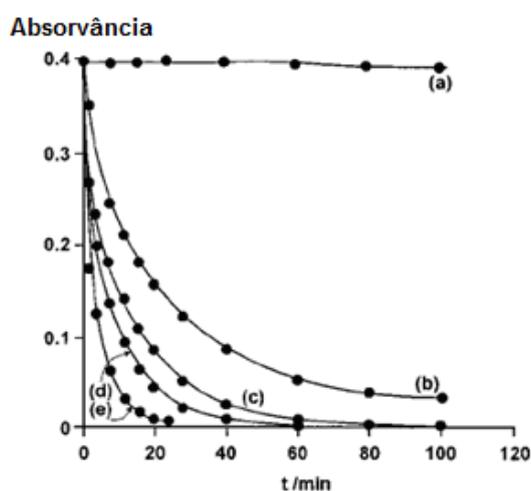


Figura 1.3 – Efeito da $[\text{Cu}^{2+}]$ na decomposição do SNAP³⁸ com (a) EDTA, (b) sem adição de Cu^{2+} , (c) $5 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} , (d) $10 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} , (e) $50 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} .

Mais tarde o mesmo autor, ao verificar total inibição da decomposição dos RSNO na presença do agente quelante neocuprina, com observação da formação do complexo Cu^+ -neocuprina, provou que o catalisador efectivo era afinal o íon Cu^+ gerado em solução por um processo de redução do Cu^{2+} na presença do íon tiolato.³⁹ Mesmo quando o íon Cu^{2+} está ligado a aminoácidos, péptidos ou proteínas (de modo semelhante ao que acontece *in vivo*), este parece estar acessível à redução por parte da cisteína e outros tióis em

³⁸ J. McAninly, D. L. H. Williams, S. C. Askew, A. R. Butler, C. Russel, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1758-59.

³⁹ A. P. Dicks, H. R. Swift, D. H. L. Williams, A. R. Butler, H. H. Al-Sa'doni and B. g. Cox, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 481-87.

solução aquosa a pH fisiológico (pH=7,4), e o Cu^+ formado é o ião responsável pela decomposição dos RSNO com produção de óxido nítrico.⁴⁰

Uma vez comprovado o efeito catalítico do ião Cu^+ acima descrito, seria expectável a influência da concentração de tiol nas velocidades de decomposição do RSNO. De facto, estudos mostraram existir aumento da velocidade de decomposição do S-nitrosotiol com o aumento de adição de tiol uma vez que também ocorria aumento da concentração do agente catalítico Cu^+ , no entanto, a partir de um determinado excesso de tiol, a velocidade de reacção começa a decair aparentemente devido à formação do complexo entre o Cu^{2+} existente em solução e o excesso de tiol existente na forma de tiolato (figura 1.4).⁴¹ No caso da S-nitrosopenicilamina (SNAP) o ponto de *turnover* ocorre aproximadamente a $1 \times 10^{-4} \text{M}$ (figura 1.5).

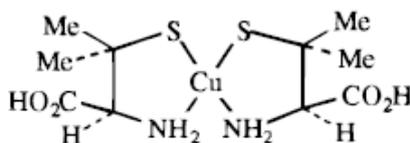


Figura 1.4 – Complexo formado pelo ião Cu^{2+} e os iões tiolato de N-acetilpenicilamina presentes em solução.¹⁵

Uma outra via de decomposição foi encontrada na presença do ião Hg^{2+} , e em menos extensão na presença do ião Ag^+ , a qual origina em solução o tiol livre e ácido nitroso envolvendo a perda de NO^+ em vez de NO .⁵ Não foi encontrada actividade catalítica significativa na decomposição dos RSNO por parte de iões como o Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} ou Fe^{3+} no entanto, existe indicação de pequena catálise por parte do ião Fe^{2+} .¹⁵

Ainda está descrita a decomposição dos S-nitrosotióis na presença de elevada concentração de tiol contendo o mesmo radical do próprio RSNO⁴² (de

⁴⁰ A. P. Dicks, D. H. L. Williams, *Chemistry & Biology*, 1996, **3**, 655-59.

⁴¹ A. P. Dicks, P. Herves Beloso and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 1429-34.

⁴² S. P. Singh, J. S. Wishnock, M. Keshive, W. M. Deen and S. R. Tannenbaum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**, 14428.

modo a evitar reacções de transnitroação). Verificou-se que por esta via ocorre a formação de dissulfureto conjuntamente com amónia, óxido nitroso e ião nitrito (o qual não é proveniente da decomposição aeróbica do óxido nítrico) através de um mecanismo complexo. A reacção revelou-se independente de catálise pelo Cu^{2+} e decorre na presença de agentes quelantes de metais.⁴³

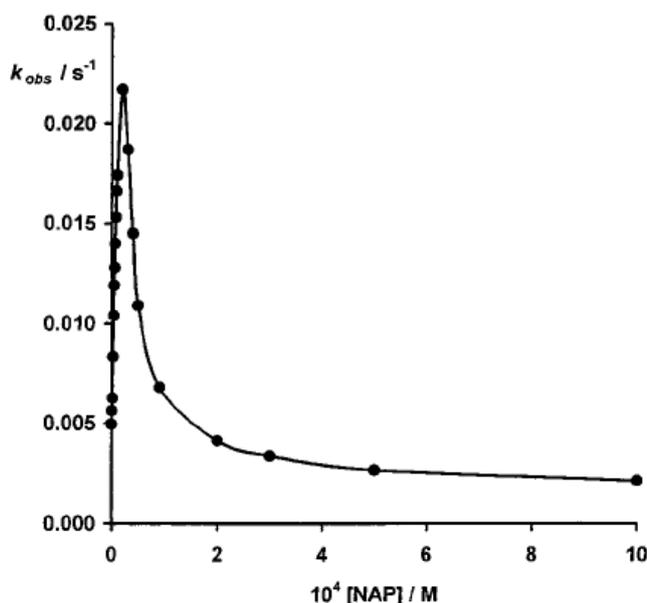


Figura 1.5 – Influência da concentração de N-acetilpenicilamina (NAP) na constante k_{obs} para a decomposição do SNAP.¹⁵

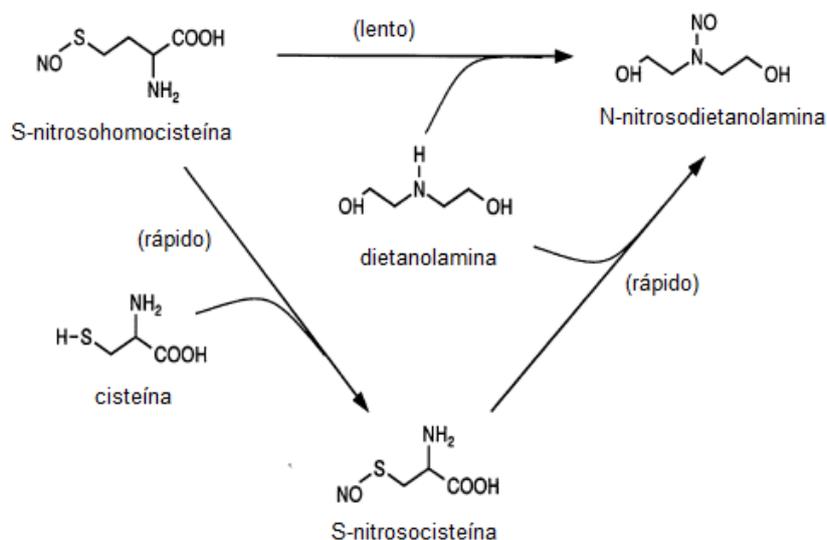
b) Reacções com nucleófilos

Outro tipo de reacção importante para os S-nitrosotióis, no contexto da possível formação de óxido nítrico, é aquela que envolve a transferência directa do grupo nitroso na forma de NO^+ para um centro nucleofílico. Aqui não ocorre formação de óxido nítrico livre, mas existe a possibilidade de ocorrer formação de um novo nitroso composto com elevada capacidade de gerar NO em solução ou, na perspectiva de armazenamento e transporte do NO, pode ocorrer formação de uma nova espécie nitrosada de maior estabilidade em solução.

⁴³ A. P. Dicks, E. Li, A. P. Munro, H. R. Swift, and D. L. H. Williams, *Can. J. Chem.*, 1998, **76**, 6, 789–794.

Este tipo de reacção, habitualmente chamada de transnitroação, tem sido estudado para centros nucleófilos de azoto, enxofre e de oxigénio.⁴⁴

Em 1979 Dennis *et al.*⁴⁵ descreveram a transnitroação de S-nitrosotióis para aminas secundárias (com formação de nitrosoaminas estáveis de elevado potencial carcinogénico¹⁻³) como sendo o possível mecanismo de formação de N-nitrosaminas na carne. Cerca de vinte anos mais tarde, o assunto continuou a ser de interesse científico e Stahl *et al.* publicaram a transnitroação de alguns S-nitrosotióis nomeadamente a S-nitrosocisteína, S-nitrosohomocisteína, S-nitrosocisteínilglicina, GSNO e S-nitrosoacetilcisteína, para a amina secundária dietanolamina.⁴⁶ Neste estudo ficou provada a ocorrência de transnitroação do enxofre do S-nitrosotiol para o azoto da dietanolamina e mostrou ainda a existência de transnitroação entre centros de enxofre como reacção intermediária para formar rapidamente o N-nitrosocomposto em estudo (esquema 1.10).



Esquema 1.10 – Formação da N-nitrosodietanolamina a partir da S-nitrosocisteína e dietanolamina, na presença e na ausência da cisteína.⁴⁶

⁴⁴ D. R. Noble and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 13-17.

⁴⁵ M. J. Dennis, R. Davies, D. J. McWeeny, *J. Sci. Food Agric.*, 1979, **30**, 639-45.

⁴⁶ A. H. Al-Mustafa, H. Sies, W. Stahl, *Toxicology*, 2001, **163**, 127-36.

Ainda relativamente à transnitroação S- para N-, outros estudos mostraram evidência da transnitroação do centro de enxofre para o centro de azoto primário como possível forma de decomposição da S-nitrosocisteína.^{27,28}

A reacção de transnitroação dos RSNO para outros tióis (equação 1.7) é também de particular interesse dado que, como já referido, existe a possibilidade de formação de novos RSNO com maior potencial para gerar o óxido nítrico e/ou com maior estabilidade em solução, podendo assim funcionar como reservatório de NO^{20,21}.



A reacção de equilíbrio pode ser deslocada no sentido directo na presença de excesso de tiol R'SH, e a reacção parece decorrer via ião tiolato que ataca nucleofilicamente o átomo de azoto do grupo nitroso^{44,47}.

As reacções de transnitroação são geralmente muito rápidas sendo também necessário, para as monitorizar e determinar as suas constantes de velocidade, o uso da técnica espectrofotométrica *stopped-flow*. Estas decorrem mesmo na presença de EDTA, e não são afectadas pelo ião Cu²⁺/Cu⁺ o que indica não existir durante o processo a formação prévia de óxido nítrico.¹⁵

Relativamente à possível transnitroação para centros de oxigénio, há estudos envolvendo o ácido ascórbico que mostram evidências de que, para além do ácido ascórbico ser um reagente capaz de reduzir o ião Cu²⁺ tornando-o catalisador efectivo da decomposição dos RSNO, o ácido ascórbico é também capaz de promover a formação de óxido nítrico no plasma a partir do GSNO, mesmo na presença de agentes quelantes.

Williams e Holmes examinaram em detalhe as reacções de alguns S-nitrosotióis na presença de ião ascorbato⁴⁸ e observaram a existência de duas possíveis reacções, ambas com formação de óxido nítrico como produto de reacção: (I) a baixa concentração de ião ascorbato ($\approx 10^{-4}$ M) este funciona como agente redutor do ião Cu²⁺, sendo o dissulfureto o produto de reacção predominante; (II) a concentração elevada de ião ascorbato ($\approx 10^{-3}$ - 10^{-2} M), o

⁴⁷ K. Wang, Z. Wen, W. Zhang, M. Xian, Jin-Pei Cheng and P. G. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001, **11**, 433-36.

⁴⁸ A. J. Holmes, D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2000, 1639-44.

mesmo funciona como nucleófilo ocorrendo a sua nitroação electrofílica. Posteriormente, dá-se a decomposição com a identificação do óxido nítrico, o tiol livre e o ácido desidroascórbico como produtos finais. Com base nestes resultados, o ião ascorbato tem sido utilizado como prova eficiente para distinguir as ligações S-NO das S-S existentes em enzimas dependentes de cisteína.^{29,49}

Sabe-se ainda que os RSNO na presença de EDTA (de modo a eliminar a possível decomposição pelo ião cobre) reagem com o peróxido de hidrogénio via ião hidroperóxido (HOO^\cdot) dando origem ao tiolato correspondente e o ião peroxinitrito (ONOO^\cdot). Esta reacção, como já anteriormente referido, é de elevado impacto biológico devido à capacidade do peroxinitrito causar danos celulares.

1.4. Dadores de óxido nítrico

Dadores de NO são com compostos activos que, quer *in vivo*, quer *in vitro*, têm a capacidade de libertar NO e/ou de transferir o grupo nitroso para outras espécies que depois de nitrosadas libertam o NO.

Como referido em 1.1.2, existem algumas patologias que podem resultar da deficiência, quer quantitativa, quer funcional, do NO. São vários os motivos pelos quais ocorre défice de concentração de NO endógeno (inibição da actividade das NO sintetases, dificuldade na biodisponibilidade do NO, etc.) mas em todos os casos, a baixa concentração deste mensageiro endógeno pode influenciar todas as vias de transdução de sinal dependentes de NO, impedindo o funcionamento normal de uma célula.

De forma a minimizar os danos causados pelo défice de NO endógeno, a criação de compostos capazes de gerar este mensageiro químico tem sido alvo de desenvolvimento e já existem alguns com aplicação terapêutica, em especial no que diz respeito aos problemas cardiovasculares.⁵⁰

⁴⁹ a) B. Huang, C. Chen, *Free Biology & Medicine*, 2006, **41**, 562-67. b) M. T. Gladwin, X. Wang, N. Hogg, *Free Biology & Medicine*, 2006, **41**, 557-61.

⁵⁰ C. Napoli, L. J. Ignarro, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2003, **43**, 97-123.

Existe actualmente uma grande diversidade de estruturas químicas capazes de gerar NO aos quais Wang²⁹ e os seus colaboradores dedicaram uma extensa revisão bibliográfica, mencionando aspectos desde a sua obtenção química, reactividade e terapêutica. Entre esses compostos encontram-se os nitratos e nitritos orgânicos, complexos NO-metálicos, S-nitrosotióis, N-nitrosaminas, N-hidroxi guanidinas, etc. (tabela 1.2). Devido à sua diversidade química, mesmo dentro do próprio tipo de compostos, estes encontram-se normalmente classificados de acordo com os processos envolvidos na sua doação de NO (enzimáticos, não enzimáticos, redutivos ou oxidativos).

Tabela 1.2 – Principais classes de compostos dadores de óxido nítrico descritas por Wang *et al.*²⁹

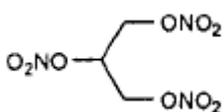
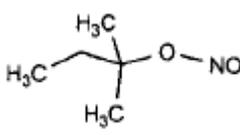
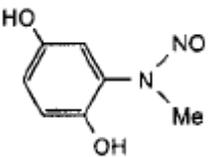
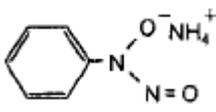
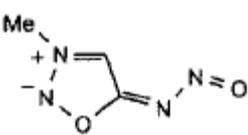
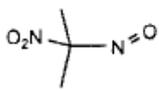
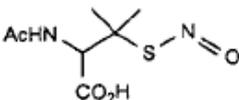
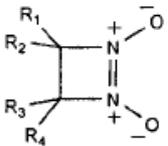
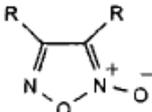
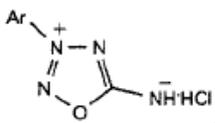
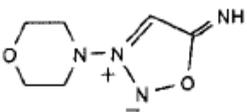
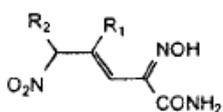
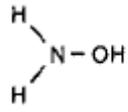
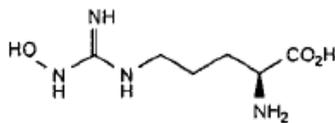
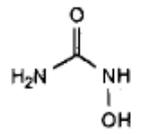
Nome	Compostos representativos	Via de formação de NO	
		Não enzimático	Enzimático
Nitratos Orgânicos		Tióis	Citocromo-P450, enzimas ligadas a membranas
Nitritos Orgânicos		Hidrólise e transnitrosação, tíois, luz, calor	Enzimas citosólicas e microsossomais, xantina oxidase
Complexos metal-NO	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Luz, tíois, redutores, nucleófilos	enzimas ligadas a membranas
N-nitrosaminas		$\cdot\text{OH}$, luz	Citocromo-P450
N-hidroxi-nitrosoaminas		Luz, calor	Peroxidases
Nitrosiminas		Tióis, luz	?

Tabela 1.2 – Principais classes de compostos dadores de óxido nítrico descritas por Wang *et al.*²⁹ (continuação)

Nome	Compostos representativos	Via de formação de NO	
		Não enzimático	Enzimático
C-nitrosocompostos		Luz, calor	?
S-nitrosotióis		Espontânea, tióis, luz, iões metálicos	Enzimas desconhecidas
Dióxidos de diazetina		Espontânea, tióis	?
Furoxanos e benzofuroxanos		Tióis	Enzimas desconhecidas
Oxatriazol-5-iminas		Tióis	?
Sidnominas		Espontânea, luz, oxidantes e pH>5	Profármacos que requerem hidrólise enzimática
Oximas		Espontânea, O ₂ /Fe ^{III} -porfirina	?
Hidroxilaminas		Auto-oxidação catalisada por iões metálicos	Catalase/H ₂ O ₂
N-hidroxi guanidinas		Oxidantes	NOS, Citocromo-P450
Hidroxiureias		H ₂ O ₂ /CuZn-SOD, H ₂ O ₂ /Cu ²⁺	Peroxidase

Em seguida, iremos dar ênfase apenas aosadores de óxido nítrico do tipo S-nitrosotiol, assim como a alguns fármacos recentemente desenvolvidos contendo o grupo S-nitroso designados de compostos híbridos.

1.4.1. S-nitrosotióis como dadores de óxido nítrico

Tendo conhecimento das propriedades biológicas inerentes a esta classe de compostos, surgiu o interesse de desenvolver estudos de design e síntese de novos RSNO com propriedades farmacocinéticas otimizadas.

Baseado na perspectiva de que o transporte de biomoléculas em células de mamíferos é facilitado pela presença de monossacáridos, foram criados vários derivados do tipo açúcar- S-nitrosotiol.

Este tipo de compostos são construídos por uma aglicona conjugada a um mono ou oligossacárido, sendo a aglicona que transporta o grupo dador de óxido nítrico, enquanto que a unidade do açúcar confere o aumento da solubilidade em água, penetração celular, interações fármaco-receptor, etc.

Na figura 1.6 encontram-se estruturas de alguns derivados do SNAP criados por associação a unidades de glucose e/ou outras unidades de açúcar da sua família, para os quais foi encontrada maior estabilidade e doação de NO mais lenta do que o próprio SNAP em soluções aquosas.²⁹

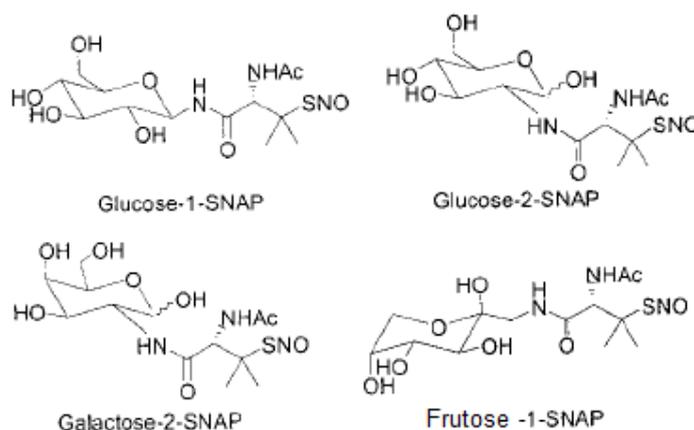


Figura 1.6 – Estruturas de alguns derivados do SNAP por associação a unidades de açúcar da família da glucose.²⁹

Butler e os seus colaboradores⁵¹ desenvolveram uma série de compostos do tipo 1-tioaçúcares derivados da glucose, galactose, xilose, maltose e lactose (figura 1.7). Estes compostos apresentaram hidrofília vs hidrofobia suficiente para serem transportados transdermicamente e alguns estudos sugeriram uma maior capacidade destes compostos no processo de relaxamento muscular quando comparados com o SNAP.

