Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Química del HNO: generación, detección y cuantificación en sistemas bioinorgánicos

Suárez, Sebastián Angel

2015-03-20

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Suárez, Sebastián Angel. (2015-03-20). Química del HNO: generación, detección y cuantificación en sistemas bioinorgánicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Suárez, Sebastián Angel. "Química del HNO: generación, detección y cuantificación en sistemas bioinorgánicos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-20.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física.

Química del HNO: Generación, detección y cuantificación en sistemas bioinorgánicos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física

Sebastián A. Suárez

Directores de Tesis: Fabio A. Doctorovich

Marcelo A. Martí

Consejero de Estudios: Jose H. Hodak

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, FCEN, UBA. Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE - CONICET)

Buenos Aires, Marzo 2015

RESUMEN

La azanona (^{1}HNO, Nitroxilo) muestra interesantes, pero poco conocidos, efectos químico-biológicos. Tiene algunas propiedades superpuestas con el óxido nítrico (NO), compartiendo su reactividad hacia las hemoproteínas, tioles y oxígeno. Sin embargo, a pesar de esta similitud HNO y NO muestran diferentes efectos fisio y farmacológicos. En este contexto, se ha sugerido que la azanona podría ser un intermediario en varias reacciones y que podría ser una molécula de señalización producida enzimáticamente. Debido a su alta reactividad, para estudiarla deben usarse compuestos llamados ``dadores`` capaces de liberar espontáneamente HNO, tales como el trioxodinitrato (sal de Angeli). Por estos motivos, y producto de la dificultad inherente para la detección inequívoca de su presencia, y distinción del NO, es que la respuesta a muchos interrogantes sobre su rol químico-biológico sigue sin conocerse.

Concretamente en esta Tesis se describe el desarrollo y aplicaciones de un dispositivo electroquímico de detección de HNO basado el depósito de una porfirina de cobalto sobre un electrodo de oro por unión covalente. Un efecto de superficie afecta a los potenciales redox y permite la discriminación entre HNO y NO. La reacción con la azanona es rápida, eficiente, selectiva, y carece de señales espurias frente o debido a especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. El sensor es biológicamente compatible y de alta sensibilidad ([nM]). Esta detección (con resolución temporal) permite, como se muestra en esta tesis, el análisis de reacciones que producen (o se presume generan) HNO. En este contexto, se presentan estudios relativos a la capacidad de generación de HNO de nuevos dadores de azanona y a la interconversión de NO a HNO mediada por alcoholes y tioles.

Finalmente, se discuten las reacciones estudiadas y otras en el contexto de la potencial formación endógena de HNO y las implicancias del uso *in vivo* del dispositivo de detección de azanona desarrollado en este trabajo.

Palabras Claves: HNO, azanona, nitoxilo, sensor electroquímico, bioinorganica.

ABSTRACT

Azanone (^{1}HNO, Nitroxyl) shows interesting, yet poorly understood, chemical and biological effects. It has some overlapping properties with nitric oxide (NO), sharing its biological reactivity towards heme proteins, thiols and oxygen. Despite this similarity HNO and NO show significantly different physio and pharmacological effects. The high reactivity of HNO means that studies must rely on the use of donor molecules such as trioxodinitrate (Angeli's Salt). It has been suggested that azanone could be an intermediate in several reactions and that it may be an enzymatically produced signaling molecule. The inherent difficulty in detecting its presence unequivocally prevents evidence from yielding definite answers.

In this thesis, we developed an electrochemical HNO sensing device based on the covalent attachment of a cobalt porphyrin to gold. A surface effect modulates the redox potentials and allows discrimination between HNO and NO. The reaction with the former is fast, efficient and selective, lacking spurious signals due to the presence of reactive nitrogen and oxygen species. The sensor is both biologically compatible and highly sensitive ([nM]). This time-resolved detection allows kinetic analysis of reactions producing HNO. The sensor thus offers excellent opportunities to be used in experiments looking for HNO. We present studies concerning to HNO donation capabilities of new HNO donors as assessed by the sensor, and the NO to HNO interconversion mediated by alcohols and thiols.

Finally, we briefly discuss the key experiments required to demonstrate endogenous HNO formation to be done in the near future, involving the in vivo use of the HNO sensing device.

Keywords: HNO, azanone, nitroxyl, electrochemical sensor, bioinorganic.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

1. Química del HNO **p. 13**

1.1 Estructura y nomenclatura (HNO, nitroxilo y azanona)

1.1.1 Estados de spin y acidez

1.2 Farmacología y toxicidad del HNO

1.2.1 Moléculas pequeñas funcionando como señales intercelulares

1.2.2 El caso particular de las especies HNO y NO

1.3 Producción in-vivo de HNO

1.4 Reacciones de HNO con moléculas pequeñas biológicamente relevantes

1.4.1 Dimerización

1.4.2 Reactividad frente a oxígeno, NO y tioles

1.5 Dadores de HNO

1.5.1 Sal de Angeli

1.5.2 Ácido de Piloty

1.5.3 Otros

2. Reactividad de azanona frente a metaloporfirinas **p. 33**

2.1 Metaloporfirinas nitrosiladas de Mn, Fe y Co

2.2 Reactividad de HNO y NO frente a porfirinas de Fe, Mn y Co

2.3 Reactividad de dadores de HNO frente a metaloporfirinas y efecto del oxígeno

3. Detección de HNO **p. 41**

3.1 Uso de atrapantes: Porfirinas, Tioles y Fosfinas

3.2 Espectrometría de masa (MS) y Resonancia paramagnética electrónica (EPR)

3.3 Fluorescencia

CÁPITULO II - MATERIALES Y MÉTODOS

4. Síntesis **p. 49**

4.1 Óxido Nítrico

4.2 Sal de Angeli

4.3 Nuevos dadores de HNO: derivados del ácido de Piloty

4.4 Nitrosomelatonina

4.5 Porfirina nitrosilada de cobalto ($Co^{III}(P)NO^{-}$)

5. Instrumentación **p. 53**

5.1 Técnicas Electroquímicas

5.1.1 Consideraciones Generales

5.1.2 Preparación de electrodos

5.1.3 Inmovilización de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ sobre una superficie de oro

5.1.4 Adsorción de cistamina y tioles sobre la superficie modificada con Co(P)

5.2 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS).

5.3 Caracterización por Microscopía de Efecto Túnel (STM)

5.4 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

CÁPITULO III - RESULTADOS

6. Desarrollo y caracterización del electrodo sensor de HNO **p. 63**

6.1 Voltametrías Cíclicas de Co(P) en solución de CH_2Cl_2

6.2 Unión covalente y voltametrías cíclicas de Co(P) sobre electrodo de oro

6.3 Caracterización de electrodos modificados por XPS y STM

6.3.1 Medición del recubrimiento del electrodo de oro con Co(P)

6.3.2 Medición del área superficial efectiva del electrodo

6.4 Cálculos de estructura electrónica de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$

6.5 Detección y discriminación de HNO/NO utilizando el electrodo de oro modificado con Co(P)

7. Cuantificación *en tiempo real* de HNO utilizando el sensor amperométrico p. 81

7.1 Análisis cinético de la respuesta del electrodo en tiempo real para HNO

7.1.1 Modelo cinético de la respuesta de Co(P) a Sal de Angeli

7.1.2 Uso de la señal resuelta en el tiempo del electrodo Co(P) para determinar parámetros cinéticos de reacciones que involucren HNO

7.2 Determinación del rango dinámico de la detección cuantitativa de HNO

7.3 Análisis de posibles señales espurias debido a interacciones de otras moléculas pequeñas con el electrodo de Co(P)

7.3.1 Respuesta del electrodo en la presencia de oxígeno

7.3.2 Respuesta del electrodo en la presencia de otras especies reactivas de nitrógeno y oxígeno biológicamente relevantes (RNOS)

7.4 Prueba de la respuesta del electrodo de Co(P) en medios biológicos

8. Reacciones en las cuales HNO ha sido propuesto como intermediario p.97

8.1 Nuevos dadores de azanona: derivados del acido de Piloty

8.1.1 Medición de la descomposición en función del pH

8.1.2 Medición de la producción de HNO en función del pH

8.1.3 Deprotonación en NH versus OH, y efecto de los grupos atractores de electrones versus los dadores de electrones

8.2 Reacciones de NO con alcoholes: ¿una posible fuente endógena de HNO?

8.2.1 La reacción de NO con alcoholes aromáticos genera azanona

8.2.2 Caracterización de productos finales

8.2.3 Análisis del mecanismo de reacción

CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES pag. 121

9. Perspectivas pag. 124

CAPÍTULO V – REFERENCIAS pag. 125

10. Publicaciones realizadas durante la Tesis pag. 137

OBJETIVOS

El desarrollo, caracterización, y aplicación de un sensor selectivo para HNO y con sensibilidad en la escala del bajo nanomolar fue llevado a cabo durante la presente tesis doctoral. Los resultados obtenidos, se encuentran en los capítulos y secciones subsiguientes.

Estructura del trabajo

I. Introducción

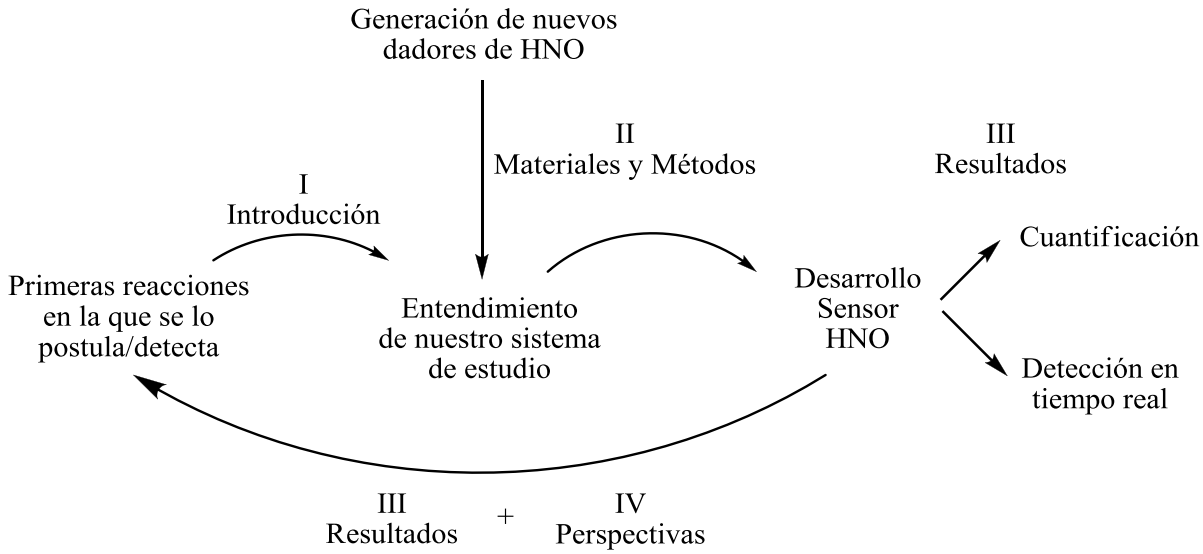
II. Materiales y métodos

III. Desarrollo y caracterización fisicoquímica del sensor selectivo de HNO

III. Caracterización analítica y de interferencias del sensor

III. Aplicaciones fisicoquímicas y bioinorgánicas *in vitro*

IV. Perspectivas: aplicaciones *in vivo*



CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. Química del HNO

1.1 Estructura y nomenclatura

El HNO (nitroxilo, azanona) es una molécula altamente reactiva y un compuesto intrigante, cuya naturaleza no ha sido completamente dilucidada. Aunque hoy en día se acepta que la forma más estable es el estado singlete ^{1}HNO, el triplete ^{3}NOH es también una molécula viable. Ambos han sido observados espectroscópicamente en condiciones, más bien atípicas, tales como una matriz de argón.[1,2] La diferencia de estabilidad termodinámica entre estas especies es relativamente pequeña, estimándose en alrededor de 20 kcal / mol.[3,4]

Desde el punto de vista estructural (Figura 1), el ^{1}HNO muestra una estructura angular con el átomo de N en el centro y con un ángulo de alrededor de 109°. La distancia del enlace N=O se estima que es 1.211 Å, la cual es más larga que la misma distancia en el óxido nítrico (NO), debido a la adición de densidad electrónica al orbital π antienlazante. Por eso, la frecuencia de infrarrojo (IR) para la tensión N=O en el ^{1}HNO es cerca de 200 cm^{-1} más pequeña que en el NO.

Datos Vibracionales (cm^{-1})	
$\nu(NH)_{st}$	2685
$\nu(NO)_{st}$	1565
$\nu(NH)_{bnd}$	1500

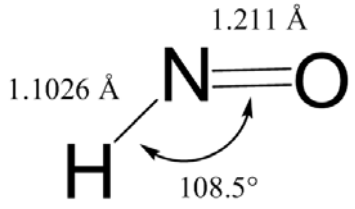


Figura 1 – Información estructural y vibracional del ^{1}HNO.[5]

Además del nombre familiar y ampliamente utilizado "**nitroxilo**", el **HNO** ha sido también conocido como hidruro de nitrosilo,[6] el cual no es apropiado, ya que el HNO es un ácido débil pero definitivamente no es un hidruro. El principal problema con el nombre "nitroxilo" es que los radicales aminoxilo (de fórmula general $R_2NO^{\bullet}$), por lo general, se conocen como radicales nitroxilo, y no existe una estrecha relación estructural entre HNO y estos radicales orgánicos.

En los últimos años, se propuso utilizar el nombre recomendado por el Libro Rojo de la IUPAC,[7] **azanona**. Este nombre deriva del nombre IUPAC para el amoníaco (azano) relacionándolo con el compuesto isoelectrónico HN=NH (diazeno). El anión de la azanona, $^{3}NO^{-}$, con un estado fundamental triplete, se ha llamado anión nitroxilo,[8] anión nitrosido,[9] y oxonitrato (1-).[10] El nombre sugerido por IUPAC es óxidonitrato (1-). Sin embargo, hay una falta de coherencia en los nombres sugeridos, ya que en ninguno de ellos está representada la relación ácido/base entre HNO y NO^{-}. Teniendo en cuenta lo anterior, fue propuesto recientemente "anión azanona" como el nombre más apropiado para el NO^{-}.

