

6. Conclusão

Nesse trabalho verificou-se que as Fe(III)-porfirinas solúveis sofrem nitrosilação redutiva ao serem tratadas com SNAP. O mecanismo através do qual essa nitrosilação ocorre é bem diferente do já estabelecido para nitrosilação redutiva por gás NO, sendo cerca de quatro ordens de grandeza mais rápido.

Ao se analisar, por absorção ótica, a cinética de nitrosilação de Fe(III)TPPS₄, aniônica, e de Fe(III)TMPyP, catiônica, por concentrações crescentes de SNAP, observou-se que a reação de nitrosilação é de 1ª ordem em SNAP. Foram calculadas as constantes cinéticas de segunda ordem para as duas porfirinas: $k_{\text{TMPyP}} = 0.84 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_{\text{TPPS}_4} = 0.97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Concluiu-se que o mecanismo da reação é praticamente independente da natureza dos substituintes dos anéis porfirínicos.

Foi proposto um mecanismo de nitrosilação redutiva por S-nitrosotióis, capaz de explicar as diferenças em relação à nitrosilação redutiva pelo gás NO. Este envolve a hidrólise de SNAP pelo ligante H₂O, perpendicular ao plano da porfirina, produzindo a transferência de NO⁻ do SNAP para o Fe(III) da porfirina, acompanhada da formação do ácido sulfênico derivado de N-acetilpenicilamina.

Por EPR, verificou-se que os complexos NO-Fe(II)TPPS₄ e NO-Fe(II)TMPyP apresentam espectros bastante diferentes, indicando campo cristalino no centro paramagnético com simetrias diferentes. Enquanto o espectro de NO-Fe(II)TMPyP, bem anisotrópico, é característico de Fe-porfirinas penta-coordenadas, o espectro de NO-Fe(II)TPPS₄ apresenta-se mais simétrico. Em comparação com espectros obtidos através de nitrosilação por tratamento com gás NO, foi observado que os parâmetros de EPR são semelhantes, mas a estrutura hiperfina apresentou-se muito mais resolvida.

Foi observado que, ao contrário de gás NO, SNAP é capaz de produzir os complexos nitrosilados de ferro-porfirinas em ambiente aeróbico. Esse fato reforça a proposta de uma transferência direta de NO⁻ do SNAP para o Fe(III) da porfirina.

Nos experimentos com complexos nitrosilados em micelas submetidos a ambiente aeróbico, verificou-se por absorção ótica que o espectro permanece inalterado por várias horas. Observou-se que em pH 5,0 a reação de O_2 com NO-Fe(II)P não produz o retorno ao espectro inicial de Fe(III)P. Sugerimos que espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio atacam a porfirina comprometendo sua integridade. Essas espécies reativas ocorreriam em menor quantidade em pH 8,0 já que maior reversibilidade foi encontrada nesse pH.

Por EPR, constatamos eficiência parcial da proteção micelar em relação ao ataque por oxigênio (meia vida de cerca de 1 h). O fato de não se ter observado modificação no espectro ótico das porfirinas nitrosiladas por bem mais do que duas horas sugere que o ataque ao centro paramagnético por O_2 não modifica significativamente os níveis eletrônicos responsáveis pelas transições óticas.

Medidas óticas da titulação das ferro-porfirinas com albumina sérica bovina, evidenciaram diferenças significativas entre a porfirina catiônica e a aniônica, tanto nos valores das constantes de associação quanto no número de sítios de ligação (n), sugerindo forte influência de fatores eletrostáticos na ligação porfirina-BSA. Para a Fe-TPPS₄ foram obtidos $K_b = 0,67 \times 10^6 M^{-1}$ e $n = 6$, num modelo de vários sítios de ligação idênticos. Para a porfirina catiônica, a constante de associação à BSA foi cerca de dez vezes menor do que a obtida para a porfirina aniônica, ajustada num modelo de apenas 1 sítio.

Na presença de BSA, a porfirina catiônica, com menor constante de associação ($K_b = 0,65 \times 10^5 M^{-1}$), sofreu nitrosilação por SNAP com tempo característico cerca de quatro vezes menor do que o obtido em tampão. Concluiu-se que a ligação de Fe(III)TMPyP à BSA facilita sua nitrosilação por SNAP. Por outro lado, nas mesmas condições experimentais, a porfirina aniônica, incorporada aos sítios da BSA, não foi nitrosilada, indicando que a ligação de Fe(III)TPPS₄ ao(s) sítio(s) em BSA torna a porfirina inacessível ao SNAP.

Os resultados apresentados nesse trabalho abrem novos caminhos para utilização de porfirinas sintéticas no controle da biodisponibilidade de óxido nítrico no sistema circulatório.