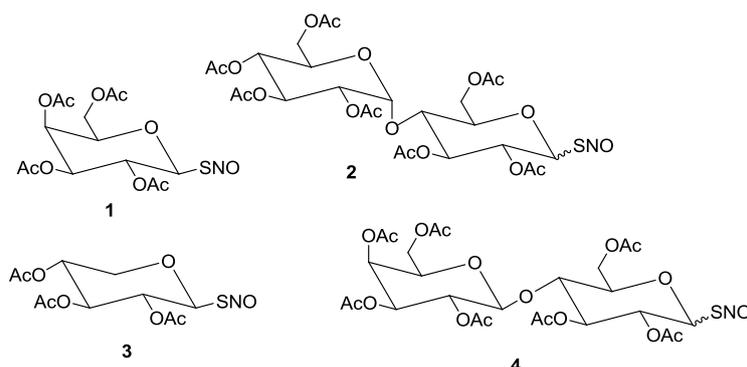


Figura 1.7 – Estruturas de alguns 1-nitrosotioaçúcares: **(1)** 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-nitrosotio-β-D-galactopiranosose. **(2)** 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil(1→4)2,3,6-tri-O-acetil-1-nitrosotio-D-glucopiranosose. **(3)** 2,3,4-tri-O-acetil-1-nitrosotio-β-D-xilose. **(4)** 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosil(1→4)2,3,6-tri-O-acetil-1-nitrosotio-D-glucopiranosose.

Uma série de S-nitrosopéptidos contendo o SNAP foram sintetizados por Butler e Al-Sa'doni⁵² (figura 1.8).

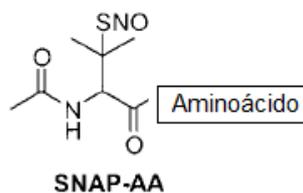


Figura 1.8 – Estrutura geral dos S-nitrosopéptidos. Aminoácido (AA)=Gly, Ala, Leu, Phe, Ile, Met, Asp.²⁹

⁵¹ A. R. Butler, R. A. Field, I. R. Greig, F. W. Flitney, S. K. Bisland, F. Khan, J. J. F. Belch, *Nitric Oxide*, 1997, **1**, 211.

⁵² a) A. R. Butler, H. H. Al-Sa'doni, I. L. Megson, F. W. Flitney, *Nitric Oxide*, 1998, **2**, 193. b) H. H. Al-Sa'doni, I. Y. Khan, L. Poston, I. Fisher, A. Ferro, *Nitric Oxide*, 2000, **4**, 550.

Verificou-se que estes compostos libertam NO com catálise pelos iões cobre ligeiramente menor do que para o SNAP livre, contudo, alguns deles apresentaram maior eficiência no processo de vasodilatação (quando AA=Leu, Pro, Asp eGlu).

1.4.2. Compostos híbridos contendo o grupo S-NO

Alguns compostos apresentando actividade farmacológica foram modificados introduzindo o grupo S-NO na sua estrutura, como modo de explorar os efeitos benéficos do NO sem que o efeito farmacológico do composto parente fosse perdido.⁵⁰

O desenvolvimento da estrutura do S-nitrosocaptopril representou um dos primeiros trabalhos neste sentido (figura 1.2, estrutura 8). O S-nitrosoderivado obtido continuou a apresentar actividade como inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) mas também, como dador de NO, tornou-se mais efectivo do que o próprio captopril na diminuição de hipertensão aguda e crónica. O mesmo apresentou ainda a capacidade transnitrosante para outros tióis e grupos tiol de proteínas.¹⁴

A introdução de estruturas contendo o grupo S-NO em anti-inflamatórios não esteróides (AINES) deu origem a uma nova classe de compostos chamada de NO-AINES, os quais mantêm a sua capacidade anti-inflamatória e apresentam riscos diminuídos no que diz respeito às lesões do estômago.²⁹ Este efeito é conseguido devido à libertação conjunta do NO o qual está intimamente relacionado com a integridade das mucosas. O S-nitrosodiclofenac (figura 1.9, estrutura 1) e o S-nitrosoibuprofeno (figura 1.9, estrutura 2) são exemplos destes novos compostos oralmente administrados com biodisponibilidade de profármaco.^{14,29}

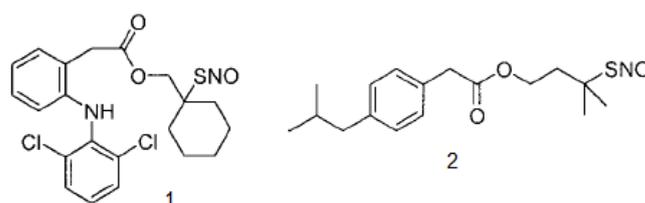


Figura 1.9 – Estruturas do S-nitrosodiclofenac (1) e S-nitrosoibuprofeno (3).²⁹

O híbrido da fluticasona, o S-nitrosfluticasona (figura 1.10), e outros compostos semelhantes revelaram-se bastante promissores no tratamento da asma e outras desordens do foro respiratório,²⁹ uma vez que possuem a possibilidade acrescida de vasodilatação por libertação directa de NO, ou por transnitroação para outros tióis com capacidade de doar NO.

Foi ainda encontrado um aumento de 50% na actividade do composto 1 da figura 1.11, quando comparado com a capacidade de relaxamento do tecido do corpo cavernoso humano associado ao dipiramidole. Outros compostos dadores de NO híbridos de antagonistas dos receptores α -adrenérgicos (2 e 3 da figura 1.11) também se revelaram potenciais agentes terapêuticos no tratamento da impotência.²⁹

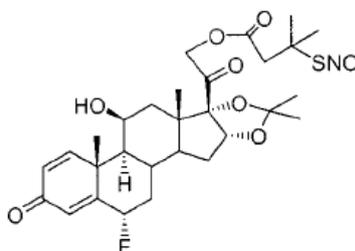


Figura 1.10 – Estrutura da S-nitrosfluticasona.²⁹

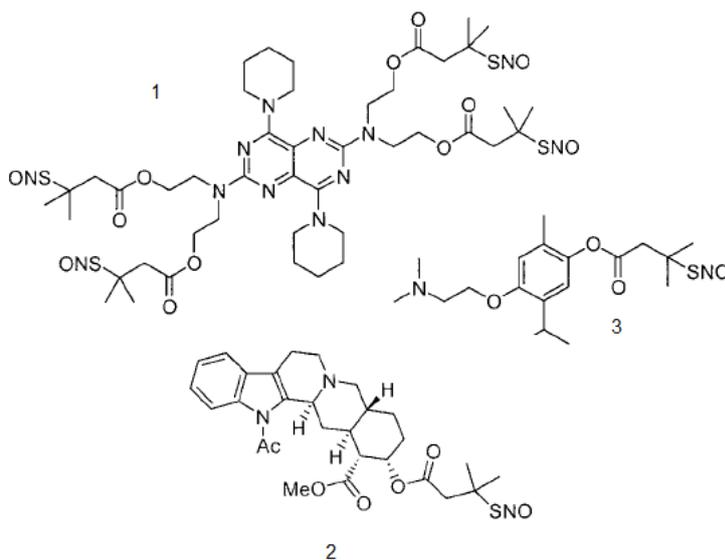


Figura 1.11 – NO híbridos para tratamento da impotência sexual.²⁹

1.5. Âmbito do trabalho

Tem sido alvo de estudo a química e reactividade de alguns N-nitrosocompostos, em particular as nitrosossulfonamidas, nitrosoureias e nitrosoguanidinas. A actividade citotóxica destes compostos está relacionada com a sua possível decomposição *in vivo* para dar espécies electrofílicas as quais podem actuar como agentes alquilantes do DNA,⁴ no entanto, esta potencialidade tem sido aproveitada no desenvolvimento de agentes antitumorais, com especial destaque para as N-nitrosoureias as quais desde há muito são administradas clinicamente na quimioterapia⁵³.

Estudos já realizados mostraram que algumas N-nitrosossulfonamidas^{54,55} e N-nitrosoureias⁴ são capazes de actuar como agentes nitrosantes quando na presença de aminas e recentemente, N-nitrosoguanidinas contendo substituintes electroattractores do tipo benzoílo e toluenossulfonilo, também revelaram a mesma capacidade nitrosante para nucleófilos de azoto,⁵⁶ aparentemente por um processo de transnitroação. Este facto, acresce o risco de carcinogenicidade destes compostos no entanto, levou-nos explorar a possível capacidade nitrosante dos mesmos, por um processo semelhante, para outras espécies nucleofílicas que após nitroação tenham impacto biológico, como por exemplo os S-nitrosotióis.

Ainda muito antes das espectaculares descobertas acerca do papel biológico do óxido nítrico e dos S-nitrosotióis, Schulz e McCalla⁵⁷ reportaram a reacção entre a cisteína e os N-nitrosocompostos N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e N-metil-N-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (MNTS), em etanol aquoso, pH=7 e atmosfera de azoto, com formação de cistína e do composto inicial desnitrosado.

⁵³ R. N. Loeppky, C. J. Michejda in *Nitrosoamines and Related N-Nitroso Compounds, Chemistry and Biochemistry*, ACS Symposium Series 553, Washington, DC, 1994, 1-15.

⁵⁴ J. A. S. Moreira in *Estudio Cinético de Reacciones de Transferencia Protónica, del Grupo Nitroso y de Solvólisis de Cloruros de Benzoílo en Diversos Medios*, Tese de Doutoramento, Faculdade de Química da Universidade de Santiago de Compostela, 2000, 104.

⁵⁵ C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis and J. A. Moreira, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 8822-29.

⁵⁶ L. García Río, Resultados não publicados.

⁵⁷ U. Schulz, D.R. McCalla, *Canadian Journal of Chemistry*, 1969, **47**, 2021-27.

O mecanismo por eles proposto já envolvia a formação de S-nitrosocisteína e óxido nítrico como produtos intermediários. Posteriormente, estudos mecanísticos da reacção entre a MNTS e vários tióis,^{58,59} entre eles também a cisteína, comprovaram a capacidade transnitrosante do N-nitrosocomposto via transferência directa do grupo nitroso para o ião tiolato com formação do S-nitrosotiol correspondente.

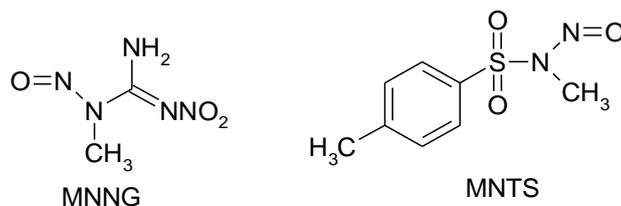


Figura 1.12 – Estruturas da N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) e N-metil-N-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (MNTS).

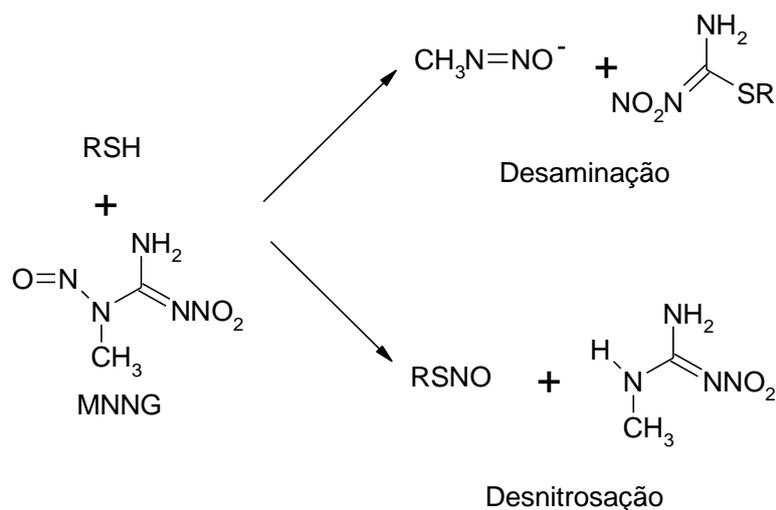
Recentemente García-Río e seus colaboradores⁵⁵ avaliaram a transferência do grupo nitroso de algumas N-nitrossulfonamidas substituídas para iões tiolato. Os estudos também evidenciaram a formação do S-nitrosotiol por um processo de transnitrosação concertado, sendo a velocidade da reacção fortemente dependente da natureza do grupo abandonante.

Santala e Fishbein⁶⁰ também estudaram a decomposição da MNNG na presença de tióis no entanto, diferentemente dos anteriores, este N-nitrosocomposto, para além do processo de formação do S-nitrosotiol através de desnitrosação, apresenta possibilidade de reacção no carbono da função da guanidina por um processo de desaminação, com libertação de diazoalcanoato, um potencial alquilante do DNA (esquema 1.11).

⁵⁸ Shirlene Oh and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1989, 755-58.

⁵⁹ C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1181-85.

⁶⁰ T. Santala, J. C. Fishbein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8852-57.



Esquema 1.11 – Vias de decomposição para a MNNG na presença de tióis.

Estes resultados foram a base que motivou a realização deste trabalho, o qual tem por objectivo o estudo da reactividade de duas N-nitrosoguanidinas, 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG) e 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) na presença de vários nucleófilos de enxofre incluindo a cisteína, em meios aquosos de diferentes valores de pH, como forma de avaliar a seu potencial como dadores de NO.

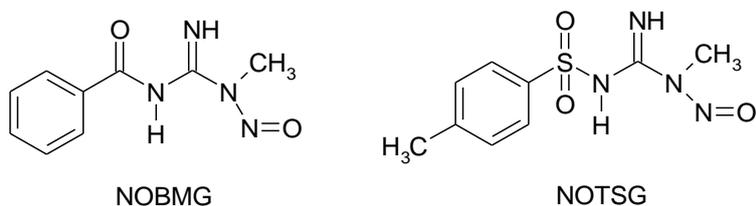


Figura 1.13 – Estruturas da 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) e da 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG).

CAPÍTULO 2

Procedimento Experimental

2. Procedimento Experimental

Este capítulo descreve o método pelo qual foram obtidas as N-nitrosoguanidinas em estudo e a respectiva caracterização por espectroscopia de ^1H R.M.N. e de ^{13}C R.M.N. Inclui também o modo de preparação das soluções necessárias, assim como o equipamento e metodologia utilizada para a realização dos estudos cinéticos que fazem parte deste trabalho.

2.1. Síntese das N-nitrosoguanidinas

As N-nitrosoguanidinas foram obtidas tratando as respectivas guanidinas livres com nitrito de sódio em solução aquosa acídica, de acordo com o método descrito para a nitrosação da clonidina.¹ A 1-metil-3-benzoílguanidina foi obtida de acordo com a síntese já descrita na bibliografia para a 1-metil-3-toluenossulfonilguanidina.^{2,3}

Todos os reagentes comerciais e solventes utilizados na síntese das N-nitrosoguanidinas eram produtos com o máximo grau de pureza disponível.

As reacções foram seguidas por cromatografia em camada fina, utilizando placas revestidas de sílica gel Merck Kieselgel GF₂₅₄ – DC Alufolien de espessura 0,25mm; como revelador recorreu-se à luz ultravioleta de $\lambda=254$ nm. Na purificação dos compostos por cromatografia em coluna utilizou-se como fase estacionária sílica gel 60 230-400 *mesh* da Merck.

A caracterização dos compostos sintetizados (tabela 2.1) foi efectuada pela técnica espectroscópica de ressonância magnética nuclear de protão e de carbono-13. Os espectros de ^1H R.M.N. e de ^{13}C R.M.N. foram realizados no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, num aparelho Bruker Avance 400, operando a 400

¹ J. Iley, F. Norberto, E. Rosa and in part, V. Cardoso and C. Rocha, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.*, 1993, 591-94.

² J. R. Leis, F. Norberto, J. A. Moreira and J. Iley, *J. Chem. Res. Synop.*, 1997, 88-89.

³ J. A. S. Moreira in Estudio Cinético de Reacciones de Transferencia Protónica, del Grupo Nitroso y de Solvólisis de Cloruros de Benzoílo en Diversos Medios, Tese de Doutoramento, Faculdade de Química da Universidade de Santiago de Compostela, 2000, 104.

MHz para os espectros de ^1H R.M.N. e a 100 MHz para os espectros de ^{13}C R.M.N. Os solventes utilizados foram o clorofórmio e dimetilssulfóxido (DMSO), ambos deuterados.

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de ponto de fusão de capilar Stuart Cientific – BIBBY e não se encontram corrigidos.

2.1.1. 1- metil-3-toluenossulfonilguanidina (TSG)

A guanidina TSG foi sintetizada adicionando 0,01 mol de cloreto de *p*-toluenossulfonilo a 0,01 mol de cloridrato de 1-metilguanidina parcialmente dissolvida em cerca de 13 mL de solução mistura de hidróxido de sódio aquoso:acetona (3:10). A mistura resultante foi agitada durante 30 minutos e em seguida procedeu-se à separação da fase orgânica lavando a mesma cerca de com água destilada (3 x 5 mL). Após secagem com sulfato de magnésio anidro, precipitou-se a toluenossulfonilguanidina evaporando a acetona à secura. O resíduo obtido foi purificado por recristalização de acetato de etilo:metanol (9:1) tendo-se obtido um sólido cristalino branco ($\eta=60,3\%$) de p.f.=192-194°C .

2.1.2. 1-metil-3-benzoílguanidina (BMG)

A guanidina BMG foi sintetizada misturando o cloreto de benzoílo e o cloridrato de 1-metilguanidina de acordo com o método descrito em 2.1.1. para a síntese da TSG, tendo-se obtido um sólido branco ($\eta=75,5\%$) de p.f.=157-158°C

2.1.3. 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG) e 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG)

As N-nitrosoguanidinas NOTSG e NOBMG foram sintetizadas dissolvendo 0,01 mol da respectivas guanidinas TSG e BMG, em cerca de 5-10 mL de diclorometano e adicionando 0,1-0,2 mol de nitrito de sódio dissolvido em 50 mL de água destilada. Em seguida, colocou-se a mistura reaccional numa placa de agitação magnética, e adicionou-se lentamente ácido perclórico

2M de modo a que o número de moles de ácido adicionado, não fosse superior ao número de moles de nitrito de sódio em solução. Agitou-se a mistura reaccional durante 1 hora e em seguida neutralizou-se a reacção usando solução de bicarbonato de sódio a 10% (m/v). Separou-se a fase orgânica e lavou-se a fase aquosa com diclorometano cerca de 3 vezes. As fases orgânicas obtidas foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio a 10 % (m/v), secas com sulfato de magnésio anidro e em seguida evaporadas à secura.

As N-nitrosoguanidinas foram purificadas por cromatografia em coluna usando como eluente a mistura éter etílico:éter de petróleo (7:3). Obtiveram-se sólidos amarelos (η (NOBMG)=45,7% e η (NOTSG)=57%) de p.f.=125-126°C para a NOBMG e de p.f.=161-163°C para a NOTSG de acordo com a literatura.⁴

2.2. Análise preliminar dos produtos de transnitrosação

Realizaram-se as reacções de transnitrosação usando nucleófilos de enxofre (L-cisteína, 2-mercaptoetanol, metiltioglicolato, metil-3-mercaptopropionato e o etanotiol) como sistema tampão para valores de $\text{pH}=\text{pK}_a$. Nas reacções que decorreram a $\text{pH}=11$; $\text{pH}=11,5$ e $\text{pH}=12$ adicionou-se à mistura reaccional, contendo a solução aquosa de nucleófilo, uma determinada quantidade de solução de NaOH como forma de acertar o pH. Em todas as reacções trabalhou-se à temperatura ambiente, com meios reaccionais contendo aproximadamente 3% (v/v) de acetonitrilo (Merck, p.a.) e a concentração de nucleófilo estava sempre em excesso relativamente às N-nitrosoguanidinas.

Em 2.2.1 encontra-se descrito o procedimento realizado para a transnitrosação da NOTSG para a cisteína que funcionou como modelo para todas as outras reacções analisadas.

Os nucleófilos utilizados eram produtos comerciais com o maior grau de pureza possível. A solução-mãe de NaOH 3M foi preparada por pesagem da

⁴ J. R. Leis, J. A. Moreira, F. Norberto, J. Iley and L. García-Río, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 655-58.

quantidade adequada de hidróxido de sódio e a de HCl 1M, por diluição do volume apropriado da solução de ácido clorídrico concentrada a 37% (m/m).

A análise dos produtos resultantes das reacções de transnitrosação da NOTSG e NOBMG para os diversos nucleófilos de enxofre estudados foi realizada por cromatografia em camada fina, em vários sistemas de eluentes de distinta polaridade (éter dietílico:n-hexano (1:1), éter dietílico:n-hexano (8:2), acetato de etilo e acetato de etilo:metanol (9:1)) mediante a comparação com padrões das N-nitrosoguanidinas (NOTSG e NOBMG) e guanidinas desnitrosadas (TSG e BMG) sintetizadas e caracterizadas neste trabalho, ácido p-toluenossulfónico e ácido benzóico. Os padrões de ácido p-toluenossulfónico e ácido benzóico eram produtos comerciais com o maior grau de pureza possível.

Utilizaram-se placas revestidas de sílica gel Merck Kieselgel GF₂₅₄ – DC Alufolien de espessura 0,25mm e como revelador recorreu-se à luz ultravioleta de $\lambda=254$ nm.