1.1.1 Estados de spin y acidez

Mientras que el NO es un radical libre con un estado basal doblete, ^{1}HNO tiene un estado basal singlete.[11,12] Es un ácido débil con un pK_a aceptado de 11.4.[13,14]Su anión $^{3}NO^{-}$, tiene un estado basal triplete,[15-18] lo mismo que la molécula isoelectrónica O_2. Por lo tanto, la pérdida de un protón del HNO no es un simple equilibrio ácido-base sino que es un equilibrio lento prohibido por spin (Tabla 1, Figura 2):[13]

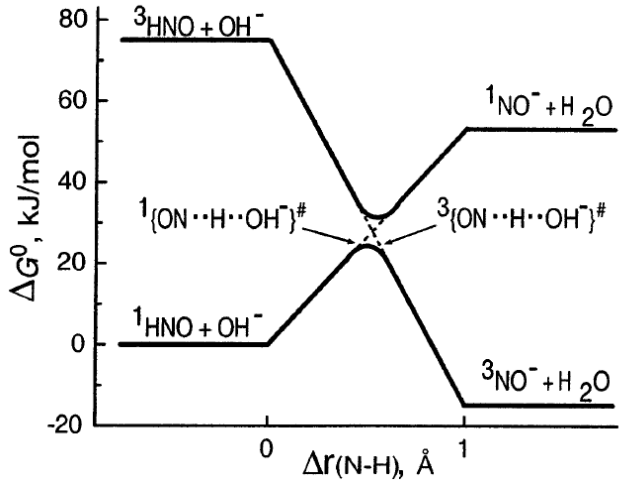


Figura 2 - Cambio de energía libre para varias reacciones de la cupla ^{1}HNO + OH^{-} en agua. Las líneas continuas representan los perfiles de energía adiabática a lo largo del cambio de la distancia NH durante la transferencia de protones, Δr(N-H), la cual se muestra como coordenada de reacción.[13]

La reprotonation de $^{3}NO^{-}$ a ^{1}HNO también es lenta (Tabla 1). En principio, la coordinación debe bajar el pK_a del HNO. De acuerdo con esta hipótesis, Olabe y

colaboradores han reportado que el complejo $[Fe(II)(CN)_5(HNO)]^{3-}$ tiene un valor de pK_a de 7,7.[19] Sin embargo, Farmer y colaboradores han sugerido que el valor de pK_a para el aducto HNO-Fe(II)Mb esta cerca de 11, probablemente debido al efecto de las interacciones de unión de hidrógeno en las cercanías del sitio activo.[20] El NO actúa como base coordinándose a una gran variedad de centros metálicos, y se conocen muchos complejos de nitrosilo,[21] con carácter NO^+, $NO^{\bullet}$ o NO^- (ver Capítulo 2.1). Su cupla redox NO^+ es por otro lado, un ácido y electrófilo fuerte.

1.2 Farmacología y toxicología de HNO

1.2.1 Moléculas pequeñas funcionando como señales intercelulares.

La naturaleza química de las señales que intervienen en la comunicación celular es muy diversa y comprende desde derivados de aminoácidos, péptidos y proteínas hasta moléculas orgánicas relativamente complejas como los esteroides.[22] Sin embargo, en el transcurso de las últimas décadas, un nuevo grupo de transmisores obligó a revisar los conceptos convencionales de señalización intercelular. Desde que se descubrió que pequeñas moléculas gaseosas, como el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) o el sulfuro de hidrogeno (H_2S), se producen en forma endógena,[23–25] fue revelándose su participación como señales extracelulares en los diversos organismos.[26–28]

Una serie de características particulares relacionadas a su estructura química distinguen a este tipo de señales extracelulares:

- Son sintetizadas en el mismo momento de su liberación y no son almacenadas en estructuras vesiculares: el control de liberación por parte de la célula secretora, está dado por mecanismos regulatorios de su biosíntesis.
- Al no poseer carga, estas moléculas gaseosas son permeables a la membrana celular, por lo que difunden con facilidad a través de la membrana plasmática hasta la célula blanco, participando principalmente en la regulación de procesos fisiológicos locales.
- Dentro de la célula blanco, actúan de forma directa sobre su metabolismo a través de la modificación química de proteínas citoplasmáticas. Estas modificaciones incluyen la química rédox con residuos aminoacídicos específicos y centros metálicos presentes en el grupo prostético, o la unión no covalente en regiones regulatorias críticas de la proteína receptora.

En este sentido, la química de hemoproteínas representa un buen ejemplo de proteínas receptoras. Si bien pueden presentar alta afinidad por los diferentes gases, la respuesta de cada uno de ellos está regulada de diferente modo. Como ejemplo, la Figura 3 muestra que la respuesta inflamatoria a la acción de un patógeno está regulada por NO, CO y H_2S como señales extracelulares. Además, algunas de estas pequeñas moléculas gaseosas pueden regular la actividad de las enzimas que producen las otras.[29]

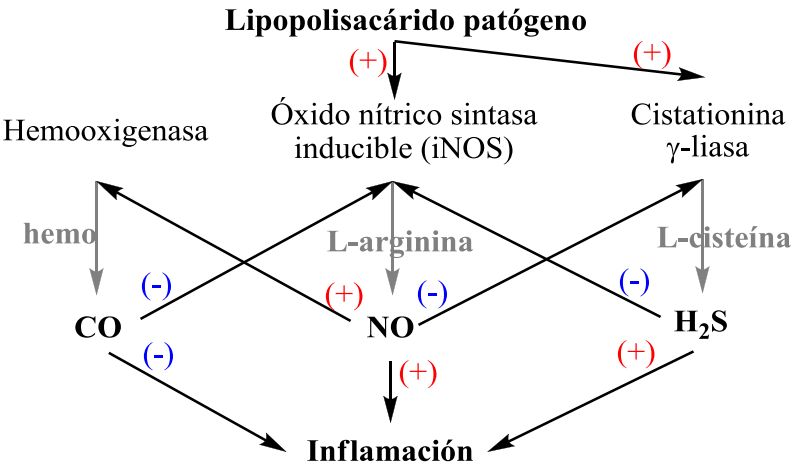


Figura 3. Interacción del óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S) como señales extracelulares en la respuesta inflamatoria.[22,29]

1.2.2 El caso particular de las especies HNO y NO.

El NO fue caracterizado hace más de 200 años por Joseph Priestly pero, al igual que el resto de los gases que intervienen en procesos de señalización, su importancia fisiológica fue reconocida muchos años mas tarde. Hacia 1980, Louis Ignarro reportó la producción endógena de NO en células endoteliales, y descubrió su participación en la vasodilatación arterial.[23] Por dichas investigaciones, el NO fue elegida ``Molécula del Año`` en 1992, y el Dr. Ignarro obtuvo el premio Nobel de Medicina en el año 1998. A raíz del descubrimiento de su rol fisiológico, la reactividad química y bioquímica del NO, fueron estudiadas detalladamente durante las últimas dos décadas.[23,30–32] Como se mencionó anteriormente, los óxidos de nitrógeno, especialmente NO, juegan un papel importante en muchos procesos fisiológicos. Específicamente, en las funciones cardiovasculares, donde regula el flujo de sangre, mediante la transmisión de la señal de relajación del endotelio (donde no se produce) a las células musculares lisas vasculares NO sensibles.[33,34] La formación de óxido

nítrico en medio biológico se debe principalmente a la acción de las óxido nítrico sintasas (NOS), estas emplean arginina, NADPH y O_2, para producir NO y citrulina (reacción 1).[35]

$$2\text{L-arginina} + 3\text{NADPH} + 3H^+ + 4O_2 \xrightarrow{\text{NOS}} 4H_2O + 2\text{L-citrulina} + 3NADP^+ + 2NO \quad (1)$$

En hipoxia, el NO puede generarse por reducción de nitrito mediada por centros metálicos (reacción 2).[36,37]

$$NO_2^- \xrightarrow{\text{metaloenzimas (Cu o Fe)}} NO \quad (2)$$

Se ha observado que, en bajas concentraciones, el NO resulta esencial para la regulación de la actividad celular. Sin embargo, a altas concentraciones, como las que se experimentan frente a la respuesta inmune, puede producir estrés oxidativo y nitrosativo, que terminan en la muerte celular y el daño en los tejidos.[38] Los procesos tóxicos asociados con el exceso de NO, pueden atribuirse al efecto directo o indirecto del oxido nítrico, o bien al efecto indirecto del NO como consecuencia de su reacción con O_2. En este último caso, se observa la posterior formación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RNOS) como el NO_2, N_2O_3 o el $ONOO^-$.[39]

Más recientemente, **se sumaron a la familia de especies reactivas de nitrógeno** biológicamente relevantes el anión azanona (**NO^-**) y su ácido conjugado, la azanona (**HNO**).[40,41]

El gran interés en los efectos biológicos del HNO ha surgido principalmente debido a la amplia variedad de estudios estrechamente relacionados con el óxido nítrico.

En los 20 años de investigación en el campo de la liberación de NO, se ha producido un importante desarrollo de fármacos nitrovasodilatadores, tales como NONOatos (ver Sección 1.5.3). Curiosamente, y a pesar de la reactividad estrechamente relacionada de NO y HNO, las vías de acción bioquímicas resultan ser muy diferentes. Este entendimiento se logró hace unos 10 años, cuando con varios estudios se demostró que la presencia de dadores de NO producen efectos *in vivo* diferentes que los observados para los dadores de HNO.[42] Varios grupos han comparado y contrastado la farmacología y toxicología de HNO y NO, entre ellos Wink, Miranda y colaboradores.[43–45]

Históricamente, el HNO entró a la luz como una posible sustancia biológicamente activa, a mediados de los años ochenta, con estudios relacionados con la cianamida (H_2NCN), un medicamento contra el alcoholismo.[46,47] La cianamida genera HNO en una reacción oxidativa (con catalasas o peroxidasas),[48] que a su vez inhibe la enzima aldehído deshidrogenasa. Este último paso de inhibición sucede por la reacción del HNO generado, con el residuo tiolato de la cisteína en el sitio activo de la ADH, y fue por lo tanto una de las primeras evidencias que indican una alta reactividad de ^{1}HNO con tiolatos (RS^-).[49,50] Luego fueron reportados otros ejemplos de HNO reaccionando con tiolatos, por ejemplo con proteasa de cisteína, donde inhibe la funcionalidad de la catepsina B.[48–50] Otra característica biológica clave del HNO, es su alta reactividad con las hemoproteínas, férricas y ferrosas, que serán discutidas en la sección 2.1. También es capaz de reaccionar con otras metaloproteinasas tales como la CuZnSOD y MnSOD.[51]

Desde el punto de vista fisiológico, se sabe que el HNO causa una respuesta de relajación vascular como se muestra en varios estudios. Dadores de nitroxilo tales como la sal de Angeli (SA, ver sección 1.5.1, página 27) y cianamida actuan de una manera similar a la de NO.[33,52] Sin embargo, si bien la azanona comparte con el oxido nítrico propiedades vasodilatadoras, la aplicación de SA en ensayos *in-vivo* mostró efectos fisiológicos que no pudieron ser reproducidos con dadores de NO: (1) aumento de la contractilidad muscular, (2) aceleración de la relajación ventricular y (3) disminución en la carga cardíaca. Los dadores de HNO causan un aumento en la contractilidad del músculo cardíaco a través de un efecto positivo combinado de la fuerza relacionada con la contracción muscular. Esto, junto con la relajación simultánea de los músculos cardíacos (efectos inotrópicos y lusitrópico, respectivamente), resulta en un aumento de la función cardíaca. Se han visto un número de estudios en los que se proponen varios modelos con el fin de explicar el mecanismo del efecto del nitroxilo en el sistema cardiovascular. Por ejemplo, el HNO se dirige a un residuo crítico de cisteína en el retículo/sarco endoplasmático Ca^2-ATPasa (cisteína 674 en SERCA2a).[34] También se ha demostrado, que modifica tioles críticos en la fosforilación de fosfolamban (PLN) y aumenta la actividad de la SERCA2a mediante la eliminación de una inhibición de la bomba de Ca^{2+}.[42]

Otra aplicación terapéutica en el sistema cardiovascular de HNO se debe a que puede ser un agente de acondicionamiento previo de gran alcance, que ayuda a aliviar las

consecuencias negativas de un evento isquémico y la consecuente lesión por reperfusión. Esta lesión se caracteriza por la privación del flujo sanguíneo seguida de necrosis y posible hipoxia del tejido cardíaco. Los estudios muestran que se logró una disminución dramática en el tamaño del infarto mediante el pre-tratamiento de los tejidos del corazón con sal de Angeli.[45] Sin embargo, se ha demostrado que al mismo tiempo la azanona aumenta el tamaño del infarto si se administra durante un evento isquémico. En este caso, el efecto farmacológico del NO es drásticamente diferente, puesto que tiene propiedades protectoras en las lesiones de reperfusión de isquemia cardiaca cuando se administra durante la fase de reperfusión.[45]

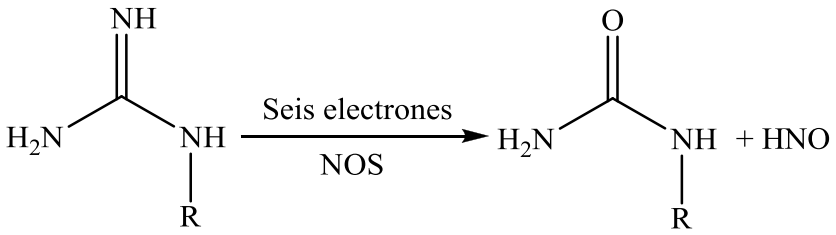
En resumen, hasta la actualidad, ***un importante número de evidencia ha*** sido recogida apuntando a los posibles ***efectos positivos del HNO en la prevención de la insuficiencia cardíaca***, actuando en los posibles objetivos a través de diversos mecanismos. Este es un fuerte incentivo para el desarrollo de nuevos dadores de azanona para aplicaciones farmacológicas.

Por último, los profármacos de HNO también pueden ser eficaces como agentes anticancerosos, ya que el nitroxilo dificulta irreversiblemente la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) - una enzima crítica en la glucólisis, que la mayoría de los tumores sólidos utilizan como su fuente de energía. Además, los estudios muestran que las células de cáncer de mama se ven afectados por la presencia de sal de Angeli a través de su interacción con el inhibidor de poli (ADPRibose) polimerasa (PARP). La función de la PARP se considera crítica en el proceso de reparación del ADN, y por lo tanto la capacidad para inhibir la PARP puede potencialmente proporcionar un enfoque eficaz para la interrupción de la reproducción celular del cáncer.[44] En resumen, los agentes de liberación de HNO tienen perspectivas interesantes como potenciales compuestos terapéuticos. Sin embargo, se necesita más trabajo para comprender los mecanismos químicos que subyacen a los efectos fisiológicos observados.