2.2.1. Transnitrosação da NOTSG para a cisteína a pH=8,6

A 2 mL de solução tampão de cisteína de pH=8,6 e concentração total 0,5M, adicionaram-se 4 mg de NOTSG previamente dissolvida em cerca de 300 μ L de acetonitrilo. Adicionou-se ainda à mistura reaccional 7,7 mL de água destilada. A reacção foi agitada e seguida por c.c.f. até total desaparecimento da N-nitrosoguanidina, procedendo-se então à neutralização da mistura reaccional com HCl 1M. Efectuou-se a extracção com clorofórmio (3 x 3 mL) concentrou-se a fase orgânica. Analisou-se ambas as fases, orgânica e aquosa, por c.c.f. usando os sistemas de eluentes referidos em 2.2. Detectou-se na fase orgânica a existência de três produtos dos quais foram identificados apenas dois (mediante comparação com padrões) como sendo a TSG e o aminoácido cisteína (devido às condições de excesso de nucleófilo). Não foi possível a identificação do terceiro produto como sendo a S-nitrosocisteína uma vez que não se dispunha de composto padrão para comparação. Na fase aquosa detectou-se maioritariamente cisteína.

Tabela 2.1 – Caracterização espectroscópica de ^1H R.M.N. e ^{13}C R.M.N para os compostos sintetizados.

Composto	Solvente	^1H R.M.N.	^{13}C R.M.N
		δ/ppm (n° protões, multiplicidade (J/Hz), localização na estrutura)	δ/ppm (multiplicidade, localização na estrutura)
1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (TSG)	DMSO deuterado	2,34 (3H, s, -Ph- CH_3); 2,50 (3H, s, -NH CH_3) 7,29 (2H, d ($J_{3,2}=J_{5,6}=8,0$ Hz), CH_3 , CH_5) 7,64 (2H, d ($J_{2,3}=J_{6,5}=8,0$ Hz), CH_2 , CH_6)	23,55 (CH , CH_3 -Ph); 30,36 (CH , -HN CH_3) 128,27 (CH , C-2,C-6); 131,73 (CH , C-3,C-5) 143,73 (C , C-4); 144,43 (C , C-1) 159,88 (C , NH- $\text{C}(=\text{NH})$ -N)
1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG)	CDCl_3	2,44 (3H, s, -Ph CH_3); 3,19 (3H, s, -NH CH_3) 7,32 (2H, d ($J_{3,2}=J_{5,6}=8,2$ Hz), CH_3 , CH_5) 7,88 (2H, d ($J_{2,3}=J_{6,5}=8,2$ Hz), CH_2 , CH_6)	21,61 (CH_3 -Ph-); 27,62 (-N(NO)- CH_3) 126,55 (CH , C-2,C-6); 129,58 (CH , C-3,C-5) 138,71 (C , C-4); 143,70 (C , C-1) 154,26 (NH- $\text{C}(=\text{NH})$ -N)
1-metil-3-benzoílguanidina (BMG)	CDCl_3	2,78 (3H, s, -NH CH_3) 7,42 (3H, m , CH_3 , CH_4 , CH_5) 8,14 (2H, d ($J_{2,3}=J_{6,5}=8,0$ Hz), CH_2 , CH_6)	27,42 (-HN CH_3); 127,95 (CH , C-2,C-6) 128,77 (CH , C-3,C-5); 131,54 (C , C-4) 138,54 (1-Ph- C); 162,56(NH- $\text{C}(=\text{NH})$ -N) 177,90 (Ph- $\text{C}=\text{O}$)
1-nitroso-metil-3-benzoílguanidina (NOBMG)	CDCl_3	3,48 (3H, s, -NH CH_3) 7,46 (2H, t ($J=7,6$ Hz), CH_3 , CH_5) 7,55 (1H, t ($J=7,3$ Hz), CH_4) 8,27 (2H, d ($J_{2,3}=J_{6,5}=8,3$ Hz), CH_2 , CH_6)	27,65 (CH_3 ; -N(NO)- CH_3); 128,25 (CH , C-2,C-6) 129,58 (CH , C-3,C-5); 132,54 (C , C-4); 136,90 (C , C-1); 158,62(NH- $\text{C}(=\text{NH})$ -N) 179,8 (Ph- $\text{C}=\text{O}$)

2.3. Estudo cinético

Para o seguimento das reacções em estudo utilizou-se a técnica de espectrofotometria de U.V.-Vis. A sua utilização baseia-se na diferença de absorção que apresentam os espectros de absorção dos reagentes e dos produtos de reacção. Deste modo, é necessário conhecer os espectros de absorção das espécies implicadas de modo a se determinarem as zonas de comprimentos de onda onde a variação de absorvância observada é máxima.

Como mencionado anteriormente, a ligação S-NO nos S-nitrosotióis tem geralmente duas bandas de absorção características, sendo habitualmente utilizada para monitorizar reacções da sua formação, a que ocorre na zona 330-350 nm. Por este motivo, todas as reacções de formação dos S-nitrosotióis foram seguidas a 330 nm salvo quando se indica no texto o contrário.

2.3.1. Equipamento

O seguimento espectrofotométrico das reacções foi realizado utilizando o espectrofotómetro Varian Cary 100 equipado com porta-células múltiplo e para as reacções mais rápidas, recorreu-se ao espectrofotómetro de *stopped-flow* sequencial Applied Photophysics DX17MV. Ambos os aparelhos eram termostatizados por fluxo de água proveniente de um controlador electotérmico CPS-260, permitindo o seguimento das reacções a uma temperatura constante com uma precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. As células utilizadas eram de quartzo com percurso óptico de 1cm e capacidade de 3 mL.

As medidas de pH de todas as soluções foram realizadas no potenciómetro Radiometer pHM82 de leitura digital, equipado com eléctrodos de vidro combinado GK2401C e GK2401B, e com precisão de $\pm 0,01$ unidades de pH.

2.3.2. Reagentes e solventes

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água destilada submetida a um desionizador Milipore.

Os reagentes utilizados na preparação dos tampões destinados aos estudos cinéticos eram produtos comerciais do maior grau de pureza possível.

As soluções tampão-mãe dos nucleófilos de enxofre em estudo foram preparadas por diluição das quantidades necessárias dos nucleófilos, e adição de uma quantidade adequada de NaOH 3M. No caso das soluções-mãe de tampão fosfato, estas foram preparadas por pesagem do sal hidrogenocarbonato de sódio e adição de uma quantidade adequada de NaOH 3M. Os cálculos necessários para a determinação das quantidades necessárias das espécies acima mencionadas, basearam-se na equação de Handersson-Hasselbach (equação 2.1) tendo em conta a concentração total do tampão pretendida (equação 2.2):

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[AH]}\right) \quad \text{equação 2.1}$$

$$[Tampão]_{Total} = [AH] + [A^-] \quad \text{equação 2.2}$$

A solução-mãe de NaOH 3M foi preparada por pesagem da quantidade adequada de hidróxido de sódio e a solução de NaOH 0,1M usada para acertar o pH nas reacções em que $pH \geq 11$ foi preparada por diluição da solução-mãe 3M.

As soluções-mãe das N-nitrosoguanidinas em estudo, de concentração $1,5 \times 10^{-2} M$, foram preparadas dissolvendo a quantidade de sólido necessária em acetonitrilo (Merck, p.a.) e mantidas no frio até à altura da sua utilização.

A pureza destas soluções foi regularmente verificada por c.c.f. devido à extrema labilidade dos compostos.

2.3.3. Reacções de transnitroação

Todas as reacções foram seguidas espectrofotometricamente a $25^\circ C$ e em condições de excesso de nucleófilo relativamente às N-nitrosoguanidinas, sendo nas misturas reaccionais $[NOTSG] = [NOBMG] = 5 \times 10^{-4} M$.

Devido à baixa solubilidade das N-nitrosoguanidinas em água, as soluções-mãe das mesmas foram feitas usando acetonitrilo como solvente e

por este motivo, as reacções foram decorreram numa mistura água:acetonitrilo na qual a percentagem de acetonitrilo foi sempre igual a 3,3%(v/v).

O pH de todas as reacções foi mantido sempre que possível usando os próprios nucleófilos como sistema tampão. Para fixar valores de $\text{pH} < 8$ fez-se adição ao meio reaccional de soluções tampão de fosfato de concentração total 1M e, para fixar valores de $\text{pH} \geq 11$ fez-se adição de solução diluída de NaOH 0,1M.

A tabela 2.2 exemplifica o procedimento para a preparação *in situ* das reacções nos casos em que o nucleófilo era o próprio sistema tampão e as tabelas 2.3 e 2.4 exemplificam o procedimento para a preparação *in situ* das reacções em que houve necessidade de usar respectivamente, os reguladores externos de fosfato e NaOH diluído.

Tabela 2.2 – Preparação *in situ* das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100. $V_{\text{final}}=3$ mL, sistema tampão é o próprio nucleófilo, %ACN=3,3%,
 $[\text{XNO}]=5 \times 10^{-4}$ M.

$[\text{Tampão}] / \text{M}$	$V(\text{Tampão } 1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	$V(\text{XNO } 1,5 \times 10^{-2} \text{ M}) / \mu\text{L}$
0,25	750	2150	100
0,20	600	2300	100
0,15	450	2450	100
0,10	300	2600	100
0,05	150	2750	100

* XNO=N-nitrosoguanidina

Tabela 2.3 – Preparação *in situ* das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100 usando tampão fosfato com regulador externo de pH. $V_{\text{final}}=3$ mL,
 ACN=3,3%, $[\text{Tampão}]=0,5$ M, $[\text{XNO}]=5 \times 10^{-4}$ M.

$[\text{Nucleófilo}] / \text{M}$	$V(\text{Nucleófilo } 1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{Tampão } 1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	$V(\text{XNO } 1,5 \times 10^{-2} \text{ M}) / \mu\text{L}$
0,05	150	1500	1250	100
0,04	120	1500	1280	100
0,03	90	1500	1310	100
0,02	60	1500	1340	100
0,01	30	1500	1370	100

* XNO=N-nitrosoguanidina

Tabela 2.4 – Preparação *in situ* das reacções seguidas no espectrofotómetro Varian Cary 100 usando NaOH aquoso para fixar o pH. $V_{\text{final}}=3$ mL, %ACN=3,3%, $[\text{XNO}]=5 \times 10^{-4}$ M; $[\text{NaOH}]=1,26 \times 10^{-3}$ (pH=11,1).

$[\text{Nucleófilo}] / \text{M}$	$V(\text{Nucleófilo } 1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{NaOH } 0,1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \mu\text{L}$	$V(\text{XNO}^* 1,5 \times 10^{-2} \text{M}) / \mu\text{L}$
0,20	600	38	2262	100
0,15	450	38	2412	100
0,10	300	38	2562	100
0,05	150	38	2712	100
0,025	75	38	2787	100

* XNO=N-nitrosoguanidina

No caso das reacções seguidas no espectrofotómetro de *stopped-flow*, as soluções de nucleófilo e de N-nitrosoguanidina, contidas em seringas distintas acopladas ao aparelho, foram injectadas simultaneamente para a câmara reaccional, onde ocorreu a sua mistura, o que obrigou à preparação de soluções com o dobro das concentrações pretendidas *in situ* (tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Quantidades adicionadas *in situ* para as reacções seguidas no espectrofotómetro stopped-flow sequencial Applied Photophysics DX17MV.

$V_{\text{seringas}}=10$ mL, sistema tampão é o próprio nucleófilo, %ACN=3,3%, $[\text{XNO}]=5 \times 10^{-4}$ M.

Seringa contendo nucleófilo			Seringa contendo XNO*	
$[\text{Tampão}]_{\text{reacção}} / \text{M}$	$V(\text{Tampão } 1\text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \text{mL}$	$V(\text{XNO } 1,5 \times 10^{-2} \text{M}) / \mu\text{L}$	$V(\text{H}_2\text{O}) / \text{mL}$
0,20	4000	9600	700	9300
0,15	3000	9700	700	9300
0,10	2000	9800	700	9300
0,05	1000	9900	700	9300
0,025	500	9500	700	9300

* XNO=N-nitrosoguanidina

Em todas as reacções verificou-se um comportamento cinético típico de 1ª ordem, contudo, para a maioria das reacções monitorizadas observou-se imediatamente a seguir à zona de estabilização do valor de absorvância (zona patamar), a queda dos valores de absorvância significando o início da decomposição do S-nitrosotiol formado.

Para todas as reacções estudadas procedeu-se à recolha de absorvâncias em função do tempo pelo menos até a reacção estar 90%

completa, e em seguida, no caso das reacções monitorizadas no espectrofotómetro Varian Cary 100, procedeu-se à leitura do pH de cada mistura reaccional de modo a confirmar se o pH no final da reacção era igual ao pH inicial.

a) Transnitroação da NOTSG para a cisteína

As reacções de transnitroação da NOTSG para a cisteína foram realizadas para valores de pH compreendidos no intervalo [8,48;11,11]. As concentrações totais de nucleófilo variaram entre $2,5 \times 10^{-2}$ e $2,5 \times 10^{-1}$ M e foram preparadas *in situ* por diluição das soluções tampão do nucleófilo com o pH pretendido de concentração total 1M. Para a reacção que decorreu a pH=11,11 as concentrações de nucleófilo foram preparadas por diluição de uma solução aquosa do mesmo a 1M e fez-se adição de NaOH 0,1M na quantidade apropriada como forma de manter o pH desejado.

b) Transnitroação da NOBMG para o 2-mercaptoetanol

As reacções de transnitroação da NOBMG para o 2-mercaptoetanol foram realizadas para valores de pH compreendidos no intervalo [8,81;12,00].

As concentrações totais de nucleófilo variaram entre $5,0 \times 10^{-2}$ e $3,0 \times 10^{-1}$ M e as soluções foram preparadas *in situ* de modo idêntico ao descrito em a).

c) Transnitroação da NOTSG para o 2-mercaptoetanol

As reacções de transnitroação da NOTSG para o 2-mercaptoetanol foram realizadas para valores de pH compreendidos no intervalo [6,50;11,50].

As concentrações de nucleófilo total variaram entre $5,0 \times 10^{-2}$ e $5,0 \times 10^{-1}$ M e as soluções foram preparadas *in situ* de modo idêntico ao descrito em a), excepto nas reacções que decorreram a pH<8, nas quais o pH foi regulado adicionando solução tampão de fosfato com concentração e pH desejado, de modo a que a concentração de tampão total na reacção fosse sempre 0,5M.

d) Transnitroação da NOTSG para metil-3-mercaptopropionato e etanotiol

As reacções de transnitroação da NOTSG para o metil-3-mercaptopropionato foram realizadas a pH=10,05 e para o etanotiol a pH=10,60. Nas reacções com o etanotiol, não tendo sido possível seguir a formação do S-nitrosotiol, monitorizou-se a decomposição da N-nitrosoguanidina a 300 nm. Para ambos os nucleófilos as concentrações totais variaram entre $2,50 \times 10^{-2}$ e $2,00 \times 10^{-1}$ M e as soluções foram preparadas *in situ* de modo idêntico ao descrito em a).

e) Transnitroação da NOBMG para metiltioglicolato, metil-3-mercaptopropionato e etanotiol

As reacções de transnitroação da NOBMG para os nucleófilos metiltioglicolato, metil-3-mercaptopropionato e etanotiol foram realizadas respectivamente a pH=10,05; pH=9,86 e pH=12,15. Nas reacções com o metiltioglicolato e etanotiol, também não foi possível seguir a formação do S-nitrosotiol e por isso, monitorizou-se a decomposição da N-nitrosoguanidina na presença desses nucleófilos a 310 nm. Para todos os nucleófilos, as concentrações totais variaram entre $2,50 \times 10^{-2}$ e $2,00 \times 10^{-1}$ M e as soluções foram preparadas *in situ* de modo idêntico ao descrito em a).

2.4. Análise de resultados cinéticos

Todo o tratamento de resultados foi realizado utilizando o *software* comercial Grafit 5.0.4 da Erithacus Limitada.

Tendo em conta o fenómeno de não estabilização dos valores de absorvância nas zonas de patamar, referido em 2.3.3, devido ao início da decomposição do S-nitrosotiol formado, os valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem k_{obs} , foram determinados ajustando os dados de absorvância em função do tempo a equações integradas que contemplaram parâmetros relativos à zona de patamar nos quais se assume um valor de absorvância final como estacionário (equações 2.3 e 2.4). Em

ambas as equações A_i é a absorvância inicial, A_f é a absorvância final e Abs é a absorvância num dado tempo t . Na equação 2.4, m é o declive da zona em que inicia a queda das absorvâncias.

$$Abs = (A_f - A_i)e^{(-k_{obs} \times t)} + A_f \quad \text{equação 2.3}$$

$$Abs = (A_f - A_i)e^{(-k_{obs} \times t)} + m \times t + A_f \quad \text{equação 2.4}$$

Nas reacções monitorizadas usando o *stopped-flow*, cada reacção foi repetida pelo menos 5 vezes e o valor da constante k_{obs} foi resultante da média dos valores determinados pelo *software* do próprio espectrofotómetro, também por ajuste às equações integradas 2.3 e/ou 2.4. Para todos os valores k_{obs} determinados o desvio padrão foi sempre inferior a 3% do valor obtido.

Nas figuras 2.1 a 2.3 encontram-se representações típicas do ajuste dos dados de absorvância-tempo às ditas equações integradas.

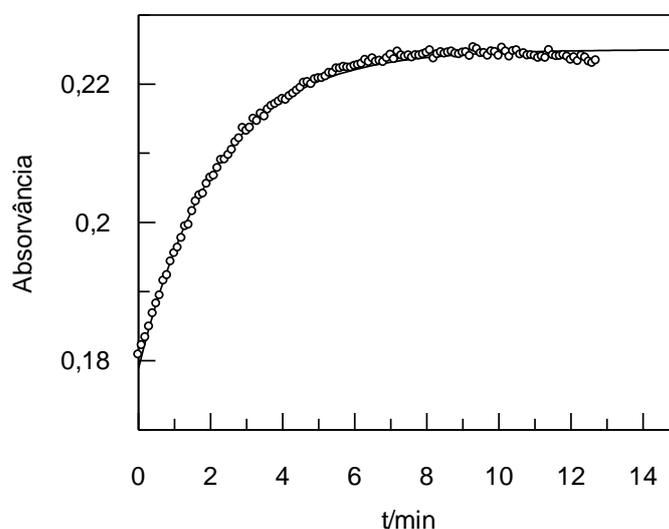


Figura 2.1 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.3 para a reacção de transnitrosação da NOTSG para a cisteína a pH=11,11.

[NOTSG]= 5×10^{-4} M, [Nucleófilo]_T=0,15M, T=25°C, 3,3%(v/v) de acetonitrilo e $\lambda=330$ nm.

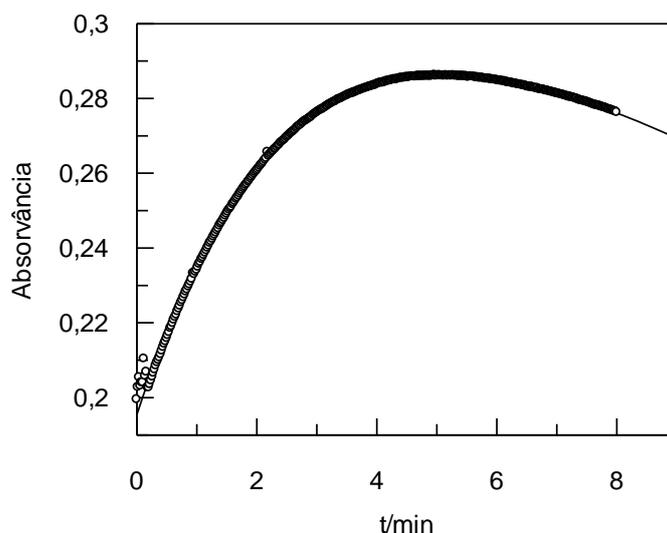


Figura 2.2 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.4 para a reacção de transnitrosação da NOTSG na presença de metil-3-mercaptopropionato a pH=10,05. [NOTSG]= 5×10^{-4} M, [Nucleófilo]_T=0,05M, T=25°C, 3,3%(v/v) de acetonitrilo e $\lambda=330$ nm.

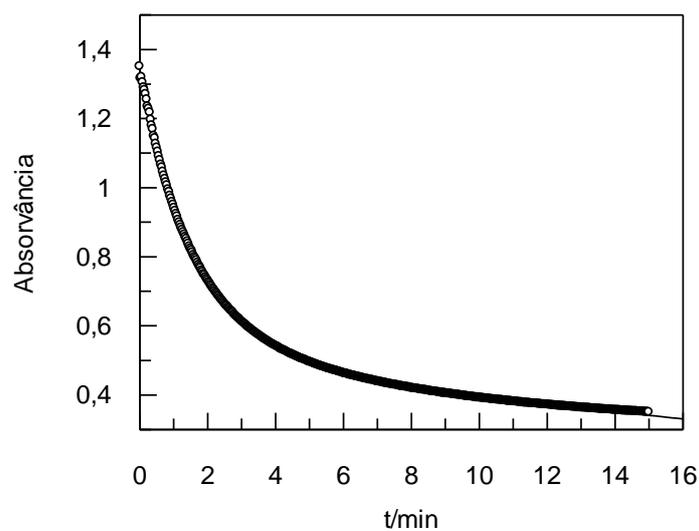


Figura 2.3 – Ajuste dos dados experimentais absorvância-tempo à equação integrada 2.3 para a reacção de transnitrosação da NOTSG na presença de etanotiol a pH=12,15. [NOTSG]= 5×10^{-4} M, [Nucleófilo]_T=0,025M, T=25°C, 3,3%(v/v) de acetonitrilo e $\lambda=310$ nm.

CAPÍTULO 3

*Resultados experimentais,
discussão e conclusões*

3. N-nitrosoguanidinas: Transnitrosação para tióis

Como já referido, os RSNO podem ser gerados em solução por nitrosação dos correspondentes tióis usando qualquer um dos agentes nitrosantes convencionais¹ (ácido nitroso, haletos de nitrosilo, sais de nitrosónio, nitritos de alquilo, óxidos de azoto, ião nitrito e complexos de nitrosilo de metais de transição), ou por transferência do grupo nitroso proveniente de um nitrosocomposto para o ião tiolato, ou seja, por um processo de transnitrosação.^{2,3,4}

Vários RSNO têm sido detectados *in vivo* incluindo a S-nitrosocisteína, a S-nitrosoglutationa, S-nitrosoalbuminas e a S-nitrosohemoglobina.⁵ A S-nitrosocisteína é um dos RSNO biologicamente mais instáveis,^{4,5} contudo, a nível fisiológico, talvez seja o de maior relevância e por este motivo, existem vários estudos mecanísticos sobre a decomposição deste S-nitrosotiol^{1,4,5,6,7} em soluções aquosas na perspectiva da formação de óxido nítrico. No entanto, existe pouca informação sobre a capacidade transnitrosante de nitrosocompostos na presença de nucleófilos de enxofre nomeadamente a cisteína (Cys), tendo sido encontrados na literatura apenas dois estudos mecanísticos sobre a reactividade da MNTS (figura 3.1) na presença de cisteína^{2,8} para diversos valores de pH, onde se comprova a formação de S-nitrosocisteína por um processo de transnitrosação.

Pretendeu-se assim comprovar e avaliar mecanisticamente a capacidade das N-nitrosoguanidinas, NOBMG e NOTSG (figura 3.2), actuarem como agentes nitrosantes directos de tióis, incluindo a cisteína, em condições básicas.

¹ C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis and L. Ribeiro, *J. Org. Chem.*, 2005, **70** (16), 6353-61.

² C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1181-85.

³ D. R. Noble and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 13-17.

⁴ L. A. Peterson, T. Wagener, H. Sies, and W. Stahl, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 721-23.

⁵ D. L. H. Williams in *Nitrosation Reactions and The Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier: B. V., Amsterdam, 2004, 137-160.

⁶ A. P. Dicks, P. Herves Beloso and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1997, 1429-34.

⁷ J. Gu and R. S. Lewis, *Annals of Biomedical Engineering*, 2007, **9** (35), 1554-60.

⁸ Shirlene Oh and D. L. H. Williams, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1989, 755-58.

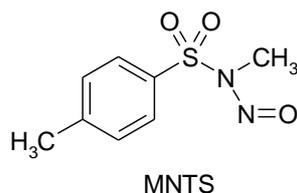


Figura 3.1 – Estrutura da N-metil-N-nitroso-*p*-toluenossulfonamida (MNTS).

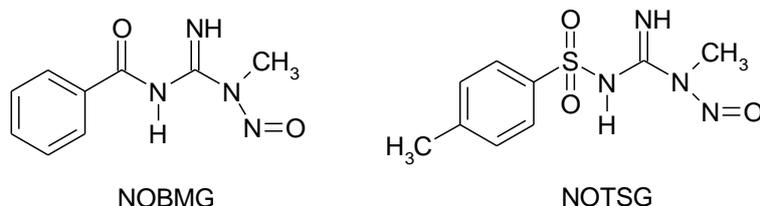


Figura 3.2 – Estruturas das N-nitrosoguanidinas: 1-nitroso-1-metil-3-benzoilguanidina (NOBMG) e 1-nitroso-1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (NOTSG).

3.1. Análise preliminar dos produtos de transnitroação para tióis

Como forma de avaliar qualitativamente a capacidade transnitrosante dos N-nitrosocompostos propostos, realizaram-se previamente reacções de ambos na presença de alguns dos tióis alvo deste estudo, em condições que mimetizariam as dos estudos cinéticos realizados posteriormente ou seja, em excesso de nucleófilo relativamente à N-nitrosoguanidina e numa mistura de acetonitrilo:água onde a percentagem de acetonitrilo seria próxima de 3% (v/v). As misturas reaccionais após tratamento adequado, tal como se descreve em 2.2.1, foram analisadas por cromatografia em camada fina tendo sido identificados como produtos principais as correspondentes guanidinas desnitrosadas, BMG e TSG (figura 3.3). Nas reacções em que o pH da reacção era ≥ 11 detectou-se também na mistura de produtos a presença de ácido benzóico, no caso das reacções com a NOBMG, e de *p*-toluenossulfónico, no caso das reacções com a NOTSG.

A presença das guanidinas livres em solução mostrou-se consistente com a possível transferência directa do grupo nitroso para os tióis em solução e o aparecimento de ácido benzóico e *p*-toluenossulfónico para as reacções a pH

elevado, está de acordo com a competição por parte da reacção de hidrólise em meio básico da NOBMG e NOTSG respectivamente.⁹

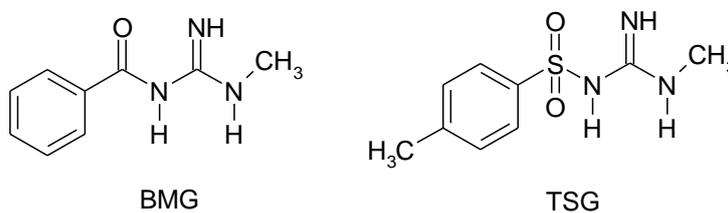


Figura 3.3 – Estruturas das guanidinas: 1-metil-3-benzoilguanidina (BMG) e 1-metil-3-toluenossulfonilguanidina (TSG).

3.2. Transnitroação para tióis simples

Tendo a análise descrita anteriormente revelado dados aparentemente consistentes com as expectativas deste estudo, deu-se início à avaliação cinética da capacidade transnitrosante da NOTSG e NOBMG para nucleófilos de enxofre, primeiramente com exemplos de modelos mais simples ou seja, nucleófilos do tipo RSH, contendo apenas a função tiol com capacidade ionizante na gama de pH em estudo (tabela 3.1) e posteriormente com a cisteína, um aminoácido que para além da função tiol na cadeia lateral tem outras duas funcionalidades ionizáveis: o grupo α -carboxilo e o grupo α -amino (figura 3.4).

A equação de velocidade para o processo de transnitroação de ambas as N-nitrosoguanidinas com o primeiro tipo de tióis, foi deduzida através do estudo cinético completo usando o 2-mercaptoetanol como nucleófilo modelo.

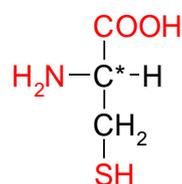


Figura 3.4 – Estrutura do aminoácido L-cisteína. Funções ionizáveis assinaladas a vermelho. Carbono assimétrico α assinalado com *.

⁹ L. García-Río, J. R. Leis, J. A. Moreira, E. Araújo, F. Norberto and L. Ribeiro, *J. Org. Chem.*, 2003, **68** (11), 4330-37.

Tabela 3.1 – Valores de pK_a para os nucleófilos de enxofre (RSH) estudados nas reacções de transnitrosação com as N-nitrosoguanidinas.

RSH	Nome trivial	pK_a^{RSH}
$CH_3O_2CCH_2SH$	Metiltioglicolato	7,81 ¹⁰
$CH_3O_2CCH_2CH_2SH$	Metil 3-mercaptopropionato	9,33 ¹¹
$OHCH_2CH_2SH$	2-mercптоetanol	9,60 ^{11,12}
CH_3CH_2SH	Etanotiol	10,6 ¹⁰

3.2.1. Transnitrosação para o 2-mercптоetanol

Quando as N-nitrosoguanidinas foram colocadas na presença de soluções tampão de 2-mercптоetanol, observaram-se processos cinéticos rápidos, caracterizados por um aumento de absorvância a $\lambda = 330$ nm (figuras 3.5 e 3.6). A variação de absorvância obtida para ambas as reacções é consistente com a transição electrónica do tipo $n^0 \rightarrow \pi^*$ típica da nova ligação S-NO formada⁵ que dá origem ao correspondente RSNO.

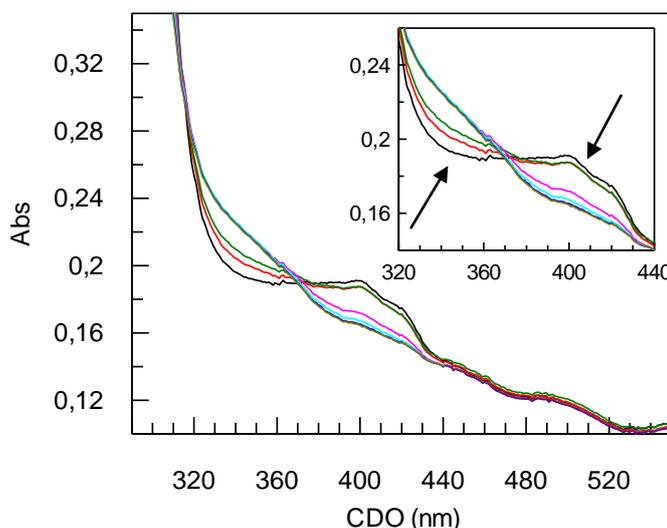


Figura 3.5 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOTSG em tampão de 2-mercптоetanol a pH=8,80. [NOTSG]= 5×10^{-4} M; [Tampão]_{total}=0,20 M; 3,3% ACN; T=25°C.

¹⁰ pK_a Data Compiled by R. Williams: research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf.

¹¹ A. Llinás, J. Donoso, B. Vilanova, J. Frau, F. Muñoz and M. I. Page, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2000, 1521-25.

¹² K. Brocklehurst, D. Kowlessur, M. O' Driscoll, G. Patel, S. Qenby, E. Salih, W. Templeton, M. W. Thomas and F. Willenbrock, *Biochem. J.*, 1987, **244**, 173-81.

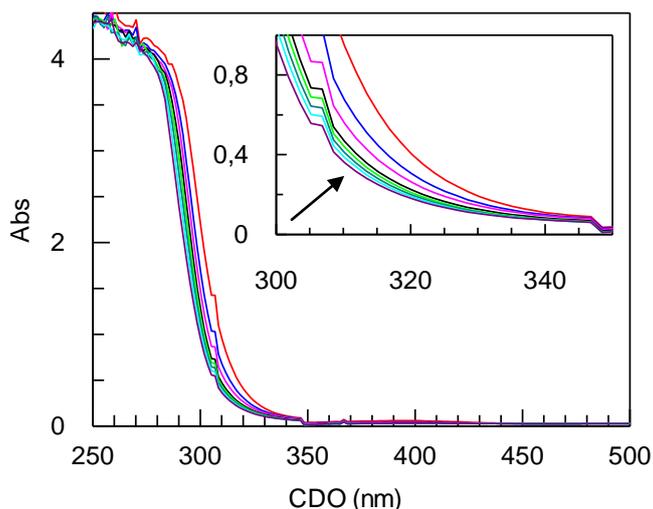


Figura 3.6 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOBMG em tampão de 2-mercaptoetanol a pH=9,60. $[NOBMG]=5 \times 10^{-4}$ M; $[Tampão]_{total}=0,25$ M; 3,3% ACN; $T=25^{\circ}C$.

Estudou-se para a NOTSG e a NOBMG, a influência da concentração total de 2-mercaptoetanol (numa gama de concentrações entre 0,05-0,50M) nos valores de k_{obs} , em intervalos de pH compreendidos aproximadamente entre 8,6 e 12 (tabelas A.1 e A.2 em anexo A).

As figuras 3.7 a 3.10 mostram claramente a existência de uma dependência linear entre k_{obs} , e a concentração total de 2-mercaptoetanol, $[2\text{-mercaptoetanol}]_T$, com valores de ordenada na origem muito próximos de zero para quase todos os valores de pH estudados, indicando que nas reacções estudadas não existe competição da reacção de decomposição por hidrólise da NOTSG ou da NOBMG.²

Para ambas as N-nitrosoguanidinas no intervalo de pH aproximadamente entre 8,7 e 10,6 (figuras 3.7 e 3.8) é visível o aumento do declive das rectas à medida que o pH reaccional também aumenta, mostrando que nestas condições é válida a equação 3.1,^{2,13} onde k_{tr}^{ap} , a constante de velocidade bimolecular aparente para a reacção de transnitrosação, é obtida através do declive das rectas obtidas e $[Nucleófilo]_T$ representa, neste caso, a concentração de 2-mercaptoetanol total.

¹³ C. M. C. Faustino, in *Benzoílnitrosoureias-Reacções de Hidrólise e de Trans-Nitrosação*, Tese de Mestrado, Faculdade de farmácia da Universidade de Lisboa, 2002, 71.

$$k_{obs} = k_{tr}^{ap} [Nucleófilo]_T \quad \text{equação 3.1}$$

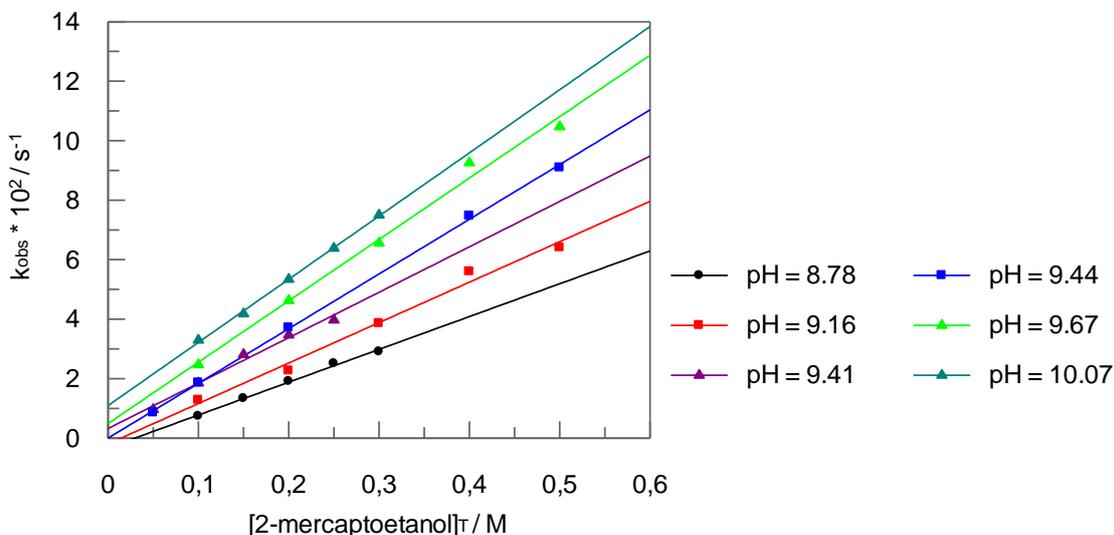


Figura 3.7 – Influência da concentração total 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOTSG a 25°C; pH=[8,78 - 10,07].

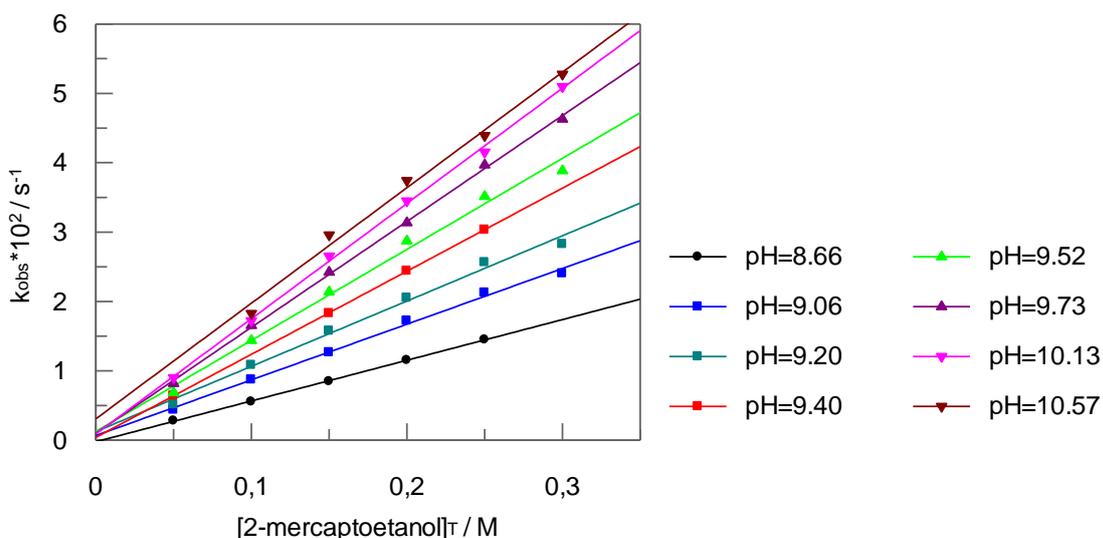


Figura 3.8 – Influência da concentração total 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOBMG a 25°C; pH=[8,66 - 10,57].

Para valores de pH superior a 10 (figuras 3.9 e 3.10) já se observam ordenadas na origem diferentes de zero, significando que nessa gama de pH ocorre ligeira competição da reacção de hidrólise quer para a NOBMG, quer para a NOTSG. Nestas condições é obedecida a equação 3.2, onde k_{OH^-} corresponde à constante de velocidade bimolecular para a reacção de hidrólise das N-nitrosoguanidinas catalisada pelo ião hidróxido existente em solução.¹³

$$k_{obs} = b + k_{tr}^{ap} [Nucleófilo]_T \text{ onde } b = k_{OH^-} [OH^-]$$

$$\Rightarrow k_{obs} = k_{OH^-} [OH^-] + k_{tr}^{ap} [Nucleófilo]_T$$

equação 3.2

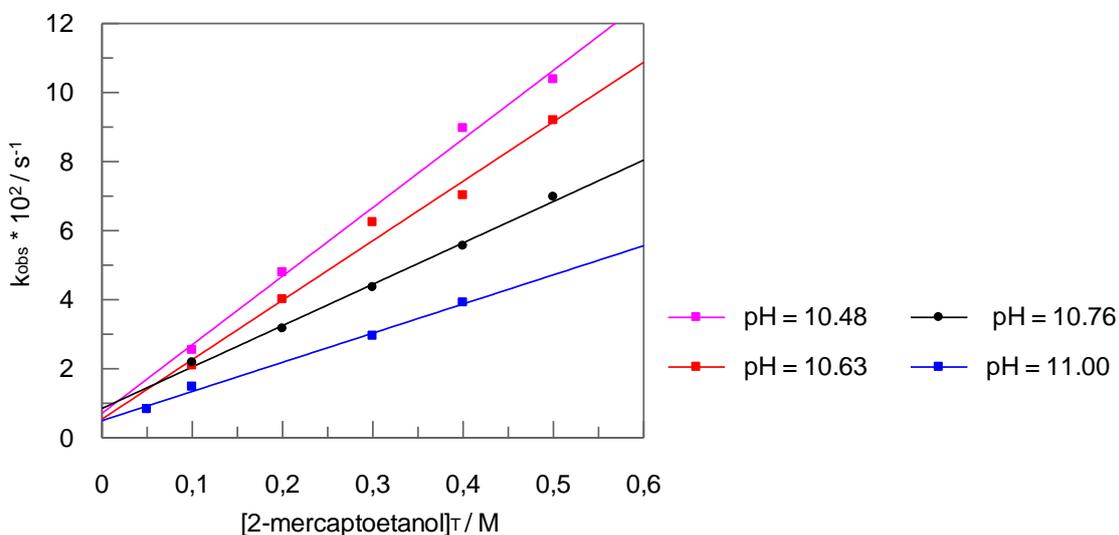


Figura 3.9 – Influência da concentração total de 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOTSG a 25°C; pH=[10,48 - 11,00].

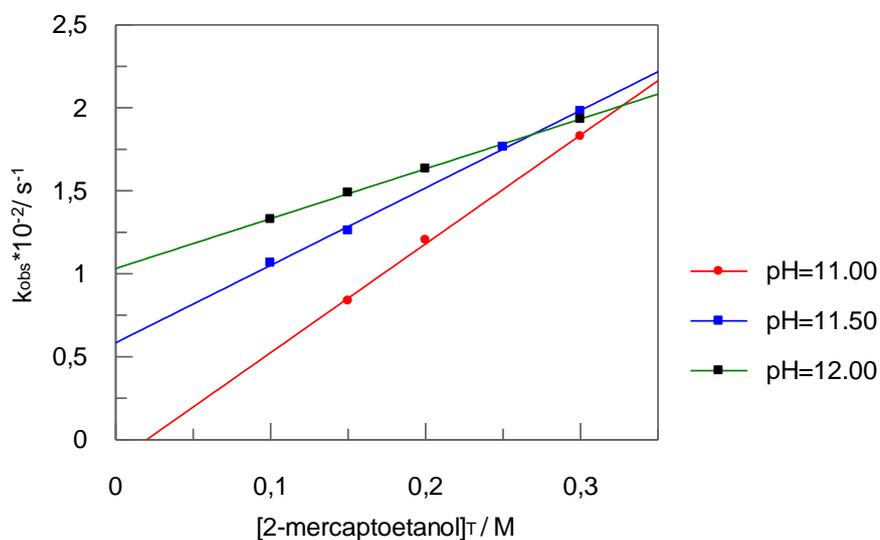


Figura 3.10 – Influência da concentração total de 2-mercaptoetanol na constante k_{obs} na reacção de transnitrosação com a NOBMG a 25°C; pH=[11,00 - 12,00].