1.3 Producción in-vivo de HNO

Una cuestión clave relacionada con HNO y su función biológica, se refiere a la posibilidad de su formación endógena *in vivo*. Los estudios hasta este momento son contradictorios y sigue sin aparecer una respuesta definitiva. Existen en la actualidad diversas propuestas mecanísticas:

a) La vía más aceptada para la producción *in vivo* de HNO resulta de la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa (NOS) en condiciones particulares de su cofactor.[43,53,54] En la reacción propuesta (3), el sustrato arginina se reduce por seis electrones para producir HNO:

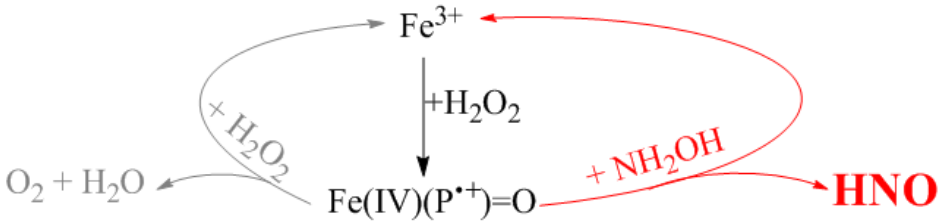


(3)

En los estudios correspondientes y sobre la base de la detección de N_2O y NH_2OH, los autores sugirieron que el producto de la acción enzimática de la NOS en ausencia del cofactor biopterina, debe ser HNO y no NO.[53,55] La evidencia adicional para la generación de HNO endógena incluye la detección de Fe(II)-NO en la NOS, en lugar del estado de oxidación férrico habitual.[53,56] Muy recientemente, Marletta y colaboradores argumentaron que en el último paso de la producción de NO por la NOS, un radical centrado en biopterina oxida el $\{FeNO\}^7$ a una especie $\{FeNO\}^6$, y luego se libera NO del hierro férrico. Sin embargo, queda por demostrar, y parece poco probable que el intermediario $\{FeNO\}^7$ pueda liberar realmente $^3NO^-$ o ^1HNO.[57,58] Ver sección 2.1, página 23, para la nomenclatura usada en la descripción de los complejos nitrosilados. A pesar de estos y otros resultados que se han presentado como evidencia de la presencia de HNO como intermediario en el metabolismo de la NOS, el mecanismo de producción no se ha establecido de manera concluyente y los resultados permanecen abiertos a la interpretación.

b) Otra fuente de HNO endógena se basa en la oxidación de la hidroxilamina (HA), u otro aminoalcohol, tales como la hidroxiurea o N-hidroxi arginina. *In vivo* se postula como un proceso que depende de la actividad de diversas hemoproteínas, que son capaces de estabilizar las especies oxo-ferrilo, como peroxidasas.[51,59,60] Recientemente, Donzelli et. al. evaluó la producción de ^1HNO por este mecanismo con un nuevo ensayo selectivo.[61] En la presencia de glutatión reducido (GSH) el producto de reacción, $GS(O)NH_2$, se cuantifica por HPLC. Sus resultados mostraron que metahemoglobina, peroxidasa de rábano picante y mieloperoxidasa son productores eficientes de nitroxilo, utilizando hidroxilamina como sustrato. Otras peroxidasas y catalasas son capaces de oxidar *in vitro* sustratos que contienen N con estados de oxidación de nitrógeno menores, tales como hidroxilamina,

hidroxiurea, ácido hidroxámico, azida y cianamida, con la producción concomitante de HNO tal como fue revisado recientemente por King *et. al*.[48] Sin embargo, hay varias preguntas sin resolver relativas al mecanismo propuesto (que se describe a continuación en la reacción 4).



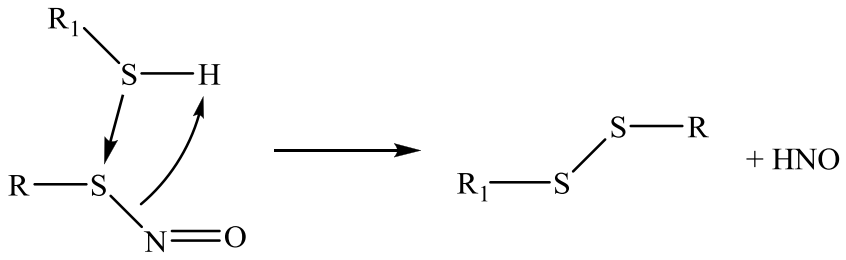
(4)

Por ejemplo, un punto de debate se refiere a si la molécula HNO generada puede escapar del bolsillo hemo-férrico, lo que parece poco probable dada la reactividad del HNO hacia dicho grupo hemo. También es importante dilucidar la manera en la que la proteína es conducida a la formación de las especies oxo-ferril *in vivo*, que *in vitro* se realiza mediante la adición de H_2O_2.[62,63]

c) Otra posible fuente endógena de azanona se deriva de la reducción de NO a HNO por superóxido dismutasa de Mn o Fe [62,64] o por xantina oxidasa (XO)[65]. Aunque ambos tipos de enzimas se han reportado como capaces de producir HNO, en todos los casos se utilizaron métodos indirectos para la detección de HNO, que a veces son difíciles de interpretar o poco fiables.

d) Recientemente, Nesse y colaboradores, estudiaron el mecanismo de reacción de la reducción por seis electrones de nitrito a amoníaco, por la citocromo c nitrito reductasa en bacterias. Si bien el producto final es NH_3, se forman diversos complejos intermediarios los cuales contienen NO e hidroxilamina, entre otros. Se propone que la reducción de nitrito comienza con una ruptura heterolítica del enlace NO, lo cual es facilitado por una interacción de retrodonación pronunciada del nitrito coordinado, desde el nitrógeno al sitio de union de hierro reducido (Fe(II)), pero no al oxidado (Fe(III)). Este paso lleva a la formación de una molécula de agua y una especie $\{FeNO\}^6$, la cual posteriormente (debido a dos reducciones rápidas de un electrón), conduce a una especie $\{FeNO\}^8$ y, por protonación, a un aducto Fe(II)-HNO.

e) Finalmente, hay al menos una ruta propuesta no enzimática para la producción de HNO endógena, la descomposición de nitrosotioles (RSNOs) por otros tioles (por ejemplo, glutatión) según la reacción 5 que se muestra a continuación:



(5)

Aunque este mecanismo no se ha establecido para un proceso *in vivo*, estudios *in vitro* muestran que la reactividad de exceso de tiol con RSNOs conduce a la formación de disulfuro y HNO.[66]

Por último, pero no menos importante, hay que destacar que ***ninguno de los mecanismos*** descritos anteriormente ***han sido confirmados***, sobre todo debido a las dificultades con la detección inequívoca de HNO. En la actualidad, la formación de N_2O, NH_2OH o especies nitrosilo ferrosos se utilizan como evidencia indirecta de la producción HNO, pero es evidente que el desarrollo de métodos analíticos fiables para la detección cuantitativa del HNO es una gran demanda para el avance de la investigación biomédica en esta área.

En resumen, el HNO parece tener promisorias perspectivas en cuanto a su rol biológico. Tres potenciales áreas están surgiendo como aplicaciones biomédicas para la liberación de moléculas de HNO como agentes terapéuticos: la terapia cardiovascular, la terapia preventiva de lesiones-reperfusión, y el tratamiento contra el cáncer. Por otro lado, la producción endógena *in vivo* de HNO todavía permanece como una hipótesis interesante que necesita ser probada.

1.4 Reacciones de HNO con moléculas pequeñas biológicamente relevantes

1.4.1 Dimerización

HNO dimeriza con una constante de velocidad de segundo orden de aproximadamente 1×10^7 $M^{-1}s^{-1}$ para producir ácido hiponitroso que finalmente se descompone para producir el óxido nitroso (Tabla 1, reacción 6).[13,67,68]

$$2\ HNO \rightarrow HONNOH \rightarrow N_2O + H_2O \qquad (6)$$

Entre pH 7,5 y 10,5, donde la especie $HN_2O_2^-$ es la mayoritaria (pK_a = 10,9), la velocidad de descomposición exhibe un plateau con $k_{(25°C)}$ = 5.0 x 10^{-4} s^{-1} ($t_{1/2}$ 23 minutos).[69] Fuera de este rango de pH la velocidad de descomposición es aún más lenta, llegando hasta valores de alrededor de 10^{-6} s^{-1}. Por debajo de pH = 5, y en ausencia de atrapantes de radicales, el ácido hiponitroso puede descomponer por un mecanismo radicalario produciendo N_2 y NO_3^-.[70] Por esta razón, tiene que tenerse en cuenta que por debajo de pH = 5 deben agregarse etanol u otros atrapantes de radicales a las mezclas de reacción para evitar las complicaciones derivadas de este mecanismo radicalario en cadena.

Tabla 1. Constantes de velocidad y potenciales de reducción para las reacciones de azanona, anión azanona y óxido nítrico con pequeñas moléculas biológicamente relevantes

#	Reacción	Cte velocidad[a]	Referencia
Fig. 3	$^1HNO + OH^- \rightarrow {}^3NO^- + H_2O$	4.9 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$	13
6	$^1HNO + {}^1HNO \rightarrow HONNOH$	8 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$	13
	$HONNOH \rightarrow N_2O + H_2O$	5.0 x 10^{-4} s^{-1}	69
9	$^1HNO + O_2 \rightarrow NO + HO_2$ (?)	3-8 x 10^3 $M^{-1}s^{-1}$	13,51,71
16	$^1HNO + NO^\bullet \rightarrow N_2O_2^{\bullet-} + H^+$	5.8 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$	72
Fig. 3	$^3NO^- + H_2O \rightarrow {}^1HNO + OH^-$	1.2 x 10^2 s^{-1}	13
7	$^3NO^- + {}^1HNO \rightarrow N_2O + OH^-$	6.6 x 10^9 $M^{-1}s^{-1}$	73
10	$^3NO^- + O_2 \rightarrow ONOO^-$	2.7 x 10^9 $M^{-1}s^{-1}$	13
15	$^3NO^- + NO^\bullet \rightarrow N_2O_2^{\bullet-}$	3.0 x 10^9 $M^{-1}s^{-1}$	72
11	$NO^\bullet + O_2^- \rightarrow ONOO^-$	4-7 x 10^9 $M^{-1}s^{-1}$	74,75
12	$2\ NO^\bullet + O_2 \rightarrow 2\ NO_2^\bullet$	2.54 x 10^6 $M^{-2}s^{-1}$	76

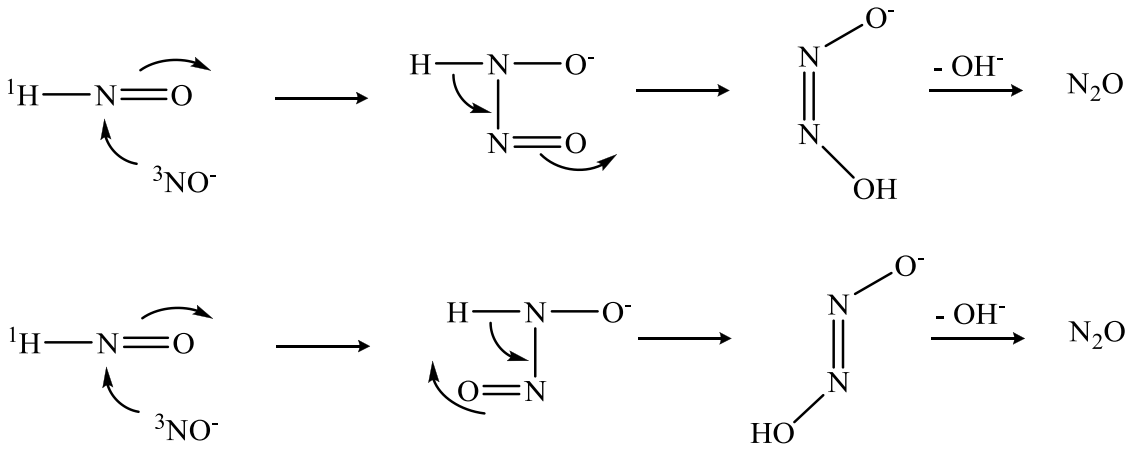
	Potencial vs NHE	Referencia
$NO + H^+ + e^- \rightarrow {}^1HNO$	E° ≈ - 0.14 V	77
$NO + e^- \rightarrow {}^3NO^-$	E° < - 0.8 V	78

[a] Las constantes de velocidad informadas son a temperatura ambiente y pH = 7

En cuanto al $^3NO^-$, aunque se ha sugerido que dimeriza con $k > 8 \times 10^6\ M^{-1}s^{-1}$,[40] no hay ninguna evidencia experimental para apoyar esta aseveración. Según Bonner y colaboradores, "Consideraciones de la barrera de Coulomb llevarían a esperar la inhibición de la reacción de dimerización con el aumento de la deprotonación de HNO".[79] Sin embargo, se ha reportado recientemente por Lymar y colaboradores que la reacción prohibida por spin de $^3NO^-$ y ^1HNO se lleva a cabo con una constante de velocidad de $6.6 \times 10^9\ M^{-1}s^{-1}$ (reacción 7).[73]

$$^3NO^- + {}^1HNO \rightarrow N_2O + OH^- \qquad (7)$$

Debe tenerse en cuenta que este resultado se basa en observaciones cinéticas indirectas. Por otro lado, es un hecho sorprendente, incluso para los autores, que una reacción prohibida por spin sea tan rápida; según Lymar esto podría ser debido a la gran fuerza impulsora para esta reacción (con un ΔG estimado de -80 kcal/mol). Aunque $^3NO^-$ es isoelectrónico con O_2, debido a su carga negativa se espera que sea más nucleofílico, así la reacción 7 podría pensarse como una adición nucleófilica del anión nitroxilo al átomo de N de ^1HNO para producir el intermediario $HONNO^-$ (después de la reorganización electrónica y un movimiento del H), que se descompone para producir N_2O (reacción 8). En principio, podría esperarse que $^1HN{=}O$ sufra este tipo de ataque nucleofílico en forma similar a los carbonilos ($R_2C{=}O$). Sin embargo, esta reacción es complicada por los diferentes estados de spin de la azanona. Posiblemente, se necesitan estudios teóricos adicionales para entender los detalles de la reacción. Por otro lado, y a diferencia de ^1HNO, el NO tiene poca tendencia a dimerizar a $(NO)_2$, con una constante de equilibrio pequeña $K=8{,}4\ 10^{-2}$ (120 K) y por lo tanto es bastante estable en solución.[80]



(8)

1.4.2 Reactividad frente a oxígeno, NO y tioles

Oxidación

La reacción de ^{1}HNO con O_2, la cual fue estudiada en fase gaseosa,[81] es lenta debido a sus diferentes estados de spin, k ≈ 10^3 $M^{-1}s^{-1}$ (ver Tabla 1). Sorprendentemente, el producto de la reacción sigue siendo desconocido, aunque se ha propuesto que la reacción procede a través de la ecuación 9, dando NO y una especie radicalaria de tipo hidroperoxido.[13]

$$^1HNO + O_2 \rightarrow NO^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \qquad (9)$$

Por otro lado, $^3NO^-$ reacciona con O_2 con una constante de segundo orden para dar peroxinitrito (eq. 10),[13]

$$^3NO^- + O_2 \rightarrow ONOO^- \qquad (10)$$

siendo isoelectrónica con la reacción de segundo orden 11.[40,74,75]

$$NO^{\bullet} + O_2^{-} \rightarrow ONOO^- \qquad (11)$$

Por el contrario, NO, reacciona con O_2 siguiendo una cinetica de tercer orden, y con una velocidad lenta. El mecanismo de esta reacción se muestra en forma simplificada en las reacciones 12-14.[76]

$$2\ NO^{\bullet} + O_2 \rightarrow\rightarrow\rightarrow 2\ NO_2^{\bullet} \qquad (12)$$

$$NO_2^{\bullet} + NO^{\bullet} \rightarrow N_2O_3 \qquad (13)$$

$$N_2O_3 + H_2O \rightarrow 2\ NO_2^- + 2\ H^+ \qquad (14)$$

En resumen, si bien el oxígeno es un atrapante relativamente lento de azanona, su alta concentración en sistemas biológicos, hacen de la oxidación una importante vía de consumo.