No entanto, estudos de hidrólise em meio básico⁹ destas N-nitrosoguanidinas, mostraram que as constantes k_{OH^-} obtidas para valores de pH semelhantes são da ordem de 10^{-5} a $10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, não sendo consideradas

significativas quando comparadas com as constantes de velocidade k_{tr}^{ap} determinadas na presença do 2-mercaptoetanol. Por este motivo, podemos considerar que em toda a gama de pH estudada é válida a equação 3.1.

Na tabela 3.2 encontram-se resumidos todos os valores das constantes de velocidade bimoleculares aparentes de transnitroação (declives das rectas obtidas) em toda a gama de pH estudada, os quais deram origem à construção dos respectivos perfis de pH-velocidade (figura 3.11).

Tabela 3.2 – Valores de k_{tr}^{ap} em função do pH para a reacção da NOTSG e NOBMG com o 2-mercaptoetanol a 25°C. a) pH usando o próprio nucleófilo como solução tampão. b) pH mantido por adição de tampão fosfato. c) pH mantido por adição de NaOH aquoso.

NOTSG		NOBMG	
$10^2 * k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH ^{a)}	$10^2 * k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH ^{a)}
0,480	6,50 ^{b)}	5,61	8,81
2,360	7,70 ^{b)}	8,03	9,06
11,030	8,78	8,52	9,10
13,590	9,16	9,41	9,20
15,270	9,41	11,98	9,40
18,390	9,44	13,13	9,52
19,660	9,48	15,27	9,73
19,890	9,67	16,62	10,13
21,060	9,78	16,66	10,57
21,230	10,07	14,75	10,65
20,470	10,20	6,56	11,00 ^{c)}
19,860	10,48	4,67	11,50 ^{c)}
17,220	10,63	3,00	12,00 ^{c)}
11,980	10,76		
8,444	11,00 ^{c)}		
3,430	11,50 ^{c)}		

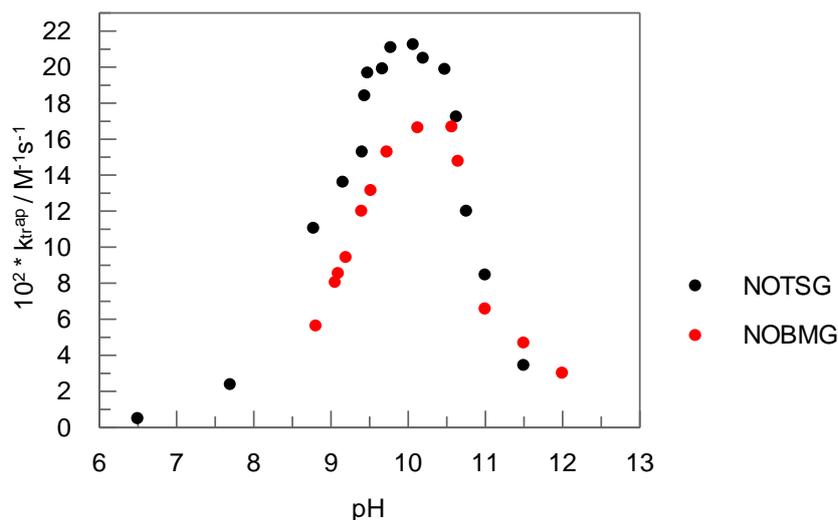
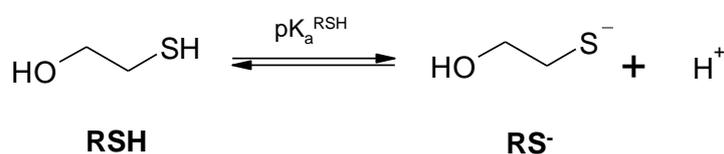


Figura 3.11 – Influência do pH na constante de velocidade bimolecular aparente de transnitrosação, k_{tr}^{ap} , da NOTSG e da NOBMG para o 2-mercaptoetanol a 25°C.

Analisando os perfis de pH-velocidade de ambas as N-nitrosoguanidinas, observa-se um progressivo aumento das constantes de velocidade bimolecular k_{tr}^{ap} , atingindo valores limite para pH próximo de 10 e começando a decair à medida que a alcalinidade do meio reaccional continua a aumentar.

De acordo com o seu equilíbrio ácido-base, o 2-mercaptoetanol, (esquema 3.1), apresenta apenas uma única forma nucleofílica, do tipo RS^- , cuja concentração nas soluções aumenta progressivamente com o aumento do pH até valores próximos de pK_a+1 ou seja, até $pH \approx 10,6$, justificando assim o aumento da constante de velocidade k_{tr}^{ap} , para as reacções com ambas as N-nitrosoguanidinas.

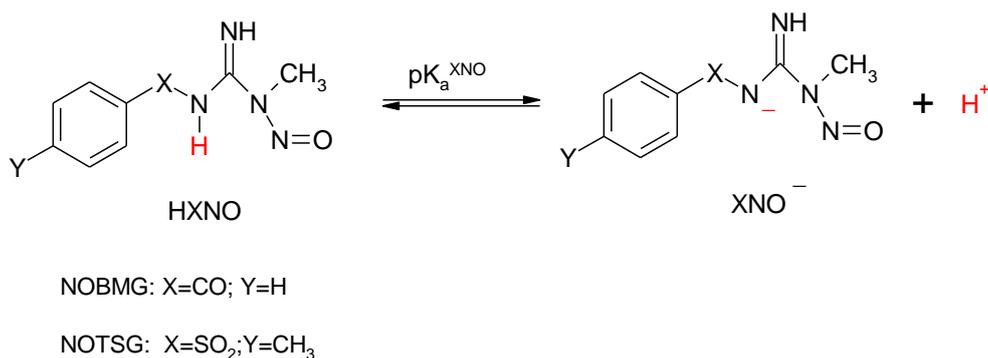


Esquema 3.1 – Equilíbrio ácido-base para o 2-mercaptoetanol.

A queda dos valores de k_{tr}^{ap} com a continuação do aumento de pH poderá ser justificada pelo facto de ambas as N-nitrosoguanidinas possuírem um protão ácido o qual, consoante o pH, poderá ser removido dando origem a estruturas aniónicas (esquema 3.2) que por apresentam maior densidade

electrónica em torno da função guanidina ligada ao grupo nitroso, tornam-se menos reactivas para o ataque nucleofílico devido essencialmente a possíveis repulsões electrostáticas uma vez que o nucleófilo também é uma espécie química aniónica.

Estudos de estabilidade destas N-nitrosoguanidinas levaram à determinação espectrofotométrica e/ou cinética de valores de pK_a^9 iguais a $10,6 \pm 0,1$ para a NOTSG e $11,5 \pm 0,1$ para a NOBMG. Assim sendo, podemos assumir que estas permanecerão neutras até pH próximo de 9,6 no caso da NOTSG, e de 10,5 no caso da NOBMG. Valores de pH superiores a 10,6 significam que a NOTSG estará predominantemente na forma aniónica enquanto que a NOBMG ainda se encontra num equilíbrio entre as duas formas aonde a aniónica vai progressivamente aumentando de concentração até que se atinja $pH=12,5$ onde se torna a forma dominante.



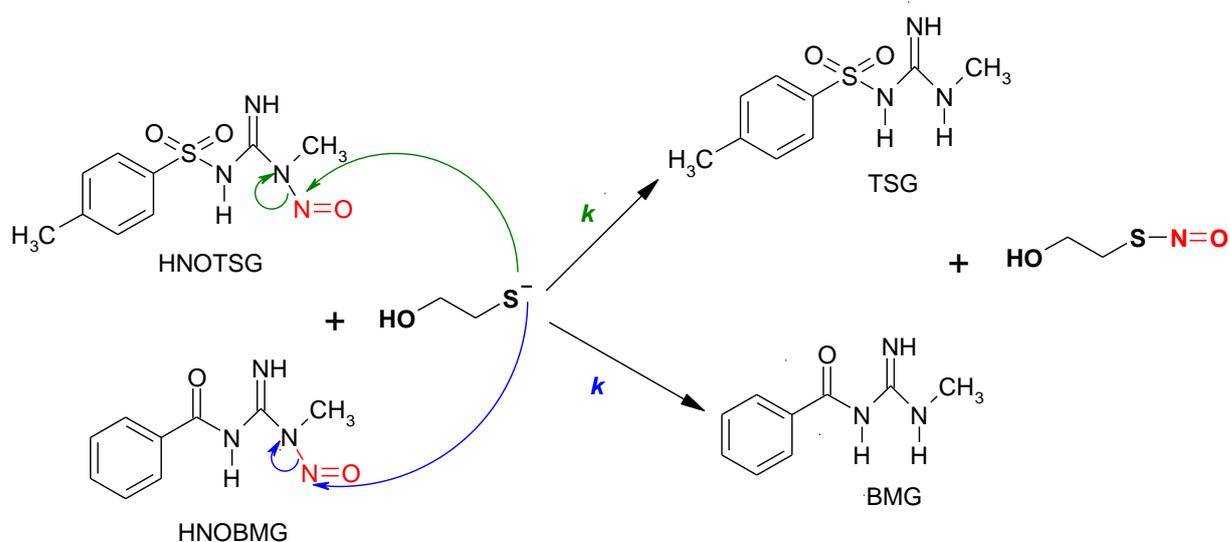
Esquema 3.2 - Equilíbrio ácido-base para as N-nitrosoguanidinas, NOBMG e NOTSG.

De facto, observando os perfis de pH-velocidade, é exactamente em torno das zonas de pH em que as espécies aniónicas das N-nitrosoguanidinas começam a coexistir em solução com as neutras, que os valores de k_{tr}^{ap} começam a decair e quando se atingem valores de pH em que ambas as formas estarão num equilíbrio de 50%, é notória a menor velocidade de transnitrosação aparente para a NOBMG.

Tendo em conta os pressupostos anteriores e com o objectivo de explicar quantitativamente os resultados experimentais obtidos, assumiu-se um mecanismo reaccional envolvendo a transferência do grupo nitroso a partir das N-nitrosoguanidinas nas suas formas neutras (HXNO), para o ião tiolato do 2-mercaptoetanol como se representa no esquema 3.3.

Considerando que as concentrações totais de tiol e das N-nitrosoguanidinas podem ser definidas, de um modo geral, respectivamente por, $[Tiol]_T = [RSH] + [RS^-]$ e $[XNO]_T = [HXNO] + [XNO^-]$, de acordo com o mecanismo proposto, a equação de velocidade para a reacção de transnitroação será definida pela equação 3.3.

$$V = k \times [RS^-] \times [HXNO] \quad \text{equação 3.3}$$



Esquema 3.3 – Mecanismo de transferência do grupo nitroso (transnitroação) das N-nitrosoguanidinas para o ião tiolato do 2-mercaptoetanol.

Assumindo que as constantes de equilíbrio ácido-base das espécies em jogo, K_a^{RSH} e K_a^{XNO} , são matematicamente definidas pelas equações 3.4 e 3.5 é possível redefinir a concentração de tiolato, $[RS^-]$, e de N-nitrosoguanidina neutra, $[HXNO]$, em função de $[H^+]$ e respectivamente de $[Tiol]_T$, e de $[XNO]_T$ (equações 3.6 e 3.7).

$$K_a^{RSH} = \frac{[RS^-][H^+]}{[RSH]} \quad \text{equação 3.4}$$

$$K_a^{XNO} = \frac{[XNO^-][H^+]}{[HXNO]} \quad \text{equação 3.5}$$

$$[HXNO] = [XNO]_T \times \left[\frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^{XNO}} \right] \quad \text{equação 3.6}$$

$$[RS^-] = [Tiol]_T \times \left[\frac{[H^+]}{[H^+] + K_a^{RSH}} \right] \quad \text{equação 3.7}$$

Substituindo [HXNO] e [RS⁻] na equação 3.3 pelas novas expressões encontradas obtém-se uma nova equação de velocidade (equação 3.8) definida em função de concentrações experimentalmente conhecidas: [Tiol]_T, [XNO]_T e [H⁺].

$$V = k \times \left(\frac{[XNO]_T \times [H^+] \times [Tiol]_T \times K_a^{RSH}}{([H^+] + K_a^{XNO}) \times ([H^+] + K_a^{RSH})} \right) \quad \text{equação 3.8}$$

Desenvolvendo o produto existente no denominador e considerando que $V = k_{obs} \times [XNO]_T$, é possível encontrar a expressão para a constante de velocidade observada, k_{obs} (equação 3.9):

$$k_{obs} = \left(\frac{k \times [H^+] \times [Tiol]_T \times K_a^{RSH}}{(K_a^{XNO} \times K_a^{RSH}) + (K_a^{XNO} + K_a^{RSH}) \times [H^+] + [H^+]^2} \right) \quad \text{equação 3.9}$$

Os resultados experimentais comprovaram que k_{obs} é directamente proporcional a [Tiol]_T de acordo com a equação 3.1 e por isso, o valor de k_{tr}^{ap} será o declive da recta definida na equação anterior e é matematicamente expresso pela equação 3.10.

$$k_{tr}^{ap} = \left(\frac{k \times [H^+] \times K_a^{RSH}}{(K_a^{XNO} \times K_a^{RSH}) + (K_a^{XNO} + K_a^{RSH}) \times [H^+] + [H^+]^2} \right) \quad \text{equação 3.10}$$

O inverso de k_{tr}^{ap} multiplicado por [H⁺] dá finalmente origem a uma equação polinomial de 2º grau (equação 3.11).

$$\frac{[H^+]}{k_{tr}^{ap}} = \frac{K_a^{XNO}}{k} + \frac{K_a^{XNO} + K_a^{RSH}}{k \times K_a^{RSH}} \times [H^+] + \frac{1}{k \times K_a^{RSH}} \times [H^+]^2 \quad \text{equação 3.11}$$

Nas figuras 3.12 e 3.13 encontram-se as representações gráficas de k_{tr}^{ap} vs [H⁺] e [H⁺]/ k_{tr}^{ap} vs [H⁺] (tabela A.3 em anexo A), com as respectivas linhas de ajuste às equações 3.10 e 3.11.

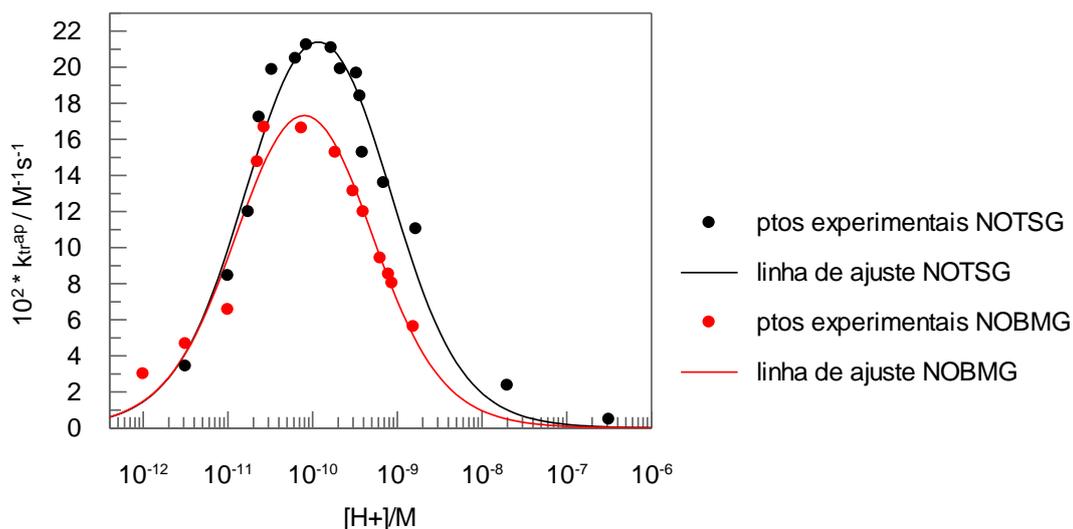


Figura 3.12 – Influência da $[H^+]$ (eixo do xx em escala logarítmica) na constante k_{tr}^{ap} para as reacções de transnitroação da NOTSG, e da NOBMG, para o 2-mercaptoetanol a 25°C, com linhas de ajuste à equação 3.10.

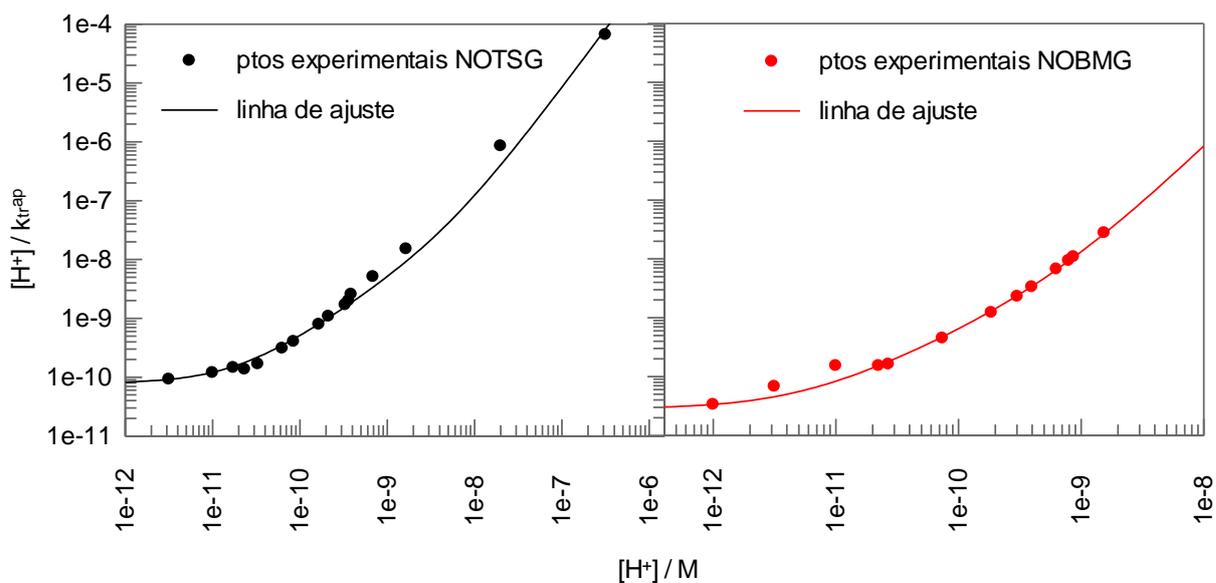


Figura 3.13– Variação do quociente $[H^+]/k_{tr}^{ap}$ em função de $[H^+]$ (eixo do xx e yy em escala logarítmica) relativa à reacção de transnitroação da NOTSG, e da NOBMG, para o 2-mercaptoetanol a 25°C, com linhas ajuste à equação 3.11.

É evidente o bom ajuste dos resultados experimentais às equações deduzidas (B.1 a B.4 em anexo B), o que mostra ser válido o mecanismo reaccional proposto. Foi possível estimar os valores da constante de velocidade de transnitroação, k , para ambas as reacções de transnitroação,

os valores de constante de acidez para ambas as N-nitrosoguanidinas e para o tiol em estudo, os quais se encontram resumidos na tabela de resultados 3.3.

No ajuste dos resultados à equação polinomial do tipo $y=a+bx+cx^2$ (equação 3.11), foram apenas estimados os parâmetros b e c , sendo o parâmetro a considerado constante durante o processo e obtido através de um ajuste linear prévio dos resultados na zona com linearidade.

Tabela 3.3 – Valores estimados de k , pK_a^{XNO} e pK_a^{RSH} por ajuste dos resultados experimentais à equação 3.10 e 3.11. * valores obtidos directamente do ajuste realizado pelo Grafit 5.0 ** valores calculados através dos parâmetros obtidos pelo ajuste realizado pelo Grafit 5.0.

XNO	Equação 3.10 [*]			Equação 3.11 ^{**}		
	pK_a	$k / M^{-1}s^{-1}$	pK_a^{RSH}	pK_a	$k / M^{-1}s^{-1}$	pK_a^{RSH}
NOTSG	10,73±0,10	(2,88±0,26)×10 ⁻¹	9,14±0,12	10,73	2,33×10 ⁻¹	8,30
NOBMG	10,81±0,14	(2,48±0,32)×10 ⁻¹	9,39±0,12	11,29	1,84×10 ⁻¹	9,16

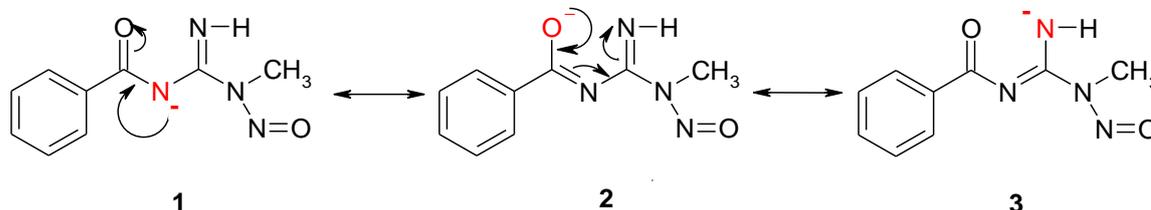
Os valores de constantes de velocidade de transnitrosação (k) obtidos por ajuste às duas equações são da mesma ordem de grandeza, e concordantes quer no que diz respeito à reacção de transnitrosação com a NOTSG, quer com a NOBMG. Para ambos os ajustes a razão entre as constantes de velocidade (k_{NOTSG}/k_{NOBMG}) é idêntica e próxima de 1,2, colocando em evidência, ainda que pouco acentuada, uma maior reactividade da NOTSG para o processo de transnitrosação quando comparada com a NOBMG.

Ambos os grupos sulfonilo e carbonilo existentes nas correspondentes N-nitrosoguanidinas são bons grupos electroattractores,¹⁴ no entanto, como já anteriormente referido, o grupo sulfonilo terá maior capacidade electroatractora do que o carbonilo devido a um maior efeito indutivo,⁹ o que justificará a diferença de reactividade encontrada.

Será ainda de salientar, que a possível estabilização da estrutura ressonante **2** do anião da NOBMG (esquema 3.4) por formação de uma ponte de hidrogénio intramolecular (estrutura **I** da figura 3.14) proposta por *García-*

¹⁴ J. R. Leis, J. A. Moreira, F. Norberto, J. Iley and L. García-Río, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 655-58.

Rio *et al.*,⁹ poderá também justificar a menor reactividade da NOBMG, quando comparada com a NOTSG, na zona de pH em que a suas formas predominantes em solução são as aniónicas.



Esquema 3.4 – Estruturas ressonantes possíveis para o anião da NOBMG.

No caso da NOTSG, a mesma estabilização será altamente improvável uma vez que estudos com sulfonamidas indicaram que a contribuição da possível estrutura II não é significativa na sua estabilização.^{15,16, 17}

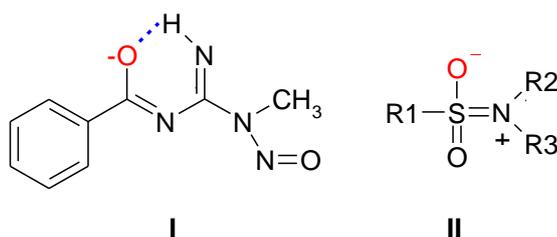


Figura 3.14 – Estabilização do anião da NOBMG por ponte de hidrogénio intramolecular (I) e estrutura ressonante possível para sulfonamidas (II).

Os valores de pK_a calculados para a NOTSG nos dois tipos de ajuste, foram iguais entre si e concordantes com o valor de referência mencionado anteriormente ($pK_a=10,6\pm 0,1$). Relativamente à NOBMG, ainda que um pouco diferentes, os valores de pK_a encontrados revelam uma diminuição de acidez comparativamente com a NOTSG, sendo o pK_a obtido pelo ajuste à equação 3.11, o de melhor concordância com o de referência bibliográfica ($pK_a=11,5\pm 0,2$).

¹⁵ A. Chardin, C. Laurence, M. Berthelot and D. G. Morris, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 1047-51.

¹⁶ P. Ruostseuo, J. Karjalainen, *Spectrochim. Acta*, 1981, **37 A**, 535.

¹⁷ H. Mollendal, J. Grundnes, P. Klabo, *Spectrochim. Acta*, 1981, **22 A**, 1669.

A diferença de acidez encontrada entre as duas N-nitrosoguanidinas será devida ao facto das amidas serem mais básicas do que a das sulfonamidas, estando uma vez mais na base da diferença, o forte efeito indutivo verificado pelo grupo sulfonilo.

Para o 2-mercaptoetanol, os valores de pK_a obtidos revelaram-se razoavelmente concordantes entre si e com os valores encontrados na bibliografia, excepto o valor calculado por ajuste da equação 3.11 aos resultados experimentais relativos à NOTSG uma vez que se encontra cerca de uma unidade abaixo do previsto. Esta discrepância poderá ter a ver com o facto da necessidade (para a sua determinação) do ajuste linear prévio para o cálculo do parâmetro a , assim como dos vários cálculos matemáticos necessários que envolveram um sistema de três equações, onde alguns possíveis arredondamentos poderão estar na origem da diferença encontrada no resultado final.

3.2.2. Transnitroação para outros tióis de modelo simples

Uma vez definido o modelo matemático que traduz quantitativamente as constantes de velocidade de transnitroação dos N-nitrosocompostos em estudo, para nucleófilos de enxofre contendo apenas a função tiol ionizável, foi possível encontrar constantes de velocidade de transnitroação para outros nucleófilos semelhantes mas com diferentes comportamentos de acidez (tabela 3.1). Com esse objectivo, realizaram-se algumas reacções de transnitroação da NOBMG e NOTSG para esses nucleófilos, em condições idênticas às descritas para o 2-mercaptoetanol estudando, apenas para alguns valores de pH, a influência da concentração total de nucleófilo nas constantes de velocidades observadas, k_{obs} . As constantes de velocidade bimoleculares aparentes k_{tr}^{ap} foram determinadas a partir dos declives das rectas obtidas (tabelas A.4 e A.5 em anexo A) e posteriormente calcularam-se as respectivas constantes de velocidade de transnitroação usando a equação que melhor estimou os valores de pK_a das N-nitrosoguanidinas e do 2-mercaptoetanol.

Os valores obtidos serão apresentados numa compilação de constantes de velocidade de transnitroação usadas para a construção de

correlações de Brønsted (tabela 3.5), sendo discutida a sua relevância mais à frente no ponto 4 deste capítulo.

3.3. Transnitrosação para a cisteína

Sendo a S-nitrosocisteína um dos S-nitrosotióis de maior impacto *in vivo* foi também nosso objectivo avaliar a capacidade transnitrosante dos N-nitrosocompostos para o aminoácido cisteína.

Tal como para os outros tióis já estudados, a análise preliminar dos produtos de reacção mostrou evidências da desnitrosação das N-nitrosoguanidinas na presença de um excesso de cisteína encorajando-nos a prosseguir com um estudo cinético semelhante ao anterior.

Como já anteriormente referido, a cisteína é um tiol de maior complexidade devido à multiplicidade de funções capazes de ionização, o que certamente influenciará, a nível mecanístico, a transferência do grupo nitroso das N-nitrosoguanidinas para o enxofre do seu grupo tiol.

Uma vez que o perfil cinético de transnitrosação anteriormente desenvolvido mostrou-se idêntico para a NOTSG e NOBMG, revelando apenas que uma era mais reactiva que a outra, optou-se por estudar cineticamente a reacção com este aminoácido usando como dador de NO a N-nitrosoguanidina mais reactiva, a NOTSG.

Quando a NOTSG foi colocada na presença de soluções tampão de cisteína observou-se um processo cinético muito rápido (na ordem dos segundos), também caracterizado por um aumento de absorvância a $\lambda = 330$ nm (figura 3.15) típico da nova ligação S-NO formada que dará origem ao correspondente RSNO, a S-nitrosocisteína.

Estudou-se então a influência da concentração total de cisteína (numa gama de concentrações entre 0,025-0,30M) nos valores de k_{obs} para a reacção com a NOTSG, num intervalo de pH entre 8,48 e 11,11 (tabela A.6 em anexo A). Os resultados apresentados nas figuras 3.16 e 3.17, mostram que existe dependência linear entre a constante de velocidade observada, k_{obs} , e a concentração total cisteína, $[Cys]_T$.

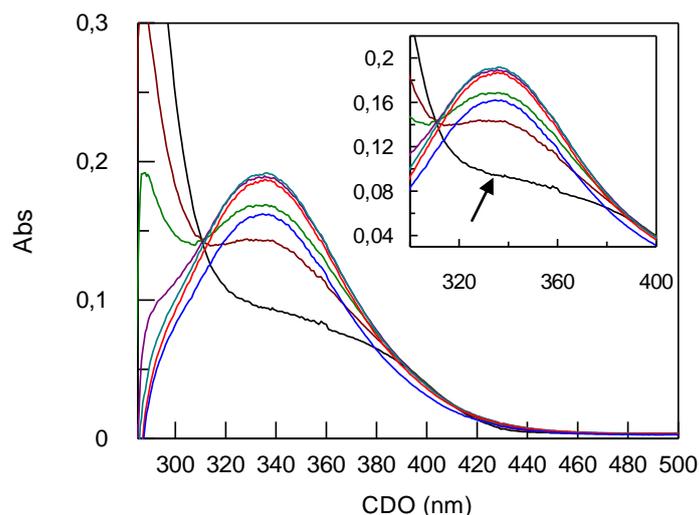


Figura 3.15 – Espectros de absorção da reacção de transnitrosação da NOTSG em tampão de cisteína a pH=11. [NOTSG]= 5×10^{-4} M; [Tampão]_{total}=0,25 M; 3,3% ACN; T=25°C.

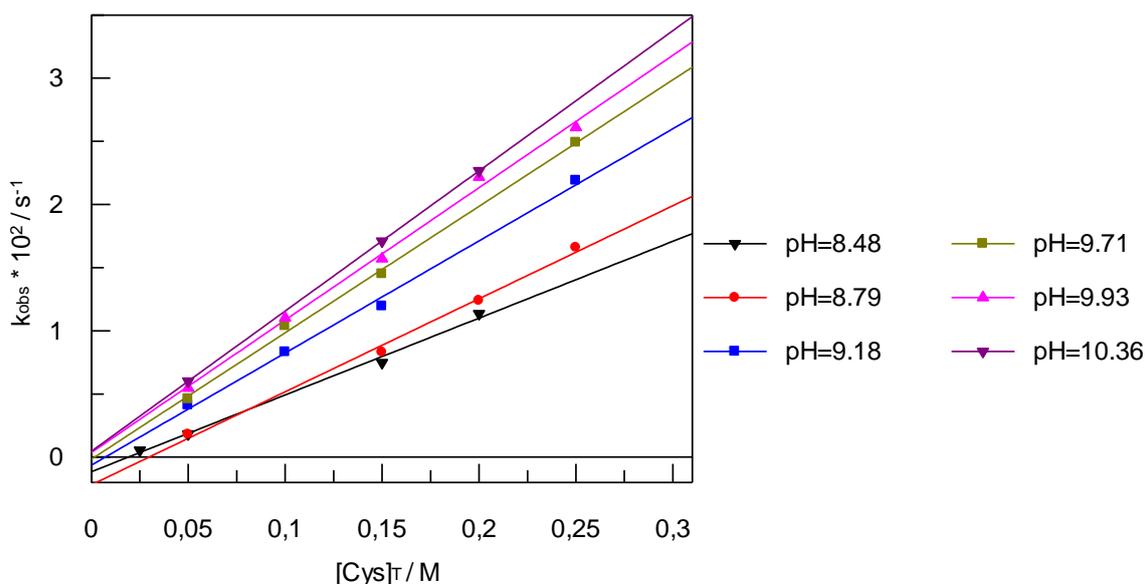


Figura 3.16 – Influência da concentração total cisteína na constante k_{obs} para a reacção com a NOTSG a 25°C; pH=[8,48-10,36].

Para os valores de pH compreendidos entre 8,48 e 10,36 (figura 3.16), os valores de ordenada na origem das rectas estimadas são muito próximos de zero, mostrando que a reacção de hidrólise da NOTSG também não compete com a reacção de transferência do grupo NO para o átomo de enxofre da cisteína por transnitrosação. Neste mesmo intervalo de pH, tal como para o 2-

mercaptoetanol, é notório o aumento dos declives das rectas com o aumento do pH reaccional sendo válida nestas condições a equação 3.1.

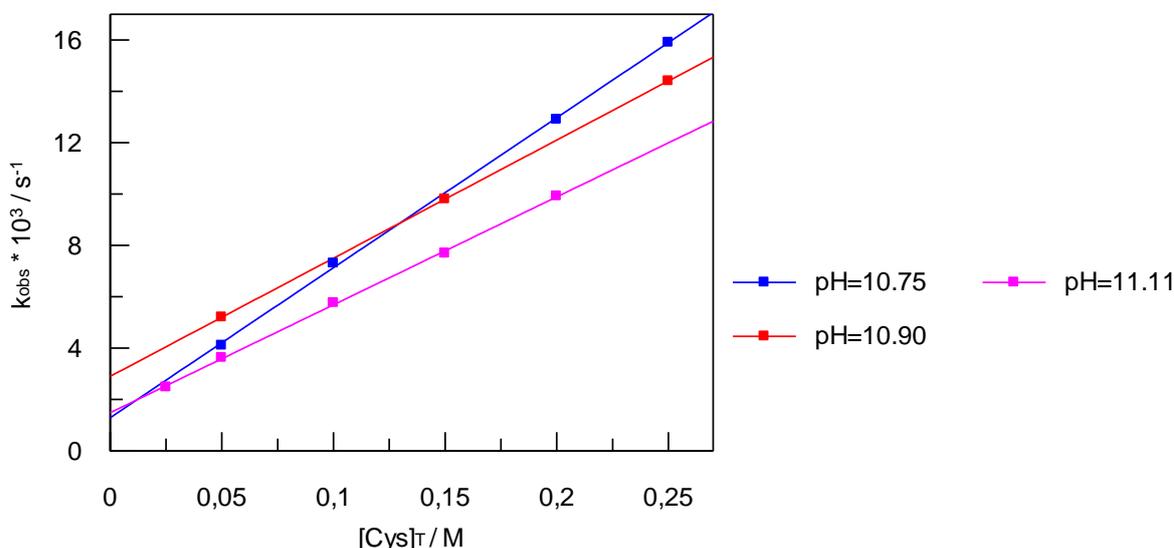


Figura 3.17 – Influência da concentração total cisteína na constante k_{obs} para a reacção com a NOTSG a 25°C; pH=10,75;10,90 e 11,11.

Quando $\text{pH} \geq 10,36$ (figura 3.17), as dependências lineares entre k_{obs} e $[\text{Cys}]_T$ já apresentam ordenadas na origem ligeiramente diferentes de zero, indicativas da dita competição da hidrólise catalisada pelo ião hidróxido. Ainda assim, as constantes k_{OH^-} obtidas para valores de pH semelhantes continuam a ser consideradas desprezíveis⁹ quando comparadas com as constantes de velocidade k_{tr}^{ap} determinadas e por esse motivo, será possível considerar que, em toda a gama de pH estudada, a equação 3.1 continua a ser válida.

Na figura 3.18 encontram-se representadas graficamente as constantes de velocidade k_{tr}^{ap} , para todos os valores de pH estudados (tabela 3.4). O perfil pH-velocidade obtido apresenta uma forma em sino idêntica à encontrada no estudo com o tiol 2-mercaptoetanol contudo com uma aparência mais alargada o que poderá ser reflexo do maior número de espécies em equilíbrio nas soluções em estudo.

No que diz respeito à NOTSG, tal como já discutido anteriormente, a existência de um protão ácido no azoto da função guanidina directamente ligada ao grupo sulfonilo, leva à existência duas espécies químicas as quais coexistem em solução na gama de pH entre 9,6 e 11,6 (esquema 3.2). Para $\text{pH} < 9,6$ a espécie predominante será a neutra e acima de 11,6 será a aniónica.

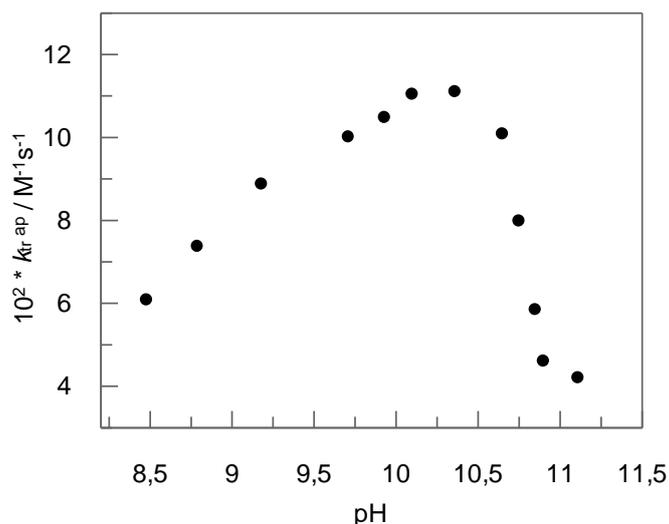


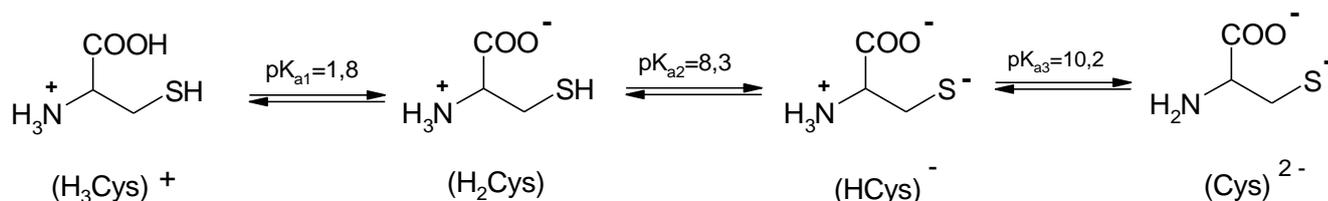
Figura 3.18 – Influência do pH na constante de velocidade bimolecular aparente de transnitroação, k_{tr}^{ap} , da NOTSG para a cisteína a 25°C.

Tabela 3.4 – Valores de k_{tr}^{ap} em função do pH para a reacção da NOTSG com a cisteína. a) pH usando o próprio nucleófilo como solução tampão b) pH mantido por adição de NaOH aquoso.

$10^2 * k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH ^{a)}
6,080	8,48
7,370	8,79
8,870	9,18
10,010	9,71
10,478	9,93
11,040	10,10
11,100	10,36
10,080	10,65
7,980	10,75
5,840	10,85
4,600	10,90
4,203	11,11 ^{b)}

Para a cisteína, de acordo com o comportamento ácido-base, podemos assumir a existência de duas possíveis espécies nucleofílicas nas soluções: $(HCys)^-$ e $(Cys)^{2-}$ cujos valores de pK_a macroscópicos são 8,3 e 10,2 respectivamente^{10,18} (esquema 3.5).

¹⁸ D. L. Nelson and M. M. Cox in Lehninger Principles of Biochemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 2005, 78.



Esquema 3.5 – Equilíbrios ácido-base para o aminoácido cisteína

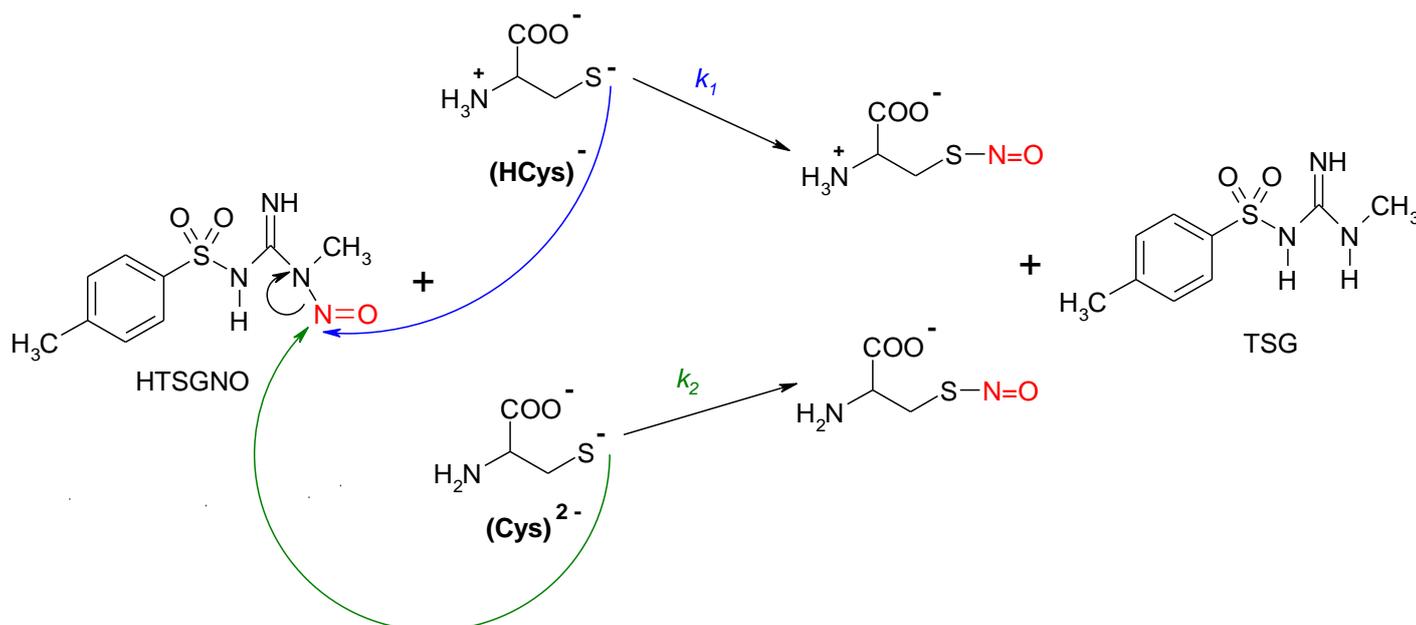
A análise dos resultados experimentais mostra-nos que k_{tr}^{ap} aumenta à medida que o pH aumenta chegando a um valor máximo quando $\text{pH} \approx 10,4$. No que diz respeito à cisteína, o aumento de pH até valores próximos de 10 implica também o aumento da sua forma aniónica $(\text{HCys})^-$ em solução, a qual se tornará na estrutura predominante quando $\text{pH} \approx 9,3$. Se esta fosse a única espécie nucleofílica possível para a cisteína, e se as formas neutra e aniónica da NOTSG fossem igualmente reactivas, a partir desse valor a constante de velocidade deveria tornar-se independente do pH. Contudo, devido ao terceiro pK_a da cisteína, a estrutura $(\text{HCys})^-$ encontra-se em equilíbrio com a estrutura $(\text{Cys})^{2-}$, assim como a estrutura neutra da NOTSG com a aniónica, verificando-se um decréscimo na constante k_{tr}^{ap} à medida que o pH, e consequentemente as concentrações das estruturas $(\text{Cys})^{2-}$ e $(\text{NOTSG})^-$ em solução continuam a aumentar.