Reactividad frente a NO

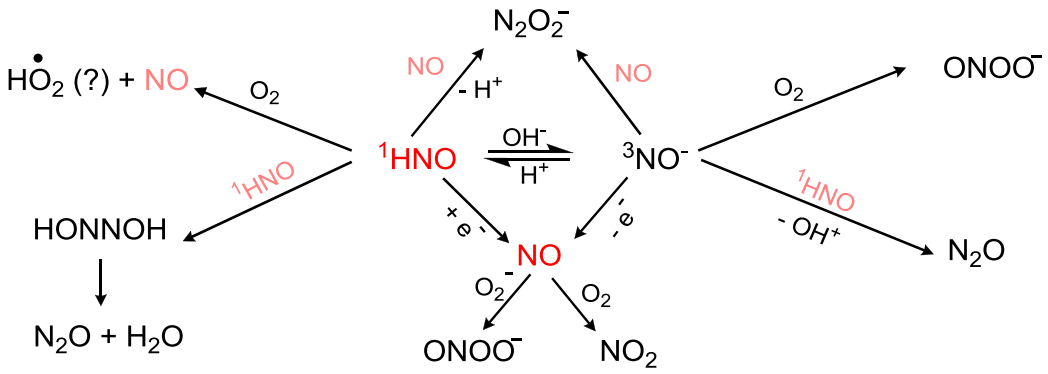
Ambos $^3NO^-$ y ^{1}HNO reaccionan con NO, con constantes de velocidad de segundo orden las cuales difieren en tres órdenes de magnitud siendo la mayor con $^3NO^-$ (Tabla 1, reacciones 15 y 16)[72]:

$$^3NO^- + NO^{\bullet} \rightarrow N_2O_2^{\bullet -} \qquad (15)$$

$$^1HNO + NO^{\bullet} \rightarrow N_2O_2^{\bullet -} + H^+ \qquad (16)$$

El radical $N_2O_2^{\bullet-}$ resultante reacciona rápidamente con otra molécula de $NO^{\bullet}$, produciendo el anión de capa cerrada $N_3O_3^-$, el cual decae a los productos finales N_2O + NO_2^- con una constante de velocidad de ca. 300 s^{-1}.

En el esquema 1 se muestra un resumen de las reacciones de NO y HNO/NO^- con moléculas pequeñas.



Esquema 1 - Reacciones de nitroxilo y óxido nítrico

Por todos estos posibles (y diversos) blancos, la disponibilidad y concentración de HNO en un medio dado estará directamente vinculada a las distintas moléculas presentes con las cuales puede reaccionar, consumiéndose.

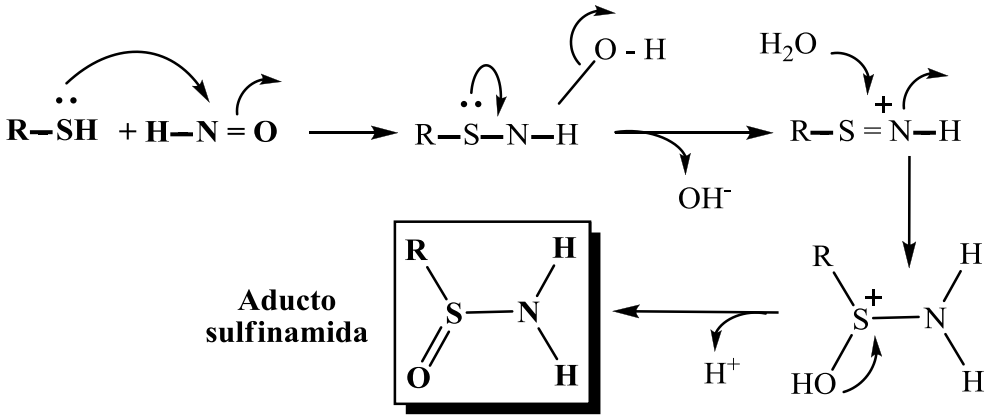
NO: ¿posible fuente de HNO?

El potencial estándar de reducción para la cupla NO/$^3NO^-$ es -0.8 V.[14] A pH fisiológico ^{1}HNO es la especie mayoritaria, y se puede estimar E^0(NO,H^+/^{1}HNO) ≈ -0,55 V a pH 7 (ambos valores vs. NHE).[13] Como consecuencia, está actualmente bajo discusión si NO podría reducirse a $^3NO^-$ o ^{1}HNO en sistemas de mamíferos, puesto que por un lado los potenciales de reducción antes mencionados (-0,8 y -0,55 V) están en el límite de los agentes biológicos de reducción, y otras especies que están presentes en concentraciones más altas, como O_2, son más favorables a reducirse (ver capitulo 8.2). Por el contrario, $^3NO^-$ debería funcionar como un agente reductor fuerte dando NO, mientras que ^{1}HNO generalmente actúa como un electrófilo.

Reactividad frente a Tioles

La alta reactividad de la azanona con tioles se conoce desde hace más de dos decadas.[51,82] Los estudios pioneros realizados por Doyle *et.al.* demostraron que el HNO

podría convertir tiofenol a disulfuro de fenilo, probablemente a través de un intermediario N-hidroxisulfenamida. Además Wong *et.al.*[83] sugirió que a niveles bajos de tiol la N-hidroxisulfenamida podría isomerizar a sulfinamida, ver esquema 2. Una reactividad similar también fue propuesta para otros tioles como el glutatión (GSH),[83] n-acetil-L-cisteína y ditiotreitol.[84] La obtención de un producto estable (sulfinamida) para la reacción de tioles con azanona, que es diferente de las especies habituales resultantes de su reacción aeróbica con óxido nítrico (nitrosotioles), motivó a Wink y colaboradores a utilizar esta reacción como un método selectivo para la detección de HNO.[61,84]



Esquema 2 - Captura y detección de HNO utilizando tiofenol

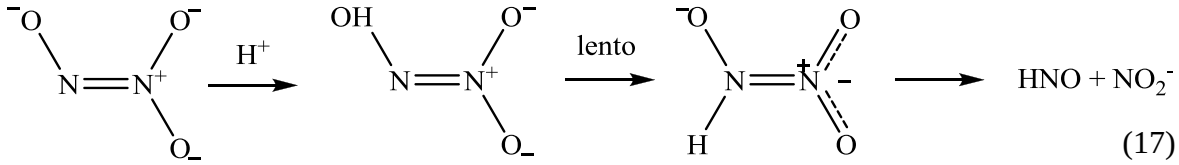
1.5 Dadores de HNO

^{1}HNO y $^{3}NO^{-}$ son, como se mostrara previamente, moléculas muy reactivas. Una de las principales reacciones es la de ^{1}HNO consigo mismo (i.e dimerización) para producir ácido hiponitroso ($H_2N_2O_2$) a velocidad alta (~10^{-7} $M^{-1}s^{-1}$), que se descompone en agua y N_2O. Por lo tanto, las soluciones de nitroxilo no son estables y el HNO, si no se produce continuamente, desaparece fácilmente. Además, el HNO no puede aislarse en estado sólido, y el $^{3}NO^{-}$ en solución es incluso más inestable siendo su reactividad aun bastante desconocida, aunque pudo aislarse como sal de sodio. Para superar estos problemas, y poder trabajar con ^{1}HNO (o $^{3}NO^{-}$) siempre se ha necesitado del uso de moléculas dadoras de azanona, es decir compuestos que bajo ciertas condiciones específicas liberan espontáneamente ^{1}HNO o $^{3}NO^{-}$.

En la última década se publicaron diversos trabajos donde se revisa el tema de la generación de ^{1}HNO o $^{3}NO^{-}$, específicamente, dos publicados en 2005 por Miranda *et.al.*,[40,85] incluyen una descripción profunda de la reactividad de los dadores.

1.5.1 Sal de Angeli

Históricamente, el primer método para la generación *in situ* de HNO fue descrito por Angeli en 1896, mediante la descomposición de $Na_2N_2O_3$. La sal de Angeli (SA) habitualmente se sigue utilizando para este propósito. El mecanismo aceptado para la descomposición espontánea para dar HNO y nitrito, implica la monoprotonation del anión de sal de Angeli entre pH 4 y 8, como se muestra a continuación (reacción 17):



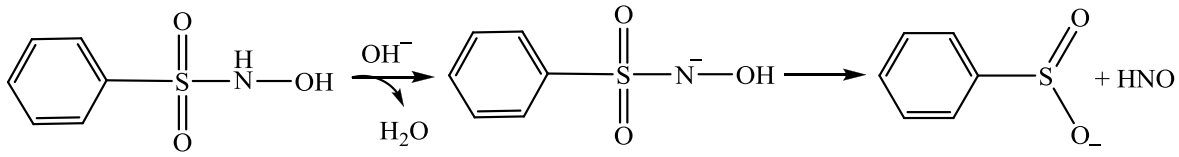
(17)

Es importante aclarar que en medios fuertemente ácidos, (es decir por debajo de pH 3), el producto de la descomposición de la sal de Angeli es NO (y no HNO). El mecanismo para este proceso no es sencillo y está aún bajo investigación.

La sal de Angeli se usa comúnmente como un dador confiable de HNO en medios casi neutros, con una constante de descomposición pH-dependiente y de primer orden. De pH 4 a 8 la constante de velocidad es prácticamente invariable, siendo 6,8 x 10^{-4} s^{-1} a 25 °C, equivalente a un $t_{1/2}$ de 17 minutos.[86,87]

1.5.2 Ácido de Piloty

El segundo método significativo es la generación de HNO con un compuesto orgánico, ácido de Piloty (AP), a través de una ruptura heterolítica en medio básico, según la reacción 18 que se muestra a continuación:



(18)

La reacción es espontánea, una vez que el grupo sulfohidroxamica es deprotonada, por lo tanto, AP producirá espontánea y continuamente HNO a partir de cierto pH, el cual se relaciona con el pKa correspondiente. Las constantes de velocidad para la descomposición del ácido de Piloty a pH 10 y sal de Angeli a pH 4-8 son comparables, y los valores de ambos caen en el rango de 10^{-3} -10^{-4} s^{-1} (a 25-35 °C). Similar a la SA en medio neutro y ligeramente ácido, el AP bajo condiciones básicas tiene tiempo de vida

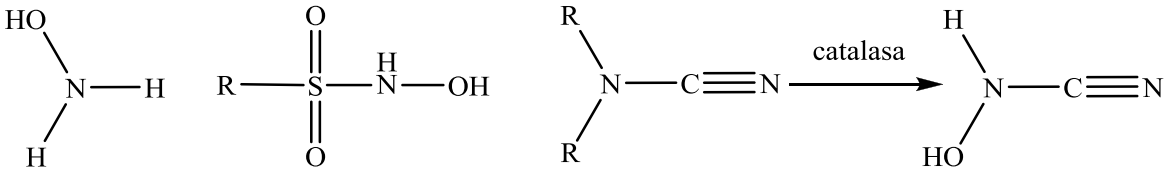
media del orden de minutos (27 min a 25 °C y 6 min a 35 °C).[88,89] Todos los derivados de AP muestran velocidades de descomposición similares, aun en los diferentes rangos de pH.

Ácido de Piloty y sal de Angeli, son aún ampliamente utilizados para la generación de HNO para estudios farmacológicos. De los dos, sal de Angeli tiene una ventaja comparativa de generación confiable de HNO bajo condiciones aeróbicas oxidativas y a pH neutro. Sin embargo, la estructura del anión sal de Angeli es rígido y no es susceptible a la derivatización. Por lo tanto, hay menos flexibilidad en la adaptación a la función de ´´delivery´´ de HNO para objetivos específicos. Por otra parte, la reciente y fácil preparación de varios derivados de AP que pueden liberar HNO confiablemente en condiciones fisiológicas (y a casi cualquier) de pH, hace que estos compuestos sean probablemente los dadores preferidos para ser utilizados en el futuro en esta área (más detalles en el Capitulo Resultados 8.1).

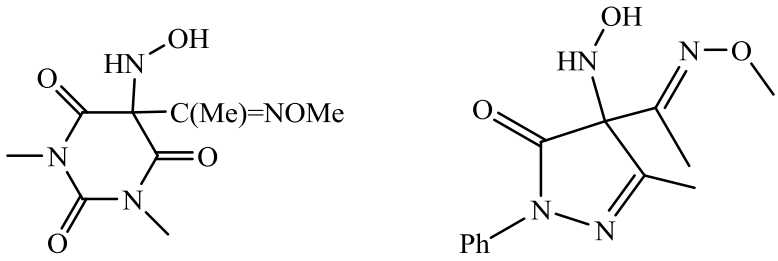
1.5.3 Otros dadores

Los compuestos del 1 al 9 han sido descritos como dadores de azanona y son capaces de liberar HNO bajo una variedad de condiciones diferentes. Como se muestra en el esquema 3, se pueden clasificar en tres grupos principales: hidroxilamina y sus derivados (es decir, compuestos de R-NHOH), NONOatos (i.e compuestos con una unidad N(O)=N(O)) y nitroso compuestos específicamente diseñados. Los mecanismos de producción de azanona, como se describirá brevemente más abajo, también son diversos, la cianamida (R_2NCN) por ejemplo, se considera en el grupo de hidroxilamina puesto que libera HNO en presencia de catalasas, después de la reacción con agua oxigenada, produciendo el derivado de la hidroxilamina HN(OH)CN, que es el dador real espontáneo de azanona. Los compuestos de tipo (2) se activan por deprotonación y como la hidroxilamina en sí misma desproporcionan para producir N_2, N_2O y NH_3. En estas reacciones, el HNO se postula como una especie intermediaria, que podría estar presente asociado a las enzimas del ciclo del nitrógeno. La azanona también puede obtenerse de otros derivados de la hidroxilamina como hidroxiurea, por oxidación con ácido peryódico.[90] También recientemente, Toscano y colaboradores desarrollaron el barbitúrico (4) y el derivado de la pirazolona (5).[91] Dos de ellos liberan HNO a pH fisiológico con tiempos de vida media de aprox. 1 a 10 minutos respectivamente, mientras que a pH = 4 son estables durante horas.

Hidroxilamina y derivados

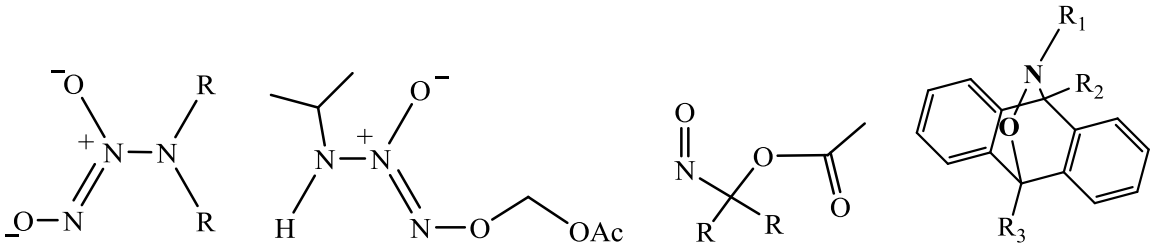


1 2 3



4 5

NONOatos **Nitroso Compuestos**



6 7 8 9

Esquema 3 - Dadores de azanona, agrupados en las tres categorías propuestas. 1-5)Hidroxilamina y sus derivados, 6,7)NONOatos y 8,9)Nitrosos compuestos y derivados.

Con respecto a NONOatos, el HNO generalmente se libera térmicamente o ajustando el pH en la zona ácida.[92] Por ejemplo, el IPA/NO NONOato (6, r = H y i-propil) se ha demostrado que puede liberar tanto NO como HNO y en una forma dependiente de pH, del mismo modo que la SA.[93] Más recientemente, se obtuvo un novedoso compuesto NONOato (7), a través de la reacción de IPA/NO con $BrCH_2OAc$.[94] Este compuesto es hidrolizado para generar HNO por dos mecanismos diferentes. En la presencia de esterasas, la disociación a acetato, formaldehído e IPA/NO se propone como ruta dominante, mientras que en la ausencia de la enzima, no se produce isopropilamina (IPA). El óxido nítrico no es observado como producto. Fue propuesto un mecanismo (Fig. 4A) en donde una abstracción del protón N-H inducida por base de (7) conduce a la migración en el grupo

acetilo desde el oxígeno al átomo de nitrógeno vecino, seguido por la ruptura al ion isopropanodiazoato y al conocido precursor de HNO: acil nitroso (5).