Com o objectivo de explicar quantitativamente estes resultados assumiu-se um mecanismo reaccional envolvendo a transferência do grupo nitroso também a partir da NOTSG na sua forma de neutra (HNOTSG) para as duas formas nucleofílicas da cisteína $(\text{HCys})^-$ e $(\text{Cys})^{2-}$ (esquema 3.6).

De acordo com o mecanismo proposto, a equação de velocidade nestas condições será expressa pela equação 3.12 onde $[\text{HXNO}]$ será neste caso o mesmo que $[\text{HNOTSG}]$:

$$V = (k_1 \times [(\text{HCys})^-] + k_2 \times [(\text{Cys})^{2-}]) \times [\text{HXNO}] \quad \text{equação 3.12}$$

De modo semelhante ao que se fez para o 2-mercaptoetanol, assumiu-se que as concentrações totais de cisteína e NOTSG são expressas respectivamente por $[\text{Cys}]_{\text{T}} = [(\text{H}_3\text{Cys})^+] + [(\text{H}_2\text{Cys})] + [(\text{HCys})^-] + [(\text{Cys})^{2-}]$ e $[\text{XNO}]_{\text{T}} = [\text{HXNO}] + [\text{XNO}]^-$.



Esquema 3.6 – Mecanismo de transferência do grupo nitroso da NOTSG para as duas formas tiolato possíveis da cisteína.

A constante de equilíbrio ácido-base da N-nitrosoguanidina e as três possíveis da cisteína foram designadas por K_a^{XNO} , K_{a1} , K_{a2} e K_{a3} , e definidas pelas equações 3.5, 3.13, 3.14 e 3.15 e encontraram-se expressões de $[(HCys)^-]$, $[(Cys)^{2-}]$ e $[HXNO]$ em função da $[H^+]$ e respectivamente da $[Cys]_T$ e $[XNO]_T$ (equações 3.6, 3.16 e 3.17).

$$K_{a1} = \frac{[(H_2Cys)][H^+]}{[(H_3Cys)^+]}$$

equação 3.13

$$K_{a2} = \frac{[(HCys)^-][H^+]}{[(H_2Cys)]}$$

equação 3.14

$$K_{a3} = \frac{[(Cys)^{2-}][H^+]}{[(HCys)^-]}$$

equação 3.15

$$[(HCys)^-] = [Cys]_T \times \left[\frac{K_{a2} \times [H^+]}{[H^+]^3 \times K_{a1} + [H^+]^2 + [H^+] \times K_{a2} + K_{a2} \times K_{a3}} \right]$$

equação 3.16

$$[(Cys)^{2-}] = [Cys]_T \times \left[\frac{K_{a2} \times K_{a3}}{[H^+]^3 \times K_{a1} + [H^+]^2 + [H^+] \times K_{a2} + K_{a2} \times K_{a3}} \right]$$

equação 3.17

Substituindo [HXNO], [(HCys)⁻] e [(Cys)2⁻] na equação 3.12 pelas novas expressões encontradas obtém-se uma nova equação de velocidade (equação 3.18) em função das concentrações experimentalmente conhecidas: [Tiol]_T, [XNO]_T e [H⁺], de onde se retira a expressão de k_{obs} (equação 3.19).

Uma vez que a dependência entre k_{obs} e [Cys]_T é linear com ordenadas na origem próximas de zero obedecendo a equação 3.1, o valor de k_{tr}^{ap} é o declive da recta e expresso pela equação 3.20.

$$V = \frac{[Cys]_T \times [XNO]_T \times k_1 \times K_{a2} \times [H^+] + [Cys]_T \times [XNO]_T \times k_2 \times K_{a3} \times K_{a2}}{a \times [H^+]^3 + b \times [H^+]^2 + c \times [H^+] + (K_{a3} \times K_{a2} + K_{a2} \times K_a^{XNO}) + \frac{K_{a3} \times K_{a2} \times K_a^{XNO}}{[H^+]}}$$

equação 3.18

$$k_{obs} = \frac{[Cys]_T \times k_1 \times K_{a2} \times [H^+] + [Cys]_T \times k_2 \times K_{a3} \times K_{a2}}{a \times [H^+]^3 + b \times [H^+]^2 + c \times [H^+] + (K_{a3} \times K_{a2} + K_{a2} \times K_a^{XNO}) + \frac{K_{a3} \times K_{a2} \times K_a^{XNO}}{[H^+]}}$$

equação 3.19

$$k_{tr}^{ap} = \frac{k_1 \times K_{a2} \times [H^+] + k_2 \times K_{a3} \times K_{a2}}{a \times [H^+]^3 + b \times [H^+]^2 + c \times [H^+] + (K_{a3} \times K_{a2} + K_{a2} \times K_a^{XNO}) + \frac{K_{a3} \times K_{a2} \times K_a^{XNO}}{[H^+]}}$$

$$a = K_{a1} \quad \text{equação 3.20}$$

$$b = K_{a1} \times K_a^{XNO} + 1$$

$$c = K_{a2} + K_a^{XNO}$$

Os resultados experimentais apresentaram um bom ajuste à equação 3.20 (B.5 em anexo B) como se pode verificar nas figuras 3.19 e 3.20. Os valores das constantes de acidez para a cisteína apresentados no esquema 3.5 foram mantidos constantes durante o processo de ajuste, e os valores estimados para as constantes de velocidade de transnitrosação k_1 e k_2 foram respectivamente $(9,07 \pm 0,88) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $(2,36 \pm 0,56) \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

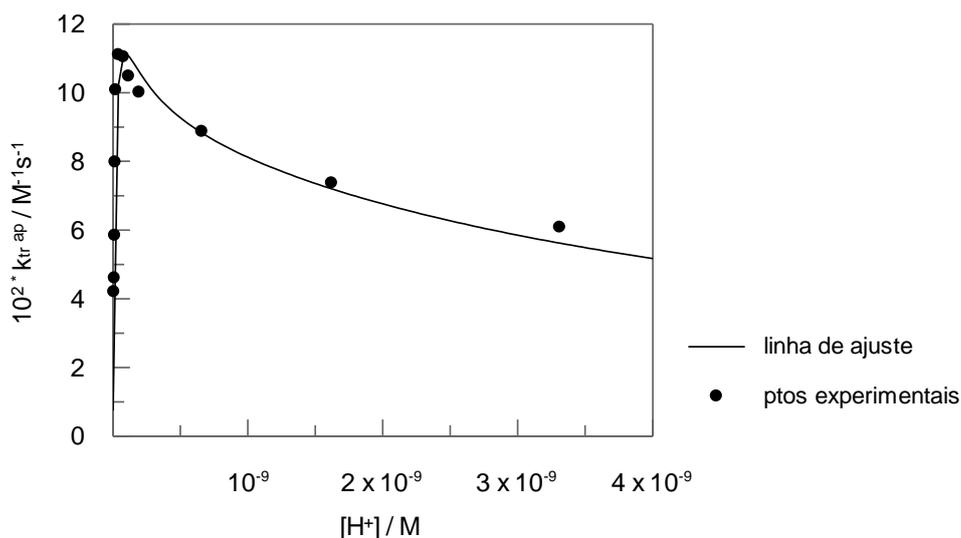


Figura 3.19 – Influência da [H⁺] na constante k_{tr} , na reacção de transnitroação da NOTSG para a cisteína a 25°C, com linha de ajuste à equação 3.20.

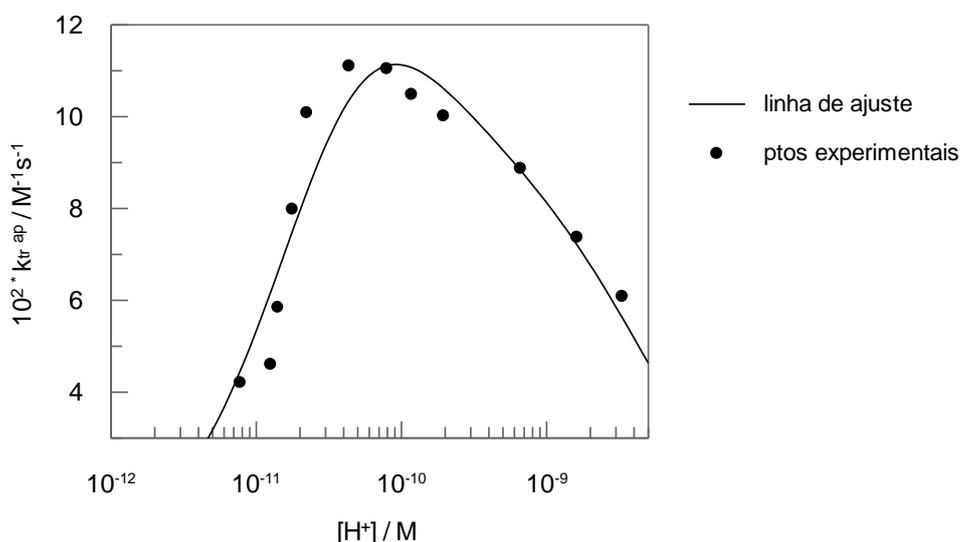


Figura 3.20 – Influência da [H⁺] (eixo do xx em escala logarítmica) na constante k_{tr} , na reacção de transnitroação da NOTSG para a cisteína a 25°C, com linha de ajuste à equação 3.20.

As constantes de velocidade obtidas mostram-nos que a espécie (Cys)²⁻ tem uma maior reactividade para o processo de transnitroação do que a espécie (HCys)⁻, o que já seria esperado uma vez que a primeira possui maior carácter básico. Estimou-se ainda o valor da constante de acidez para a NOTSG, obtendo-se um $pK_a^{NOTSG} = 10,51 \pm 0,18$. O valor encontrado é bastante aceitável quando comparado com o descrito na bibliografia⁹ e comprova que de facto, na gama de pH em que ocorre o aumento dos valores das constantes de

velocidade aparente, a espécie existente é a forma neutra (HNOTSG) da N-nitrosoguanidina e que na zona de pH com decréscimo das constantes de velocidade é a espécie aniônica (NOTSG⁻) que vai aumentando a sua concentração.

Rearranjou-se ainda a equação 3.20 obtendo-se uma nova equação do tipo $y=mx+b$ (equação 3.21), onde y é o produto do denominador por k_{tr}^{ap} e x a concentração de prótons, $[H^+]$.

Para comprovar que os resultados experimentais se ajustavam a esta nova equação, calculou-se para cada pH estudado o valor do denominador da equação 3.20, e multiplicou-se pelos valores das correspondentes constantes de velocidade k_{tr}^{ap} . O valor de K_a^{NOTSG} utilizado neste cálculo foi o valor estimado pelo ajuste anterior.

$$k_{tr}^{ap} \times \text{denominador} = k_1 \times K_{a2} \times [H^+] + k_2 \times K_{a3} \times K_{a2}$$

$$\text{denominador} = a \times [H^+]^3 + b \times [H^+]^2 + c \times [H^+] + (K_{a3} \times K_{a2} + K_{a2} \times K_a^{XNO}) + \frac{K_{a3} \times K_{a2} \times K_a^{XNO}}{[H^+]}$$

$$a = K_{a1}$$

$$b = K_{a1} \times K_a^{XNO} + 1$$

$$c = K_{a2} + K_a^{XNO}$$

equação 3.21

A representação do produto de k_{tr}^{ap} pelo denominador calculado vs $[H^+]$ (figura 3.21 e tabela A.7 em anexo A), mostra claramente a existência de uma tendência linear entre os valores, de onde se tira a partir do declive que $k_1 = (9,87 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e a partir da ordenada na origem que $k_2 = (1,71 \pm 0,17) \times 10^{-1} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (B.6 em anexo B). Os valores obtidos de k_1 e k_2 são consistentes com os anteriormente estimados, mostrando que (Cys)²⁻ é cerca de 2 vezes mais reactiva que (HCys)⁻.

C. Adam et al, em estudos de transnitroação da cisteína usando como dador de NO a MNTS²⁻, chegaram a resultados cinéticos idênticos e também concordantes com um mecanismo reaccional que envolve a transferência do grupo NO da MNTS para as duas espécies nucleofílicas da cisteína, (HCys)⁻ e (Cys)²⁻. Contudo, as constantes de velocidade de transnitroação obtidas são cerca de 100 vezes superiores comparativamente com as estimadas neste

estudo realçando a muito maior reactividade da MNTS para este tipo de reacção.

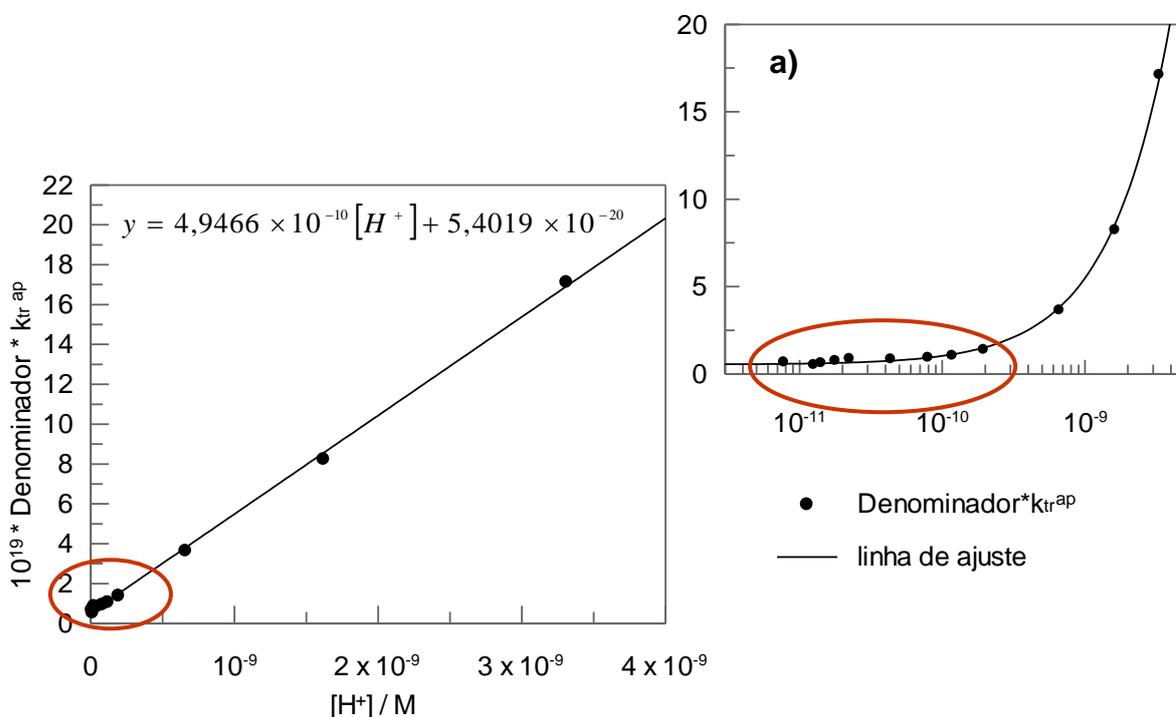


Figura 3.21 – Variação de denominador $\times k_{tr}^{ap}$ em função de $[H^+]$, com linha de ajuste à equação 3.21. **a)** ampliação com escala logarítmica no eixo dos xx. Intervalo assinalado a vermelho: $8 \times 10^{-12} < [H^+] < 8 \times 10^{-10}$ M.

Estruturalmente a NOTSG e a MNTS são muito idênticas (ver figuras 3.1 e 3.2) tendo apenas como diferença a presença de uma função guanidina entre o grupo sulfonilo e o azoto transportador do grupo NO, no caso da NOTSG. O facto do azoto que transporta o grupo NO se encontrar, na MNTS, directamente ligado ao grupo sulfonilo, promove um maior efeito de electroatração quando comparado com o efeito que se faz sentir na NOTSG, o que potencia o ataque nucleofílico na MNTS.

Assim sendo, por comparação análoga e como é referido inicialmente neste ponto, espera-se na reacção de transnitrosação da NOBMG para a cisteína, um comportamento mecanístico idêntico ao da NOTSG, mas ligeiramente menos reactivo, dado que o efeito electrotractor promovido pelo grupo benzoílo da NOBMG, no azoto susceptível de ataque nucleofílico, será menor do que o efeito promovido pelo grupo sulfonilo da NOTSG.⁹

3.4. Correlações estrutura-actividade

Tal como se descreve em 3.2.2, para além das reacções usando os nucleófilos 2-mercaptoetanol e cisteína, foram também realizadas reacções com outros nucleófilos de enxofre nomeadamente o metiltioglicolato, metil-3-mercaptopropionato e etanotiol. Estes tióis são exemplos de nucleófilos com ionização idêntica ao 2-mercaptoetanol obedecendo ao mesmo mecanismo proposto no esquema 3.3, assim como, ao mesmo modelo matemático deduzido.

Uma vez determinados os valores de k para as novas reacções de transnitroação de acordo com 3.2.2, estabeleceram-se as correlações de Brønsted para cada uma das N-nitrosoguanidinas, representando graficamente o logaritmo da constante de velocidade de transnitroação em função dos valores de pK_a de cada nucleófilo (tabela 3.5 e figura 3.22).

Tabela 3.5 – Valores das constantes de velocidade para as reacções de transnitroação da NOTSG e NOBMG com os vários tióis estudados. a) Valores calculados a partir da equação 3.11. e $pK_a^{NOBMG}=11,29$ b) Valores calculados a partir da equação 3.10. e $pK_a^{NOTSG}=10,73$ c) Valor de pK_a estimado pela equação 3.10 d) Valor estimado usando $pK_a^{RSH}=9,14$. e) Valor calculado a partir da equação 3.21 e $pK_a^{NOTSG}=10,73$.

	RS^-	$CH_3O_2CCH_2S^-$	$CH_3O_2CCH_2CH_2S^-$	$OHCH_2CH_2S^-$	Cys^{2-}	$CH_3CH_2S^-$
NOBMG	pK_a^{RSH}	7,81	9,33	9,60	10,20	10,60
	$k / M^{-1}s^{-1}$ a)	$3,87 \times 10^{-1}$	$2,18 \times 10^{-1}$	$1,84 \times 10^{-1}$	-----	$1,29 \times 10^{-1}$
NOTSG	pK_a^{RSH}	7,81	9,33	9,14 ^{c)}	10,20	10,60
	$k / M^{-1}s^{-1}$ b)	-----	$1,82 \times 10^{-1}$	$1,92 \times 10^{-1}$ d)	$1,60 \times 10^{-1}$ e)	$1,28 \times 10^{-1}$

A influência da basicidade dos iões tiolato nas constantes de velocidade de transnitroação para as duas N-nitrosoguanidinas, revelou-se aparentemente contraditória com um mecanismo de ataque nucleofílico, uma vez que os valores de β_{nuc} observados são negativos ($\beta_{nuc}(NOBMG) = -0,17$ e $\beta_{nuc}(NOTSG) = -0,11$) (B.7 e B.8 em anexo B), facto que sugere uma diminuição

da velocidade com o aumento da basicidade do ião tiolato, e não o contrário como seria expectável.