Los compuestos aciloxinitrosos, (8), liberan HNO por hidrólisis en una forma dependiente de pH (Fig. 4B).[95] Más recientemente, fueron sintetizados compuestos solubles en agua, y se observó que esterasas de hígado de cerdo catalizan su descomposición y favorecen la liberación de HNO.[96]

Finalmente, los compuestos de la fórmula general (9) actúan como dadores fotocontrolados de HNO vía reacciones de retro Diels-Alder, aunque también pueden liberar NO dependiendo del solvente (Fig. 4C).[97,98] Ha sido publicada recientemente una revisión centrada en estos compuestos.[99]

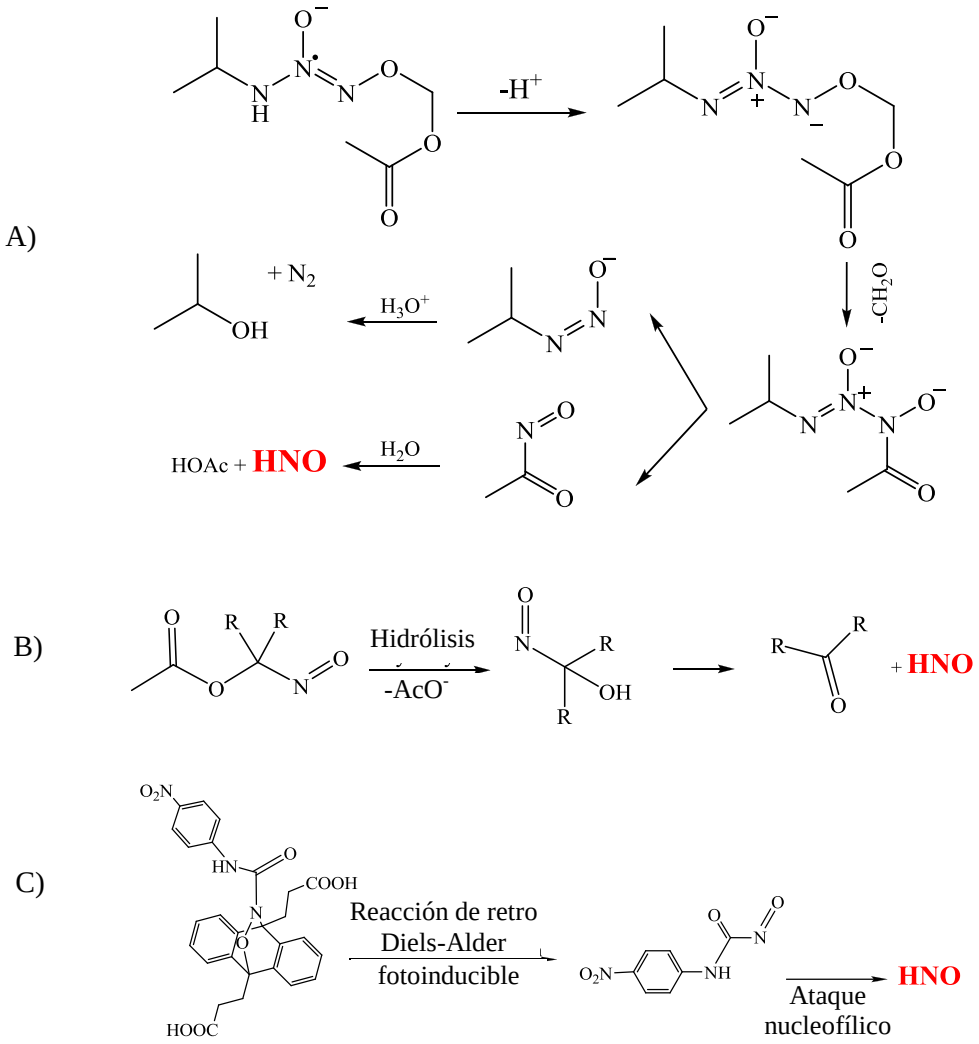


Figura 4 - A) Mecanismo propuesto de generación de HNO hidrolítica partiendo de (7).[94] B) Hidrólisis de compuestos aciloxinitrosos C) Dador fotocontrolable de HNO liberado a través de una reacción de retro Diels-Alder.

2. Reactividad de azanona frente a metaloporfirinas y hemoproteínas

2.1 Metaloporfirinas nitrosiladas de Mn, Fe y Co

Además de las pequeñas moléculas, que se describieron en la sección 1.4.3, los principales blancos en los sistemas biológicos del NO y HNO son los tioles[40,100] y las metaloproteínas, principalmente las hemoproteínas (HP).[101,102] En este contexto, mucho del conocimiento acerca de la reacción del óxido nítrico con las HP proviene del estudio de la reactividad con modelos hemo aislados, *i.e.*, metaloporfirinas, principalmente de hierro, pero también de manganeso, cobalto y rutenio.[103] Hay dos cuestiones relevantes acerca de los complejos nitrosilados de metaloporfirinas, la primera se refiere a sus velocidades de formación y disociación, la segunda está relacionada con la geometría del NO y su efecto sobre otros ligandos *trans*. Por lo general el oxido nítrico se une al metal a través del átomo de nitrógeno, y su carácter varía de NO^+ a NO^-.[101,104] Una buena y útil descripción de la subestructura metal-NO se presentó originalmente por Enemark y Feltham en los años 70,[105–107] donde se describe al complejo nitrosilado como $\{MNO\}^n$, donde M es el centro metálico que corresponde, y el parámetro clave es el número n, que corresponde a la suma de los electrones d del metal más los electrones π^* del nitrosilo coordinado.

En consecuencia, por ejemplo los complejos $\{FeNO\}^6$ corresponden a nitrosilos férricos, mostrando un carácter NO^+, una geometría lineal Fe-NO y una frecuencia de estiramiento $\upsilon_{NO} \approx 1700 - 2100\ cm^{-1}$. Por otro lado, los complejos $\{FeNO\}^7$ son nitrosilos ferrosos con carácter $NO^\bullet$, una geometría Fe-NO angular y $\upsilon_{NO} \approx 1400 - 1700\ cm^{-1}$, como se observa en varias estructuras cristalinas de los complejos de nitrosilo con metaloporfirinas.[108] Además de los complejos antes mencionados, las porfirinas de hierro pueden producir también especies $\{FeNO\}^8$, que tienen carácter NO^- (nitroxilo).[109] En cuanto a su estabilidad, los complejos $\{FeNO\}^7$ son, por mucho, los más estables, con $K_d \approx 10^{-14}$ debido a la rápida asociación de NO a las porfirinas de Fe(II) (ca. $10^9\ M^{-1}s^{-1}$) y la muy lenta disociación.[110] Por otra parte las especies $\{FeNO\}^6$ muestran las velocidades de reacción más bajas (aproximadamente $10^6\ M^{-1}s^{-1}$), y los valores más altos para la disociación del NO (entre 1-500 s^{-1}).[110] Un punto muy importante de los complejos $\{FeNO\}^6$, es su reactividad hacia los nucleófilos, por lo general HO^- y nitrito, que resulta en la reducción del centro metálico de la porfirina y la oxidación de NO a NO_2 en un proceso llamado nitrosilación reductiva. El resultado neto de la reacción de nitrosilación reductiva es la formación de especies $\{FeNO\}^7$, cuando el exceso de NO reacciona con

porfirinas férricas.[111,112] Para una reciente revisión de las reacciones anteriormente descritas ver el trabajo de Ford y colaboradores.[101]

Las porfirinas de manganeso también forman complejos nitrosilados. El NO reacciona rapidamente (ca 10^6 $M^{-1}s^{-1}$) con porfirinas de Mn(II) dando complejos estables $\{MnNO\}^6$,[113] que muestran una geometría lineal Mn-NO.[114] Curiosamente, no se observa nitrosilación reductiva para la reacción de Mn(III) con NO.[113] Las porfirinas de cobalto también forman complejos estables de nitrosilo, siendo las especies $\{CoNO\}^8$ obtenidas por reacción del NO con porfirinas de Co(II) investigadas como modelos isoelectrónicos de hemo oxigenasas.[115] Los complejos $\{CoNO\}^8$ son muy estables, con altas velocidades de asociación de NO y bajas velocidades de disociación (ca. 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ y ca. $10^{-4}s^{-1}$, respectivamente).[110,116] Por otra parte, los complejos $\{CoNO\}^7$ son menos estables, con velocidades de asociación significativamente menores.[116]

Un aspecto interesante, en relación a los complejos nitrosilados de hierro y su vinculación con la química del HNO/NO^-, se refiere al mecanismo de reacción de la óxido nítrico reductasa (NOR), el cual fue revisado recientemente por Karlin.[117] Se propone que la reacción de la NOR se produce por la unión de dos moléculas de NO a dos hemos ferrosos posicionados muy cerca, lo que conduce a un acoplamiento N-N y la formación de $N_2O_2^{2-}$ (es decir, la dimerización de NO^-), que finalmente genera N_2O, H_2O y dos hemos férricos.[118,119] Collman *et. al.* lograron sintetizar un modelo inorgánico funcional de la NOR, que contiene un centro porfirinico de hierro y un tri/tetra hierro no hemico coordinado con ligandos imidazol y/o piridina, el cual puede reaccionar con dos equivalentes de NO para producir N_2O en el estado completamente reducido.[120,121] Un análisis de los posibles intermediarios por espectroscopias EPR, Raman e IR sugiere la existencia de dos intermediarios nitrosilados diferentes, asignados a especies mono y dinitrosilos.[120] Por lo tanto, la reacción de la NOR, puede ser interpretada como la dimerización de HNO/NO^- mediada por coordinación, dependiendo del ligando, la protonación y las etapas de formación de los enlaces N-N.

En resumen, se han obtenido y caracterizado cinéticamente varios complejos nitrosilados de metaloporfirinas. En el caso de centros metálicos como Fe, Mn y Co, los complejos nitrosilados pueden obtenerse por reacción de las correspondientes porfirinas M(III) con HNO, como se describe en las siguientes secciones.

2.2 Reactividad de HNO y NO frente a porfirinas de Fe, Mn y Co.

Las primeras reacciones estudiadas de azanona con porfirinas de Fe, no fueron con porfirinas aisladas, sino directamente con la mioglobina, el punto de referencia de las hemo proteínas. Los primeros experimentos con porfirinas aisladas implicaron la reacción de los dadores habituales, descritos en la seccion 1.5, tales como trioxodinitrato (Sal de Angeli, SA) y ácido toluensulfohidroxamico (un derivado del ácido Piloty's, TSHA), con varias porfirinas modelo. Se incluyeron las porfirinas solubles en agua meso tetraquis (4-sulfonatofenil) porfirinato $[Fe(III)TSPP]^{3-}$, meso-tetraquis-N-etil-2-il piridinio porfirinato $[Fe(III)TEPyP]^{5+}$, así como el modelo de hemo-proteína pentacoordinado microperoxidasa-11 (Fe(III)MP11) y la porfirina meso-tetrafenilo (Fe(III)TPP) que es soluble en medios orgánicos.[122-124]

Como era de esperar, para todas las porfirinas se obtuvieron los correspondientes complejos $\{FeNO\}^7$, de acuerdo con la reacción general 19.

$$^1HNO + Fe(III)Por \rightarrow Fe(II)PorNO + H^+ \qquad (19)$$

Aunque las hemoproteínas ferrosas forman aductos estables Fe(II)(Prot)HNO, las porfirinas aisladas como FeTSPP o FeTPP no lo hacen, lo que sugiere claramente que sin la protección proporcionada por la matriz proteica el aducto Fe(II)(Prot)HNO (o NO^-) es inestable. Recientemente, gracias a la presencia de sustituyentes fuertemente aceptores de electrones presentes en el anillo de la porfirina, se obtuvo la primer porfirina estable $\{FeNO\}^8$.

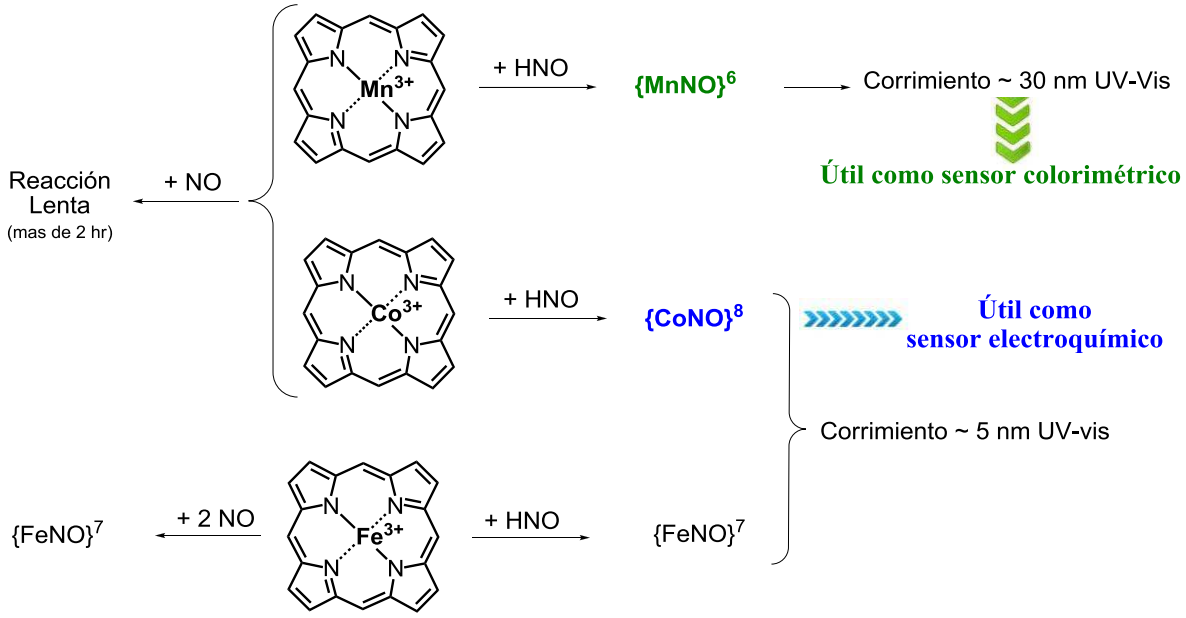
Además de la reactividad de nitroxilo con porfirinas de hierro, otras metaloporfirinas, con Co o Mn como centro metálico, también son capaces de reaccionar con HNO lo que da lugar a interesantes aplicaciones. Cuando soluciones acuosas de SA (a pH = 7) o TSHA (a pH = 10) se agregan a $[Mn(III)TEPyP]^{5+}$ bajo atmósfera inerte, se observa la conversión total de la misma a $[Mn(III)TEPyP\text{-}NO]^{4+}$. Curiosamente, y en oposición a lo que se observa para las porfirinas de Fe(III), hay un corrimiento de la banda de Soret significativo hacia el azul (más de 30 nm), proporcionando una herramienta sensible para la detección y cuantificación de HNO, como se discutirá en la sección 3. Se observan cambios espectrales similares para las reacciones de los dadores de HNO y otras porfirinas de Mn.

Sin embargo, ni $[Mn(III)TEPyP]^{5+}$ ni $[Mn(III)TPPS]^{3-}$ reaccionan con NO(g) o sus dadores (tales como SNAP) en condiciones similares, lo que significa por un lado que la constante de equilibrio para la formación del producto Mn(III) nitrosilado no es favorable,

y por otra parte que estas porfirinas de Mn(III) no sufren nitrosilación reductiva para producir tan fácilmente el complejo Mn(II)NO como es el caso de las correspondientes porfirinas de Fe(III). Por lo tanto, las porfirinas Mn(III) muestran reactividad selectiva hacia HNO, mientras que las de Mn (II) son selectivas para NO (Esquema 4).[122,123]

En cuanto a las porfirinas de cobalto, la reacción de NO (g) con Co(II)P produce Co (III)(Por)NO^{-} en unos pocos minutos.[125] En un tiempo similar, no se observan cambios espectrales para Co(II) en presencia de TSHA. Por otro lado, el agregado de 1,8-diazabiciclo (5.4.0) undec-7-eno (DBU, una base organica) a una mezcla de Co(III)P/ TSHA acelera la descomposición del dador por deprotonation, produciendo lentamente Co (III)PNO^{-}.[126] Los cambios espectrales UV-Vis son bastante pequeños, de manera similar a lo que ocurre con las reacciones correspondientes a las porfirinas de hierro. En un tiempo similar, no hay reacción entre Co(III)P en presencia de NO (g) o cualquier otro dador de NO.[126] Los resultados, de manera similar a lo que se observa para las porfirinas de Mn, muestran claramente que Co(II)P reacciona con NO, y no con nitroxilo, mientras que Co(III)P reacciona selectivamente con HNO, y no con óxido nítrico.[126]

En resumen, mientras que las porfirinas de hierro no pueden discriminar NO de HNO debido a la reacción de nitrosilación reductiva, tanto las porfirinas de Mn como Co tienden a diferenciarlos: las porfirinas en estado de oxidación (II) reaccionan rápidamente con NO, pero no con HNO, mientras que en estado de oxidación (III) reaccionan rápidamente con HNO pero no con NO. Por otro lado, las porfirinas de Mn muestran un cambio importante en el espectro UV-Vis (banda de Soret) al pasar de Mn(III) a $\{MnNO\}^{6}$, mientras que las porfirinas de Co y Fe no lo hacen (ver el Esquema 4) .



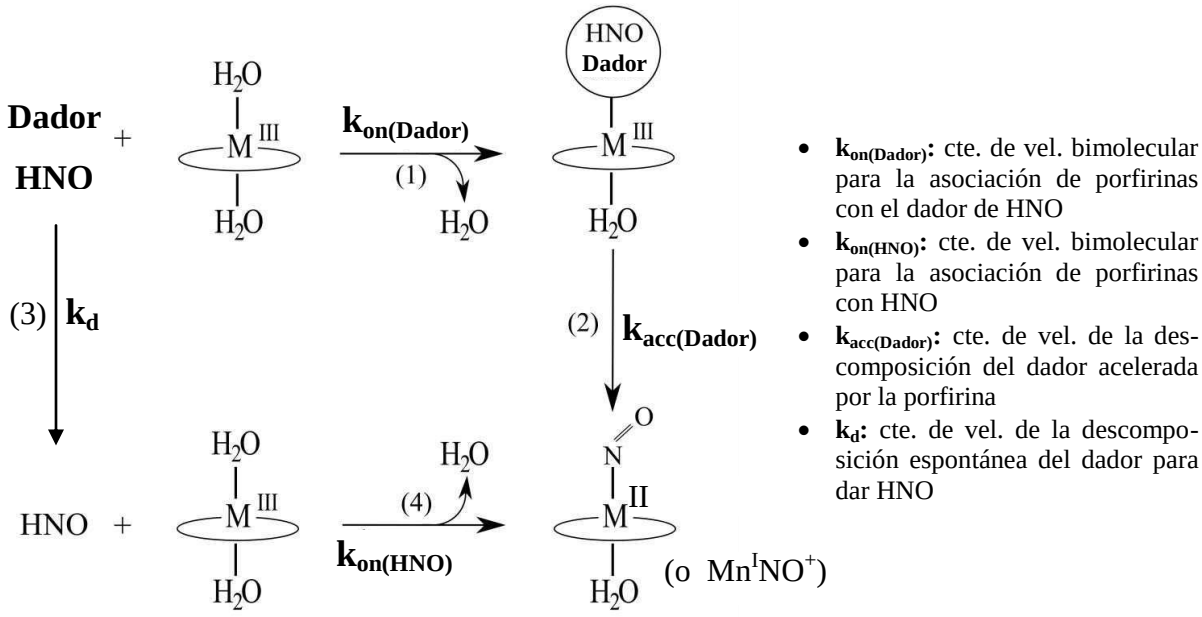
Esquema 4 - Reactividad de HNO y NO con porfirinas de Mn, Co y Fe. Corrimiento UV-Vis de las bandas de Soret para los correspondientes productos M(P)NO.[41,122,123,126]

2.3 Reactividad de dadores de HNO frente a metaloporfirinas y el efecto del oxígeno.

Como se mencionó, la suerte del nitroxilo en cualquier medio dado, ya sea *in vivo* o *in vitro*, dependerá de todas las velocidades de reacción involucradas. Las cinéticas de las reacciones de HNO con metaloporfirinas han sido estudiadas de manera similar a la de otros ligandos gaseosos pequeños (CO, NO, O_2), pero con la complejidad adicional de ser necesario el uso de los dadores. Los resultados muestran, que de manera similar al NO, la reacción de HNO con porfirinas de Fe(III) y Mn(III) ocurre con constantes de asociación bimolecular del orden de 10^5 $M^{-1}s^{-1}$.[127,128] Posiblemente, esto se debe a que son limitadas por la salida, en una primera etapa, del grupo aquo de la posición trans de las metaloporfirinas.

Mecanismo de reacción. En ciertos casos, se sugiere una interacción directa porfirina-dador debido a que la velocidad de formación efectiva de porfirina nitrosilada excede por mucho a la descomposición espontánea de los dadores (típicamente > 10 minutos).[129] La reacción es de primer orden en dador y estas porfirinas aceleran la descomposición de los mismos. Para las reacciones más lentas, se supone que el mecanismo operativo es la generación espontánea esperada de azanona y la posterior

reacción de HNO con la porfirina, ya que no muestran una relación lineal de velocidad vs [dador].[129] Ver Esquema 5.



Esquema 5 - Mecanismo de reacción entre metaloporfirinas y dadores de HNO.

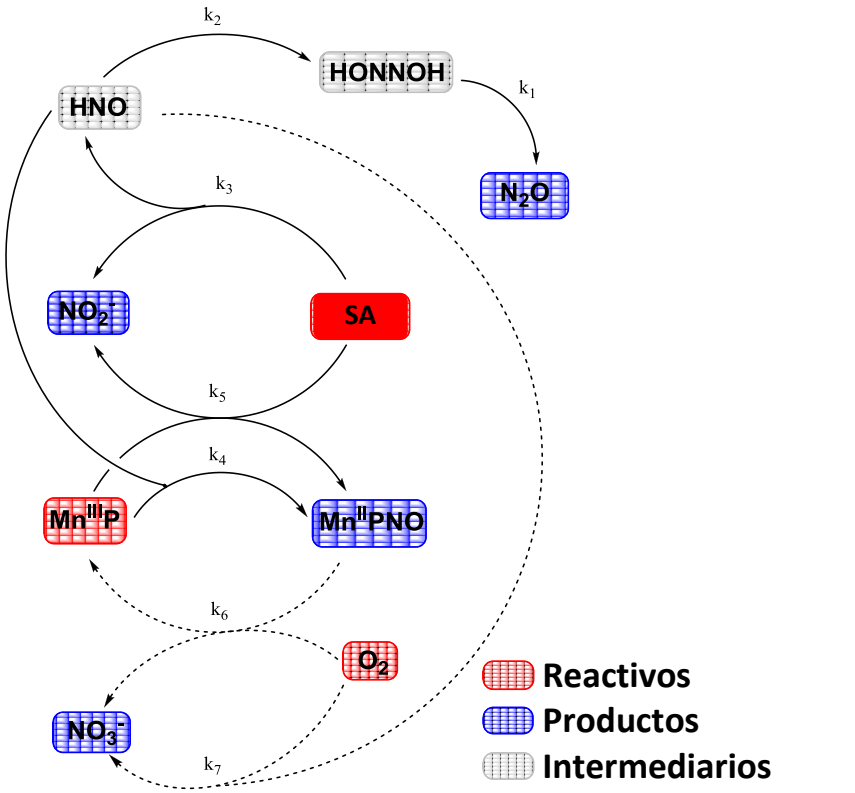
Estudios de DFT sugieren que el efecto acelerador puede entenderse en términos de una reacción redox, que resulta en una porfirina reducida y un dador oxidado, seguido de una rápida descomposición de NO y su posterior combinación para producir el complejo nitrosilado (M(P)NO), o por coordinación directa del dador al metal que promueve la ruptura del enlace X-NO.[130] En resumen, las metaloporfirinas con E < -100 mV[131] atrapan HNO, mientras que aquellas con E > -100 mV[131] reaccionan con el dador, mientras que las porfirinas con E ~ (0 a -100) mV[131] reaccionan por ambas vías.[129] El mecanismo general se presenta en el Esquema 5, y es escencial tomarlo en cuenta a la hora de trabajar con los disitintos dadores de HNO en presencia de metaloporfirinas.

Efecto del oxígeno

El escenario antes mencionado se hace aún más complejo en la presencia de oxígeno, debido a la reactividad del $^1HNO/^3NO^-$ y de los complejos M(Por)NO hacia O_2. Es interesante notar la diversa estabilidad de las nitrosilporfirinas frente al mismo, ya que mientras las Fe(II)P-NO parecieran ser inertes, las MnP-NO son oxidadas velozmente dando como resultado las correspondientes porfirinas de partida Mn(III)P y nitrato.[123]

Incluso para reacciones realizadas en medios estrictamente anaeróbicos, trazas de oxígeno pueden estar presentes ya que es extremadamente difícil de quitarlo del agua por debajo de 10^{-6} M. Estas reacciones dan lugar a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) como $ONOO^-$, NO, NO_2, HO_2, entre otros, que consumen HNO, reduciendo su concentración efectiva.[41]

Si el oxígeno está presente en una concentración alta en comparación con el dador, los principales productos de la reacción son nitrito y nitrato (Esquema 6). Por el contrario, cuando las concentraciones tanto de SA como de porfirina son al menos un orden de magnitud mayor que $[O_2]$, se forma el producto M(P)NO y permanece en solución (Esquema 6).



Línea de puntos: reacciones en prescencia de oxígeno

Esquema 6 - Reacciones implicadas en la reacción de metaloporfirinas con SA en ausencia y presencia de oxígeno, a pH 7.

3. Detección de HNO

En la última década han surgido varios métodos de detección/cuantificación directa de HNO (Figura 5).[41,132–136] Anteriormente, los mismos se basaban en pruebas indirectas mediante la detección de sus productos de reacción, tales como N_2O. Las estrategias para la detección directa son diversas: el uso de tioles como agentes de captura seguido por análisis de HPLC, [84,137–139] métodos espectroscópicos basados en la reacción de HNO con complejos metalicos,[122,124,134,140] fluorescencia,[135,136,141] o la reacción con fosfinas,[133] e incluso EPR[41,142] y espectrometría de masa.[132] Estas técnicas de detección han provocado el estudio de una serie de reacciones que involucran al HNO, bajo una variedad de circunstancias (incluyendo en células vivas) y con alta sensibilidad (hasta el nivel nM),

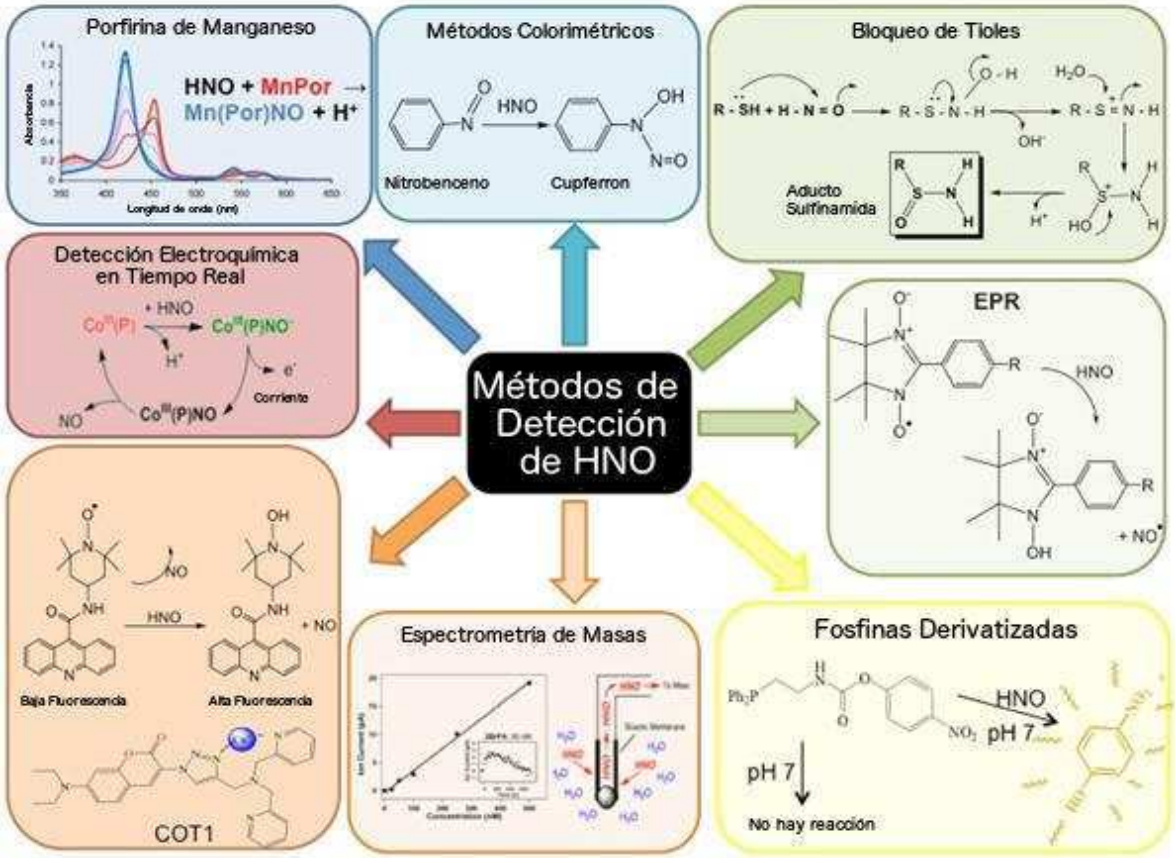


Figura 5 - Métodos de detección de HNO

3.1 Uso de atrapantes

Porfirinas

Las porfirinas de manganeso tienen buenas perspectivas para el desarrollo de un sensor de azanona. En primer lugar, las porfirinas de Mn(III) son selectivas para nitroxilo sobre

óxido nítrico. En segundo lugar, se observa un gran desplazamiento UV-Vis (ca. 30 nm) de la intensa banda de Soret del producto ($\varepsilon>1x10^5M^{-1}cm^{-1}$), cuando la porfirina Mn(III) se convierte en MnNO (es decir, el complejo nitrosilado); y tercero, la velocidad de reacción para el atrapado de HNO es rápido (ca. $1x10^5M^{-1}s^{-1}$) y por lo tanto capaz de competir con la dimerización. Sin embargo, hay también algunas desventajas o inconvenientes que deben tenerse en cuenta cuando se utilizan estas porfirinas para detectar y cuantificar HNO.