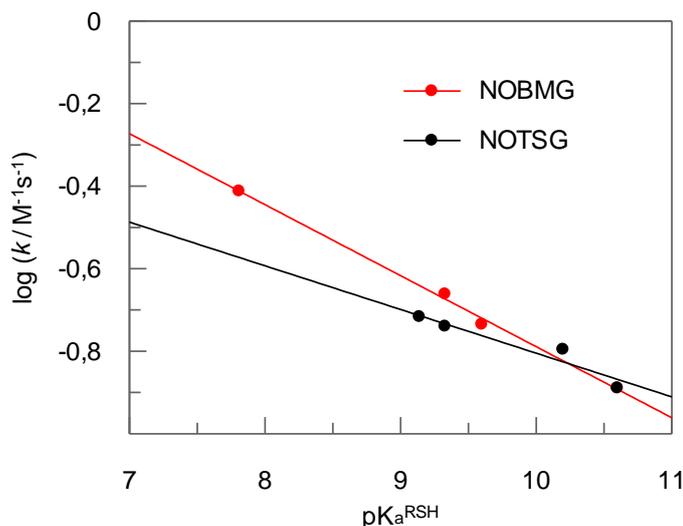


Figura 3.22 – Correlações de Brønsted relativas às reacções de transnitrosação da NOBMG e NOTSG para alguns nucleófilos de enxofre.

Valores de β_{nuc} negativos ou próximos de zero são raros para reacções de substituição nucleofílica, contudo, podem ser vistos como uma consequência de efeitos de solvatação na constante de velocidade promovendo, em alguns casos, a diminuição da velocidade de ataque de um determinado nucleófilo, à medida que a basicidade do mesmo aumenta. Este comportamento foi observado em reacções de transferência de grupos fosforilo para aminas,¹⁹ reacções de carbocatiões altamente reactivos com aminas²⁰ e reacções de iões tiolato com complexos carbeno do tipo Fischer.²¹ Também foram encontrados valores de β_{nuc} próximos de zero para reacções de aminas com difenilceteno²² e em reacções de transnitrosação de nucleófilos de enxofre com a MNTS² e N-nitrosossulfonamidas.²³

¹⁹ W. P. Jencks, M. T. Haber, D. Herschlag and K. L. Nazaretian, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 479-83.

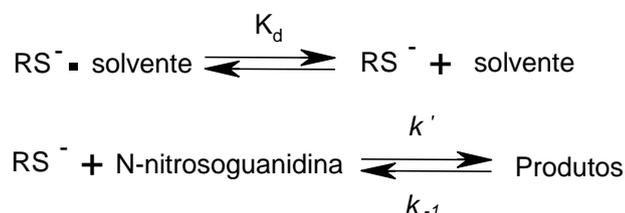
²⁰ (a) J. P. Richard, *J. Chem. Soc. Commun.*, 1987, 1968. (b) R. A. McClelland, V. M. Kanagasabapathy, N. S. Banait and S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 1816-23.

²¹ C. F. Bernasconi, K. W. Kittredge and F. X. Flores, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6630-39.

²² J. Andraos and A. Kresge, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5643-46.

²³ C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis, J. A. Moreira, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 8822-29.

De acordo com Jencks,¹⁹ os valores anómalos de β_{nuc} serão resultado da necessidade de dessolvatação do nucleófilo antes de iniciar a reacção, sendo a dessolvatação considerada como um pré-equilíbrio que ocorre num passo em separado como se mostra no esquema 3.7.



Esquema 3.7 – Reacção do ião tiolato com a N-nitrosoguanidina com pré-equilíbrio de dessolvatação do ião tiolato.

Atendendo ao esquema anterior, o valor experimental da constante de velocidade de transnitrosação (k) será dado pelo produto $K_d \times k'$, onde K_d é a constante de equilíbrio para a dessolvatação parcial do nucleófilo. Tendo em conta esta aproximação, podemos assumir que o valor de β_{nuc} observado será dado pela equação 3.22.

$$\beta_{nuc} = \frac{d(\log k)}{d(pK_a^{RSH})} = \frac{d(\log K_d k')}{d(pK_a^{RSH})} = \frac{d(\log K_d)}{d(pK_a^{RSH})} + \frac{d(\log k')}{d(pK_a^{RSH})} = \beta_d + \beta'_{nuc}$$

equação 3.22

Uma vez que a dessolvatação será tanto mais difícil quanto maior a basicidade do nucleófilo, é esperado um $\beta_d < 0$. Se os valores de β'_{nuc} forem pequenos, indicando um estado de transição (ver figura 3.23) com formação de ligação fraca, os valores de β_{nuc} observados terão uma maior contribuição de β_d o que fará com que sejam próximos de zero ou até mesmo negativos.

O valor de β_{nuc} observado para a reacção com a NOBMG, por ser mais negativo (-0,17), parece mostrar que o efeito de solvatação é ligeiramente superior quando comparado com a NOTSG (-0,11). De acordo com todos os resultados anteriores, a N-nitrosoguanidina contendo o grupo sulfonilo revelou ser um pouco mais reactiva do que a sua análoga contendo o grupo benzoílo e por esse motivo, para a NOTSG, a competição da substituição nucleofílica com

o pré-equilíbrio de dessolvatação será então ligeiramente maior do que para a NOBMG. Sendo assim, a contribuição de β'_{nuc} será um pouco superior à de β_d no caso da NOTSG enquanto que para a NOBMG, devido à sua menor reactividade, o valor de β_{nuc} observado tem uma maior contribuição de β_d .

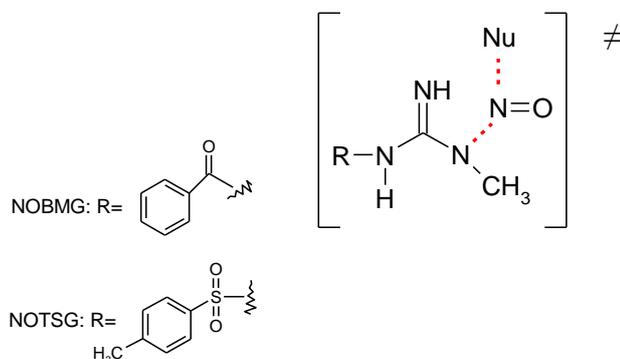


Figura 3.23 – Estado de transição da reacção de transnitrosação das N-nitrosoguanidinas para nucleófilo.

3.5. Conclusões

O presente estudo da reactividade das N-nitrosoguanidinas, NOBMG e NOTSG, na presença de nucleófilos de enxofre em condições básicas, permitiu comprovar a capacidade transnitrosante das mesmas com a formação directa de S-nitrosotióis, envolvendo a transferência do grupo nitroso por ataque nucleofílico do tiol na sua forma mais básica, a forma de tiolato (RS^-), à N-nitrosoguanidina na sua forma mais reactiva, a neutra.

A presença cromatográfica das guanidinas BMG e TSG no final das reacções realizadas e a observação espectrofotométrica da banda de absorção a 330 nm típica da transição $n^0 \rightarrow \pi^*$ da ligação S-NO, constituíram fortes evidências da formação dos correspondentes RSNO por um processo de transnitrosação.

O mecanismo proposto teve como fundamento o facto dos perfis pH-velocidade obtidos (figuras 3.11 e 3.18), quer para a transnitrosação com a cisteína, quer com o 2-mercaptoetanol, apresentarem a forma típica de sino mostrando que a velocidade da reacção aumenta à medida que aumenta a concentração do nucleófilo na forma de tiolato, atingindo uma velocidade

máxima para valores de pH em que a concentração do tiolato em solução é máxima. Para valores acima desse pH de velocidade máxima, observa-se a queda de k_{tr}^{ap} indicando o aparecimento em solução de uma espécie menos reactiva, mas agora por parte da N-nitrosoguanidina. Devido ao equilíbrio ácido-base das N-nitrosoguanidinas, acima de $pH \approx 9,6$, para a NOTSG, e $pH \approx 10,5$ para a NOBMG, inicia o aumento da concentração das suas formas aniónicas em solução, as quais são menos reactivas para o ataque nucleofílico uma vez que em torno da função guanidina há maior densidade electrónica devido ao ganho de um par de electrões não partilhado no azoto desprotonado (esquema 3.2) o que faz diminuir a sua electrofília e origina repulsões de carácter electrostático com a espécie nucleofílicas, o ião tiolato.

No caso concreto de formação da S-nitrosocisteína sendo a NOTSG o dador de NO, tal como no estudo realizado para a MNTS, os resultados experimentais foram consistentes com a proposta de ataque nucleofílico por parte das duas espécies nucleofílicas possíveis para a cisteína, $(HCys)^-$ e $(Cys)^{2-}$, sendo a $(Cys)^{2-}$ cerca de duas vezes mais reactiva do que $(HCys)^-$, para ambos os dadores de NO.

A maior reactividade (cerca de 100 vezes) encontrada na reacção de transnitrosação da MNTS para a cisteína, quando comparada para a mesma reacção com a NOTSG, é compatível com a existência de maior electrofília em torno do azoto portador do grupo NO na MNTS do que na NOTSG.

De forma análoga, comparando estruturalmente a NOBMG com NOTSG, a menor apetência para o ataque nucleofílico prevista para a primeira N-nitrosoguanidina, foi confirmada através das constantes de transnitrosação obtidas por ajuste às equações deduzidas com o 2-mercaptoetanol (tabela 3.3), e deve-se essencialmente ao menor efeito electroattractor que o grupo benzoílo promove comparativamente com o grupo sulfonilo existente segunda N-nitrosoguanidina.

A realização de reacções de transnitrosação para outros tióis simples com diferentes comportamentos ácido-base, contrariamente ao expectável, deu origem a correlações de Brønsted com valores de β_{nuc} observados negativos para ambas as N-nitrosoguanidinas em estudo (figura 3.22). Valores de $\beta_{nuc} < 0$ são raros e aparentemente contraditórios com um mecanismo envolvendo o ataque de um nucleófilo no entanto, vários estudos apoiam a teoria proposta

por Jencks que justifica os valores atípicos de β_{nuc} como consequência da necessidade de dessolvatação parcial do nucleófilo prévia à reacção. Deste modo, quanto maior a basicidade do nucleófilo, mais difícil é o processo de dessolvatação do mesmo, levando a que a velocidade de ataque nucleofílico seja cada vez menor e consequentemente, os valores de β_{nuc} tornam-se próximos de zero ou até mesmo negativos.

O β_{nuc} observado para a NOBMG por ser um pouco mais negativo do que o observado para a NOTSG, mostra que o poder de solvatação do nucleófilo é superior ao ataque nucleofílico no caso da NOBMG do que na NOTSG. Este dado é uma vez mais consistente com a menor reactividade da NOBMG quando comparada com a NOTSG na reacção de transnitrosação para tióis.

Embora os N-nitrosocompostos apresentem capacidade alquilante podendo ser potenciais agentes cancerígenos, se ocorrer decomposição por uma reacção de desaminação, verificou-se que as N-nitrosoguanidinas em estudo, na presença de nucleófilos de enxofre do tipo tiol, reagem predominantemente em toda uma gama de pH entre 7 e aproximadamente 11, transferindo directamente o grupo nitroso para o ião tiolato formando o S-nitrosotiol correspondente. Deste modo, podemos considerar as N-nitrosoguanidinas contendo substituintes electroattractores do tipo benzoílo e toluenossulfonilo, como potenciais dadores de óxido nítrico.

ANEXOS

ANEXO A

TABELAS

Tabela A.1 – Valores de k_{obs} em função de $[2\text{-mercaptoetanol}]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOTSG.

	[2-mercaptoetanol] _T /M							pH	
	0,50	0,40	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10		
$10^2 \times k_{obs} / s^{-1}$								0,024	6,50
								1,182	7,07
			2,900	2,510	1,910	1,330	0,735		8,78
	6,410	5,600	3,860		2,260		1,280		9,16
				3,970	3,470	2,810	1,860	0,960	9,41
	9,090	7,470			3,720		1,860	0,850	9,44
	9,890	8,130	6,610		4,550		1,940	1,220	9,48
	10,470	9,260	6,560		4,630		2,470		9,67
				5,390	4,350	3,690	2,460	1,060	9,78
			7,500	6,380	5,340	4,180	3,290		10,07
	10,470	8,700			5,020		2,390	1,210	10,20
	11,640	9,480	7,050		4,800		2,470		10,26
	10,380	8,960			4,790		2,530		10,48
		8,180	6,390				1,980		10,58
	9,190	7,020	6,240		4,000		2,080		10,63
	6,970	5,550	4,350		3,160		2,180		10,76
		3,910	2,950				1,470	0,820	11,00
		1,370							11,50

Tabela A.2 – Valores de k_{obs} em função de $[2\text{-mercaptoetanol}]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOBMG.

	[2-mercaptoetanol] _T /M						pH
	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	
$10^2 \times k_{obs} / s^{-1}$	1,840	1,590		1,070	0,690		8,81
	2,400	2,120	1,720	1,270	0,870	0,440	9,06
	2,560	2,280	1,740	1,350	0,930	0,470	9,10
	2,830	2,560	2,050	1,580	1,080	0,510	9,20
		3,030	2,440	1,830		0,640	9,40
	3,890	3,520	2,870	2,140	1,440	0,680	9,52
	4,630	3,970	3,130	2,420	1,650	0,820	9,73
	5,100	4,150	3,450	2,650	1,720	0,900	10,13
	5,270	4,390	3,740	2,960	1,830		10,57
			2,810	2,390	1,340		10,65
	1,830		1,200	0,840			11,00
	1,980	1,760		1,260	1,070		11,50
	1,930		1,630	1,490	1,330		12,00

Tabela A.3 – Valores de k_{tr}^{ap} , pH, $[H^+]$ e quociente $[H^+] / k_{tr}^{ap}$ para as reacções da NOTSG e NOBMG com o 2-mercaptoetanol.

NOTSG				NOBMG			
$10 \times k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH	$10^{10} \times [H^+] / M$	$10^{10} \times ([H^+] / k_{tr}^{ap})$	$10 \times k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH	$10^{10} \times [H^+] / M$	$10^{10} \times ([H^+] / k_{tr}^{ap})$
0,048	6,50	3162,280	658808,000	0,561	8,810	15,488	276,081
0,236	7,70	199,526	8454,500	0,803	9,060	8,709	108,464
1,103	8,78	16,596	150,461	0,852	9,100	7,943	93,231
1,359	9,16	6,918	50,907	0,941	9,200	6,309	67,052
1,527	9,41	3,890	25,478	1,198	9,400	3,981	33,231
1,839	9,44	3,631	19,743	1,313	9,520	3,020	23,000
1,966	9,48	3,311	16,843	1,527	9,730	1,862	12,194
1,989	9,67	2,138	10,749	1,662	10,130	0,741	4,460
2,106	9,78	1,660	7,880	1,666	10,570	0,269	1,616
2,123	10,07	0,851	4,009	1,475	10,650	0,224	1,518
2,047	10,20	0,631	3,082	0,656	11,000	0,100	1,524
1,986	10,48	0,331	1,667	0,467	11,500	0,032	0,677
1,722	10,63	0,234	1,361	0,300	12,000	0,010	0,333
1,198	10,76	0,174	1,451				
0,844	11,00	0,100	1,184				
0,343	11,50	0,032	0,922				

Tabela A.4 – Valores de k_{obs} em função de $[Nucleófilo]_T$ e correspondentes valores de k_{tr}^{ap} para as reacções da NOTSG com os vários tióis simples estudados.

$10^2 \times k_{obs}/s^{-1}$	[Nucleófilo] _T /M						Nucleófilo	pH	$10 \times k_{tr}^{ap}/M^{-1} s^{-1}$
	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025			
2,864	2,692	1,576	1,151	0,573	0,255	Metil-3-mercaptopropionato	10,10	1,266	
	1,460	1,329	1,090	0,923			Etanotiol	10,60	0,370

Tabela A.5 – Valores de k_{obs} em função de $[Nucleófilo]_T$ e correspondentes valores de k_{tr}^{ap} para as reacções da NOBMG com os vários tióis simples estudados.

$10^2 \times k_{obs}/s^{-1}$	[Nucleófilo] _T /M					Nucleófilo	pH	$10 \times k_{tr}^{ap}/M^{-1} s^{-1}$
	0,20	0,15	0,10	0,05	0,025			
3,024	4,430	3,453	2,325	1,245	0,631	Metiltioglicolato	7,90	2,174
	3,273	2,677	1,927	1,385	0,992	Metil-3-mercaptopropionato	9,86	1,512
						Etanotiol	12,2	1,298

Tabela A.6 – Valores de k_{obs} em função de $[Cys]_T$ para os diferentes pH estudados com a NOTSG.

	[Cys] _T /M						pH		
	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05		0,025	
$10^2 \times k_{obs} / s^{-1}$			1,358	0,747		0,183	0,054	8,48	
			1,660	1,240	0,830	0,690	0,180	8,79	
			2,190	1,450	1,195	0,831	0,411	9,18	
			2,490		1,450	1,040	0,460	9,71	
			2,610	2,216	1,570	1,102	0,0547	9,93	
			2,752			1,053	0,560	10,10	
				2,267	1,710		0,602	10,36	
			2,251	2,014	1,243			10,65	
		2,199	1,760	1,446		0,585		10,75	
			1,590	1,290		0,730	0,410	10,85	
			1,440		0,980		0,520	10,90	
				0,992	0,769	0,576	0,363	0,248	11,11

Tabela A.7 – Valores de k_{tr}^{ap} , pH, $[H^+]$, denominador e denominador x k_{tr}^{ap} para a reacção da NOTSG com cisteína.

$10 \times k_{tr}^{ap} / M^{-1} s^{-1}$	pH	$10^{10} \times [H^+] / M$	$10^{19} \times \text{denominador}$	$10^{20} \times (\text{denominador} \times k_{tr}^{ap})$
0,608	8,48	33,113	281,564	171,191
0,737	8,79	16,218	111,735	82,349
0,887	9,18	6,607	41,073	36,432
1,001	9,71	1,950	13,890	13,904
1,048	9,93	1,175	10,063	10,544
1,104	10,10	0,794	8,462	9,342
1,110	10,36	0,437	7,609	8,446
1,008	10,65	0,224	8,624	8,693
0,798	10,75	0,178	9,507	7,586
0,584	10,85	0,141	10,727	6,265
0,460	10,90	0,126	11,483	5,282
0,420	11,11	0,078	16,008	6,728

ANEXO B

AJUSTES

Weighting: Simple
 Data points: 16
 Reduced chi²: 0,0029

Parameter	Value	Std. Error
KaNOHX	1,86160e-011	4,27174e-012
KaRSH	7,21501e-010	1,86297e-010
k	0,2883	0,0263

B.1 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.10 dos valores experimentais k_{tr}^{ap} vs $[H^+]$ para a reacção da NOTSG com 2-mercaptoetanol.

Weighting: Simple
 Data points: 13
 Reduced chi²: 0,0017

Parameter	Value	Std. Error
KaNOHX	1,55444e-011	4,73324e-012
KaRSH	4,07199e-010	1,05121e-010
k	0,2476	0,0323

B.2 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.10 dos valores experimentais k_{tr}^{ap} vs $[H^+]$ para a reacção da NOBMG com 2-mercaptoetanol.

Weighting: Proportional
 Data points: 16
 Reduced chi²: 0,9124

Constants

a 7,84000e-011

Parameter	Value	Std. Error
b	4,2597	0,4115
c	8,04802e+008	1,59783e+008

B.3 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.11 dos valores experimentais $[H^+]/k_{tr}^{ap}$ vs $[H^+]$ para a reacção da NOTSG com 2-mercaptoetanol.

Weighting: Proportional
 Data points: 13
 Reduced chi²: 0,3396

Constants
 a 2,82000e-011

Parameter	Value	Std. Error
b	5,4456	0,5536
c	7,71046e+009	1,41205e+009

B.4 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.11 dos valores experimentais $[H^+]/k_{tr}^{ap}$ vs $[H^+]$ para a reacção da NOBMG com 2-mercaptoetanol.

Weighting: Simple
 Data points: 12
 Reduced chi²: 0,0008

Constants
 Ka1 0,0159
 Ka2 5,01190e-009
 Ka3 6,31000e-011

Parameter	Value	Std. Error
k1	0,0907	0,0088
k2	0,2364	0,0558
KaNOTSG	3,05798e-011	1,13147e-011

B.5 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.20 dos valores experimentais k_{tr}^{ap} vs $[H^+]$ para a reacção da NOTSG com a cisteína.

Weighting: Simple
 Data points: 12
 Chi²: 2,79124e-039
 Correlation coefficient: 0,9995

Parameter	Value	Std. Error
a (intercept)	5,40186e-020	5,46198e-021
b (gradient)	4,94659e-010	5,04013e-012

B.6 – Resultados obtidos por ajuste à equação 3.21 dos valores experimentais denominador k_{tr}^{ap} vs $[H^+]$ para a reacção da NOTSG com a cisteína.

Equation: a + bx (Linear regression)
 Weighting: Simple
 Data points: 4
 Chi²: 0,0004
 Correlation coefficient: -0,9984

Parameter	Value	Std. Error
a (intercept)	0,9323	0,0649
b (gradient)	-0,1721	0,0069

B.7 – Resultados obtidos por ajuste linear aos valores de k vs pK_a para a correlação de Brønsted da NOBMG.

Equation: a + bx (Linear regression)
 Weighting: Simple
 Data points: 4
 Chi²: 0,0015
 Correlation coefficient: -0,9572

Parameter	Value	Std. Error
a (intercept)	0,2712	0,2264
b (gradient)	-0,1077	0,0230

B.8 – Resultados obtidos por ajuste linear aos valores de k vs pK_a para a correlação de Brønsted da NOTSG.