La primera se refiere a la estabilidad del complejo nitrosilado resultante, ya que reacciona con O_2 para producir de nuevo el compuesto de partida Mn(III), evitando así la acumulación del producto que debe ser detectado. Una manera de superar este inconveniente fue presentado por Dobmeier *et. al.*,[134] quien diseñó un método para la detección cuantitativa de nitroxilo con un rango dinámico estimado de 24 a 290 nM. El método se basa en un sensor óptico de film obtenido mediante la encapsulación de Mn (III)TPPS en una membrana de xerogel de aminoalcoxisilano, que es poco permeable al oxígeno. Estos films sensores de HNO fueron probados con los dadores SA y sodio1-(isopropilamino)diazene-1-io-1,2-diolato (IPA/NO), y proporcionan un método rápido para determinar las concentraciones de HNO en soluciones aeróbicas.[134] Sin embargo, la rápida dimerización de HNO y la velocidad relativamente lenta de la formación de complejos con HNO en la película xerogel, limitan el rendimiento del sensor para ambientes en donde el HNO es consumido en otras reacciones. Otra estrategia utilizada para evitar la oxidación del complejo nitrosilado, es proteger a la metaloporfirina con una matriz de proteína que disminuye la velocidad de oxidación.[140] Por esta razón, Bari y colaboradores han recombinado la Mn(III) protoporfirina IX en apomioglobina mostrando que conserva la selectividad deseada, pero la oxidación del complejo nitrosilado es significativamente menor.[140]

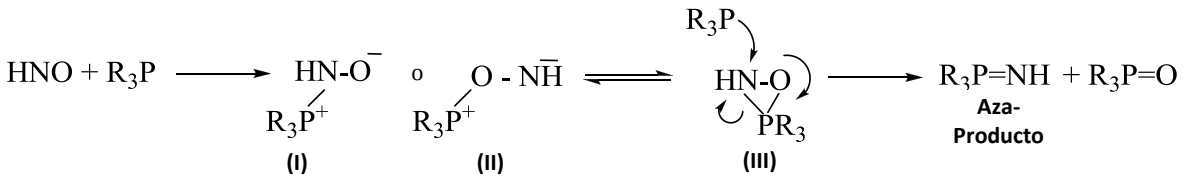
Tioles

La reacción de tioles con HNO da como producto sulfinamidas estables, la cual es diferente a la especie nitrosotiol, que resulta de la reacción aeróbica con NO. Por esto, Wink y colaboradores, utilizaron esta reacción como método selectivo para la identificación, detección y cuantificación de azanona.[61,84] Se demostró que una reacción equimolar de glutatión (GSH) con SA da como resultado la presencia de dos productos principales, nitrito y la sulfinamida del glutatión ($GS(O)NH_2$), identificada por HPLC.

Mientras que no se observa dicho producto al realizar la reacción con óxido nítrico. Sin embargo, aún queda trabajo por hacer, en lo relativo al límite de detección del método y las posibles especies que interfieren, como otras RNOS, además de NO. Por último, cabe señalar que el presente método no detecta HNO *in situ* ya que su presencia sólo se revela después del análisis posterior por HPLC.

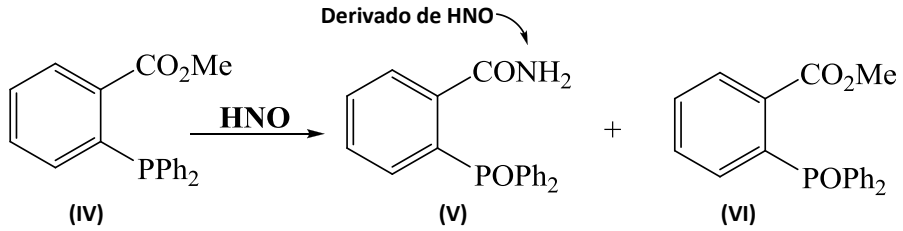
Fosfinas

Recientemente se ha desarrollado otro agente capaz de atrapar HNO, que se basa en la selectividad de fosfinas por la azanona, sobre otros óxidos de nitrógeno fisiológicamente relevantes. Se sugiere que la reacción de nitroxilo con nucleófilos de triarilfosfina genera en el primer paso cantidades equimolares de óxido de fosfina y el aza-iluro correspondiente (Esquema 7). En segundo lugar, en presencia de un éster electrófilo adecuadamente situado, el aza-iluro experimenta un rearreglo de Staudinger para dar una amida, desde donde deriva el HNO. Estos productos se diferencian de los productos de reacción conocidos de trifenilfosfina con óxido nítrico, que produce óxido de trifenilfosfina y óxido nitroso.[143,144]



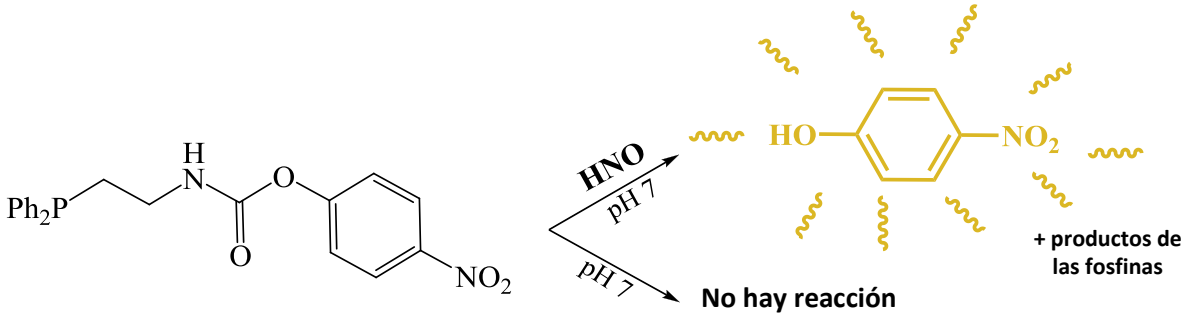
Esquema 7 – Mecanismo propuesto para la reacción de azanona con triarilfosfinas

En otro caso, la reacción de los metiléster derivados (IV, Esquema 8) con sal de Angeli da una mezcla 1:1 del óxido de fosfinbenzamida (V) y el óxido de la metiléster fosfina (VI). La reacción de IV con ^{15}N - I produce ^{15}N - V demostrando claramente que el átomo de nitrógeno de la amida se deriva de I y presumiblemente da HNO.[143,144]



Esquema 8 - Formación de óxido de fosfinbenzamida (f) y óxido de la metiléster fosfina (g) por reacción del éster metilico (e) con HNO.

En los últimos años, fue desarrollado un sistema biológicamente compatible de detección colorimétrica de azanona, utilizando una fosfina derivada de la biotina (Esquema 9). El sistema de detección se basa en el diseño de fosfinas, equipadas con carbamatos como grupos electrófilos para la reacción de atrapado, y la incorporación de fenolato y p-nitrofenolato como grupos salientes, que mejoran la electrofilicidad del grupo carbonilo. Como resultado de la liberación del nitrofenol, luego de la reaccion con HNO (Esquema 9), se obtiene un color amarillo brillante proporcionando la base para el método de detección colorimétrica. Los resultados muestran que en ausencia de dadores de azanona el agente de atrapado se hidroliza lentamente durante varios minutos produciendo una pequeña cantidad de las especies coloreadas. Sin embargo, la adición de SA produce inmediatamente una solución de color amarillo brillante con un fuerte incremento en la absorción a 400 nm indicando la liberación completa de p-nitrofenolato, a través de las reacciones propuestas. Aunque el método descrito proporciona un método colorimétrico rápido que indica cualitativamente la presencia de HNO (a nivel micromolar), las complicaciones que resultan de la reactividad del carbamato de p-nitrofenol (es decir, su hidrólisis espontánea) pueden limitar sus aplicaciones.[133]



Esquema 9 - Ensayo colorimétrico para la detección de HNO con fosfinas derivatizadas

3.2 Espectrometría de masa y resonancia paramagnética electrónica

Espectrometría de masa

Mediante el uso de espectrometría de masas utilizando una membrana selectiva (MIMS), Toscano y colaboradores fueron capaces de detectar HNO en solución.[132] Con diferentes dadores de NO y HNO, los autores siguieron en el tiempo la intensidad de los picos m/z = 30 y m/z = 44 (correspondientes a NO^+ y N_2O^+). Debido a que el espectro de masas de HNO presenta picos a m/z = 30 y 31 con intensidades relativas de 35: 1,[145] y que el espectro de N_2O también presenta cantidades significativas de la señal m/z = 30, la

asignación del origen de m/z = 30 tuvo que ser analizado utilizando diferentes agentes de captura (descriptos en 3.1). Utilizando la reactividad diferencial de HNO y NO con tioles y fosfinas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, los autores mostraron que a AS y AP no son dadores puros de HNO en condiciones fisiológicas, mientras que el derivado 2-bromo de AP es fundamentalmente un dador de HNO puro.

Si bien esta metodología tiene el potencial para detectar directamente HNO de la solución, en este momento solo permite detectarlo indirectamente mediante la cuantificación de los productos relativos (N_2O^+, debido a la dimerización y NO^+, debido a la ionización instrumental).

Resonancia paramagnética electrónica

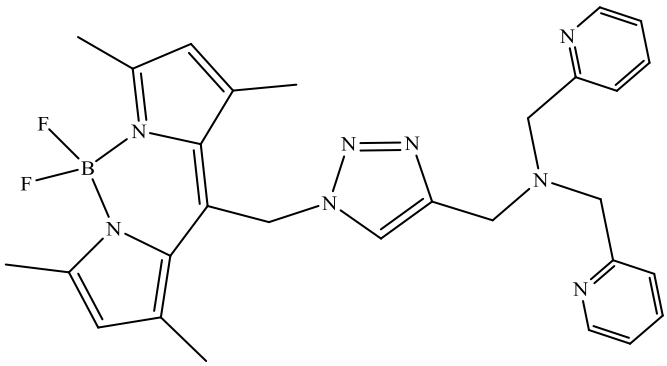
Recientemente, se han investigado a los nitronil nitróxidos 2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-l-oxilo-3-óxido (PTIO) y su análogo soluble en agua 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina -1-oxi-3-óxido (C-PTIO) como agentes para discriminar NO de HNO.[146,147] El óxido nítrico reacciona con los nitronil nitróxidos dando los iminonitróxidos correspondientes más NO_2. La reacción con HNO fue estudiada en soluciones acuosas aeróbicas a pH = 7 con SA como dador. A partir de estos experimentos, puede observarse que el HNO también reacciona con los nitronil nitróxidos dando como productos finales iminonitróxidos e iminohidroxilaminas, los cuales se detectan por EPR. El mecanismo de la reacción de HNO con PTIO y C-PTIO implica la participación de varias especies reactivas, incluyendo NO, NO_2, y cationes oxoamónicos.

Como la reacción de NO con nitronil nitróxidos produce sólo los correspondientes iminonitróxidos, los nitronil nitróxidos pueden discriminar NO de HNO, sólo cuando esta presentes en una concentración mucho más baja que la producción total de HNO. Aparte de esta cuestion, los nitronil nitróxidos no se han podido utilizar en experimentos *in vivo*, donde pueden surgir más complicaciones, como por ejemplo, la reducción competetitiva de tioles. Teniendo en cuenta el potencial de reducción de los nitronil nitróxidos, esta reacción sería termodinámicamente favorable.

3.3 Fluorescencia

Hasta ahora, la mayoría de las sondas fluorescentes para HNO se basan en el mismo principio: la coordinación de cobre(II) extingue la fluorescencia de la sonda (*estado apagado*), pero en presencia de HNO el cobre se reduce a cobre (I) que se traduce en la restauración de fluorescencia (*estado encendido*), siendo la intensidad de fluorescencia proporcional a la concentración HNO. La reducción de Cu(II) por HNO tiene un precedente: con SODCu(II) para generar NO y SODCu(I) reducida.

Lippard y colaboradores desarrollaron varios compuestos para la detección fluorescente de nitroxilo, basados en esta idea.[135,141] Por ejemplo, BOT1 (Esquema 10), posee un sitio de boro-dipirometeno (BODIPY), que tiene propiedades ópticas que se adaptan bien para los experimentos de formación de imágenes celulares y un entorno de coordinación. Este diseño reduce al mínimo la distancia entre fluoróforo y el sitio de unión de metal, asegurando con ello una fuerte inhibición de la fluorescencia de la sonda en el *estado apagado*.

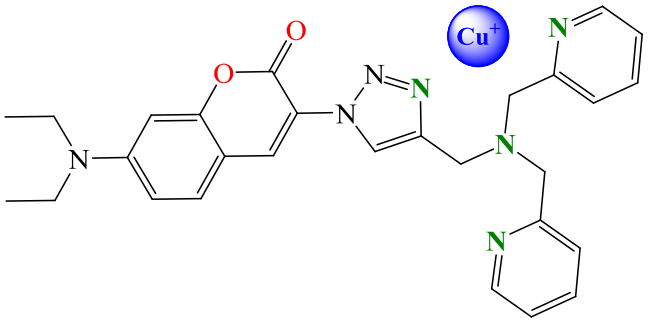


Esquema 10 - Estructura de BOT1

La adición de un exceso de 1000 veces de sal Angeli's a una solución de [CuII (BOT1)Cl]Cl (pH = 7,0) produce un incremento instantáneo de la fluorescencia de 10 veces; sin embargo, se observa un quenching progresivo con el tiempo. También ocurre una fuerte fluorescencia cuando se añaden sólo 100 equivalentes de SA; sin embargo, la adición de cantidades más bajas resultan en una débil respuesta, lo que sugiere que la sonda es adecuada para la detección de HNO en el intervalo de 0,5 a 5 mM, cuando el sensor está presente en niveles de concentración micromolar.

Otra sonda fluorescente basada en el uso de Cu para HNO ha sido construida por Yao y colaboradores,[136] siguiendo una estrategia similar a la anterior. La cumarina y sus

derivados son bien conocidos como reactivos de marcaje de fluorescencia por sus excelentes propiedades fotofísicas con alto rendimiento cuántico de fluorescencia y una eficiente permeabilidad celular. La sonda para nitroxilo incluye un cromóforo cumarina y un receptor dipicolilamina, unido a través de un puente de triazol (COT1, Esquema 11).[136]



Esquema 11 - Estructura del complejo de COT1 con cobre.

Los ensayos con Cu(II)COT1 (Esquema 11) muestran que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal con la concentración de SA hasta alcanzar un plateau a 20 mM, que corresponde a un aumento de 17,2 veces en instensidad de fluorescencia en comparación con la concentración blanco. Esto indica que la reducción completa de Cu(II)COT1 se produjo con 20 mM de SA, aclarando que el cambio en la intensidad de fluorescencia (en 499 nm) fue mucho mayor que la obtenida con los sensores reportados basados en BODIPY.

Por otro lado, tanto BOT1 como con COT1, muestran una respuesta mucho más débil con otras especies biológicamente relevantes ROS y RNS, incluyendo NO_3^-, ClO^-, H_2O_2, $ONOO^-$, $ROO^\bullet$, and NO_2^-. Con óxido nítrico, se observó un aumento de 3,2 veces en la intensidad de fluorescencia, y esta relativa falta de respuesta podría ser utilizada para discriminar entre NO y HNO.

Las sondas se utilizaron para la obtención de imágenes de fluorescencia de HNO en células vivas, usando células A375 de melanoma maligno humano. La incubación con la sonda sola mostró fluorescencia intracelular muy débil, mientras que un ensayo de citotoxicidad mostró 82,1% de viabilidad celular. Luego, las células tratadas se incubaron con SA, y se observa que la señal de fluorescencia producida por estas células aumenta con el tiempo; la intensidad máxima fue localizada en el espacio perinuclear, lo que sugiere que las especies de nitrógeno no alcanzan el núcleo.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

La porfirina cobalto(II)-5,10,15,20-tetraquis[3-(p-acetiltiopropoxi)fenil] (Co(P)) se adquirió en Frontier Scientific y se la utilizó como se recibió. $NaNO_2$, ferroceno, $N(Bu)_4PF_6$ y KNO_3 fueron comprados en Sigma-Aldrich. Los otros reactivos fueron de grado analítico y se usaron sin previa purificación. Metanol, etanol, diclorometano (CH_2Cl_2), y otros solventes orgánicos usados, fueron de grado HPLC. El agua utilizada fue grado Milli-Q, a su vez que el nitrógeno y argón fueron de alta pureza.

4. Síntesis

4.1 Óxido Nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) gaseoso fue generado por el agregado de 5 ml de agua desgasada sobre una mezcla sólida de $FeSO_4$ (8,5 g), $NaNO_2$ (8,5 gr) y NaBr (4 gr). El NO producido fue pasado por una columna de granallas de KOH para remover otros óxidos de nitrógeno, principalmente NO_2.

4.2 Sal de Angeli (SA)

La síntesis de este dador de HNO se realiza nitrando hidroxilamina según la siguiente reacción:

$$NH_2OH + CH_3NO_3 \longrightarrow N_2O_3^{2-} + CH_3OH + 2H^+ \quad (22)$$

Hidroxilamina Nitrato de metilo SA

Fue necesario preparar ambos reactivos, la hidroxilamina (2 gr, 0,03 moles) debe ser liberada del clorhidrato con metóxido de sodio (CH_3ONa, 4,5 gr, 0,09 moles) el mismo día, mientras que el metóxido fue preparado a partir de metanol y Na°.

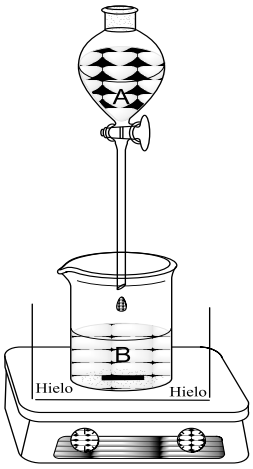
$$NH_2OH \bullet HCl + CH_3ONa \longrightarrow NH_2OH + CH_3OH + Na^+ + Cl^- \quad (23)$$

Por último, el CH_3NO_2 (30 ml, 0.5 moles) se prepara nitrando metanol

A. HNO_3/H_2SO_4 (c) 1:1
B. $MeOH/H_2SO_4$ (c) 3:1

Procedimiento experimental

Se coloca en una ampolla de decantación 240 ml de la mezcla A (120 ml de HNO_3 y 120 ml de H_2SO_4). Se agrega gota a gota sobre 80 ml de la mezcla B (60 ml de MeOH y 20 ml de H_2SO_4) en baño de hielo (la temperatura no debe superar los 40°C). Luego de agitar durante 15 minutos se forman 2 fases. Se traspasa a otra ampolla y se elimina la fase inferior. Luego se lava con una solución de NaCl, otra de NaOH y por último con agua destilada. Se seca con $CaCl_2$ y se filtra. El control de la temperatura es para evitar la formación de NO_2.



La hidroxilamina libre (1,2 gr, 0,035 moles), en 10 ml de metanol, se agrega gota a gota sobre una solución de nitrato de metilo (2,2 ml, 0,035 moles) en 10 ml de metanol bajo atmósfera de nitrógeno. Se realiza a baja temperatura para favorecer la precipitación de la Sal de Angeli. Se obtuvieron 4,06 gr (0,031 moles) del compuesto. El espectro UV-Vis (Figura 6) obtenido coincide con lo descripto en literatura,[148] y la pureza de la misma se calcula con el épsilon informado.[148]

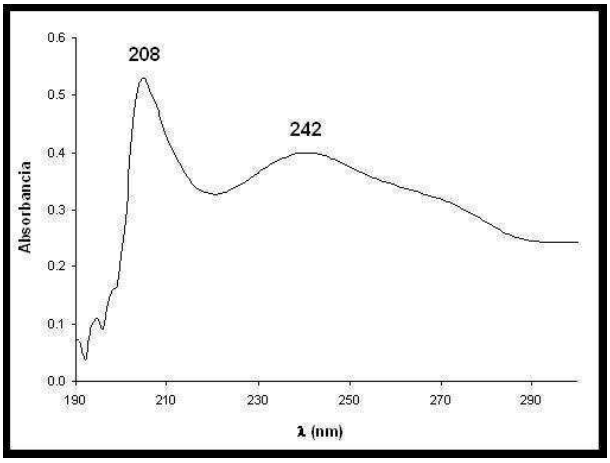
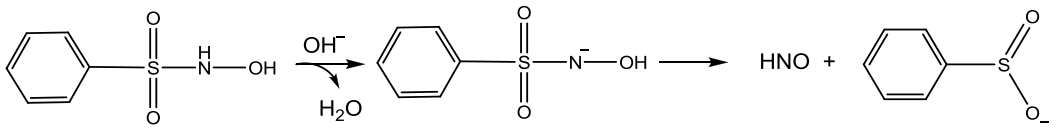


Figura 6 – Espectro UV de la Sal de Angeli sintetizada

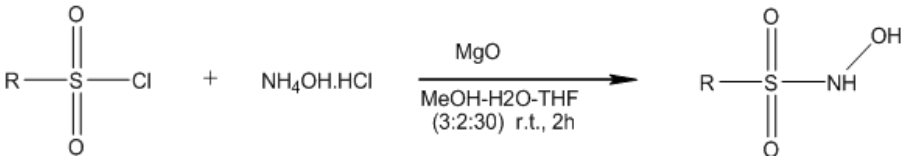
4.3 Nuevos dadores de HNO: derivados del ácido de Piloty (AP)

La preparación de AP fue reportada por primera vez en 1896.[149]



(24)

Se sintetizaron derivados del ácido de Piloty como se detalla a continuación, reacción 25.



(25)

	Bencensulfonamida	**Abreviación**	**R_1**	**R_2**	**R_3**
1	*N*-hidroxi-4-metil	Me – AP (or TSHA)	H	H	Me
2	*N*-hidroxi-4-nitro	NO_2 – AP	H	H	NO_2
3	*N*-hidroxi-4-fluoro	F – AP	H	H	F
4	*N*-Hidroxi-2,4,6-triisopropil	TriIso - AP	IsoP	IsoP	IsoP
5	*N*-hidroxi-4-metoxi	OMe – AP	H	H	OMe
6	N-hidroxi-2-nitro-4-trifluorometil	(NO_2-CF_3) – AP	H	NO_2	CF_3

Las síntesis fueron realizadas en conjunto con el Dr. Kiran Sirsalmath. N-hidroxi-4-metilbencensulfonamida (1),[150] N-hidroxi-4-nitrobencensulfonamida (2),[150] N-hidroxi-4-fluorobencensulfonamida (3),[151] N-hidroxi-2,4,6-triisopropilbencensulfonamida (4),[150] N-hidroxi-4-metoxibencensulfonamida (5),[151] y N-hidroxi-2-nitro-4-trifluorometil bencensulfonamida (6),[152] fueron sintetizados de acuerdo al procedimiento publicado por Porcheddu et al.[150] RMN y otros análisis relevantes se reportan solamente de los compuestos que estaban escasamente descriptos (5) o no habían sido descriptos con anterioridad (6).

N-hidroxi-4-metoxi bencensulfonamida (5). 69% rendimiento, pf: 160 °C (desc). ^{1}H RMN (MeOD 500 MHz) 7.7 (m, 2 H), 6.9 (m, 2 H), 3.85 (s, 3 H). ^{13}C RMN (MeOD 500 MHz) 129.4 (1C), 126.7 (2 C), 112.9 (2 C), 54 (1 C).

N-Hidroxi-2-nitro-4-trifluorometil bencensulfonamida (6). Este compuesto fue preparado de acuerdo al procedimiento de literatura,[150] pero la reacción fue acortada a 1-2 horas en orden de minimizar el producto de descomposición. El mismo fue aislado como un sólido blanco (rendimiento ca. 70%); pf: 212–213 °C (desc.). ^{1}H RMN (DMSO, ppm): 7.51 (br s, 2 H), 6.92 (s, 2 H), 4.53 (m, 2 H), 2.75 (m, 1 H), 1.13 (d, J = 6.9 Hz, 6 H), 1.07 (d, J = 6.8 Hz, 12 H). ^{13}C RMN (DMSO, ppm): 147.4, 146.9, 141.8, 121.5, 33.4, 28.2, 24.9, 23.9.

Todos los compuestos conocidos se caracterizaron por punto de fusión y RMN, tanto ^{1}H como ^{13}C, coincidiendo todos con lo reportado anteriormente.[150,151,153]

4.3 N-Nitrosomelatonina (NOmel)

Se sintetizó siguiendo el procedimiento descripto en literatura.[154,155] Se burbujea NO junto con oxígeno en relación 4:1 a una solución de melatonina disuelta en acetonitrilo. Cuando la misma se torna amarilla, se le agrega agua fría generandose un precipitado, el cual se deja durante 12 hs en el freezer, para luego obtener la NOmel por filtrado.

4.4 Porfirina nitrosilada de cobalto

El óxido nítrico reacciona directamente con la porfirina tetracoordinada $Co^{II}(P)$ a temperatura ambiente para producir el correspondiente complejo pentacoordinado $Co^{III}(P)NO^{-}$ en un 75% de rendimiento. $Co^{III}(P)NO^{-}$ fue preparado en condiciones anaeróbicas, por burbujeo de NO a 5 mg de $Co^{II}(P)$ disuelta en 3 ml de una solución desgasificada de CH_2Cl_2/MeOH 1:1. Durante la adición de NO gas (normalmente 10-20 minutos), el color de la mezcla de reacción cambia de púrpura a rojo-púrpura. La reacción se siguió por espectroscopía UV-visible hasta conversión total.

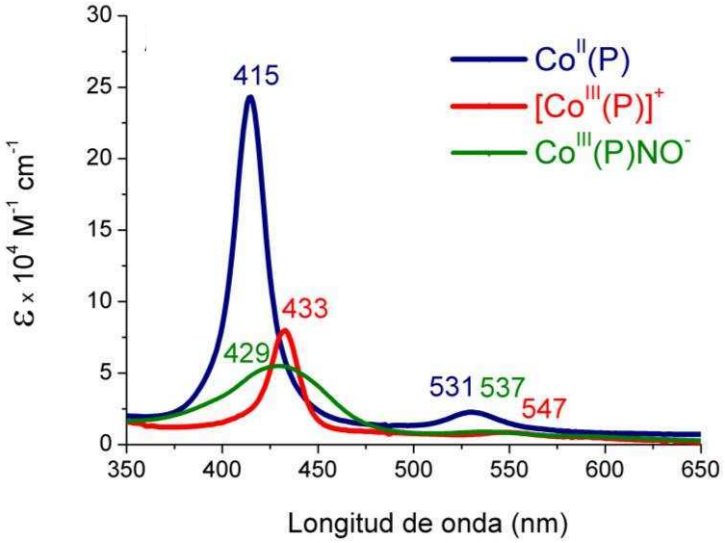


Figura 7 - Espectros UV-Vis de $Co^{II}(P)$ línea azul ($\varepsilon = 2.4\ 10^5\ M^{-1}\ cm^{-1}$, $\lambda_{max} = 415$ nm); $[Co^{III}(P)]^+$ línea roja ($\varepsilon = 8.0\ 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$, $\lambda_{max} = 433$ nm) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ línea verde ($\varepsilon = 4.9\ 10^4\ M^{-1}\ cm^{-1}$, $\lambda_{max} = 429$ nm) en CH_2Cl_2.

El disolvente se evaporó y el sólido se secó en vacío, el compuesto $Co^{III}(P)NO^{-}$ es de color púrpura en el estado sólido. Este compuesto se ha caracterizado por espectroscopía UV-Vis (Fig 7), IR (Fig 8) y microanálisis. Experimental (calculado): **C: 62.21%** (62.48%); **H: 4.90%** (4.92%); **N: 5.73%** (5.69%); **S: 10.51%** (10.42%).

El espectro IR del complejo nitrosilado muestra una fuerte banda en 1679 cm^{-1} (KBr), región asignable a ν_{NO} (Fig. 8). Este valor es similar al reportado previamente para (TPP)Co(NO) (1689 cm^{-1}, KBr)[115].

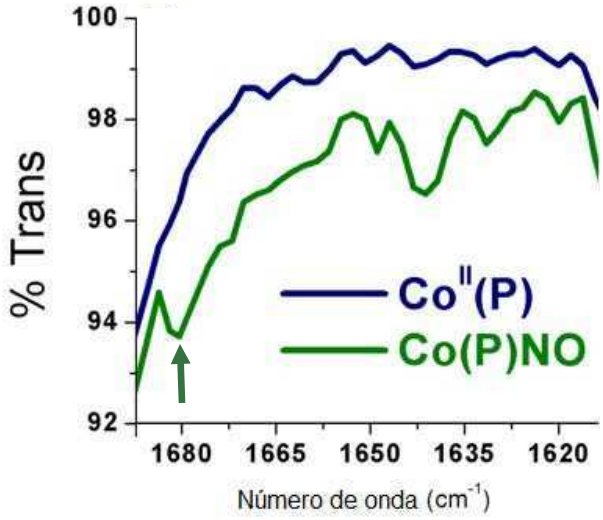


Figura 8 - Caracterización de $Co^{III}(P)NO^{-}$ por espectroscopía IR, usando una pastilla de KBr. Línea azul $Co^{II}(P)$, línea verde $Co^{III}(P)NO^{-}$ y la flecha verde indica ν_{NO}

5. Instrumentación

Los puntos de fusión se tomaron en un instrumento de tubo capilar. Los espectros de RMN de ^{1}H y ^{13}C se midieron en $CDCl_3$ en un espectrómetro Bruker AM 500 MHz utilizando tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros UV-Vis se registraron con un espectrómetro HP 8453 en una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

5.1 Técnicas Electroquímicas

Se utilizaron técnicas electroquímicas de potencial controlado, para lo cual se necesita un potenciostato para fijar el potencial y medir la corriente obtenida, y una celda electroquímica de tres electrodos, los cuales varian en función del solvente usado. El *electrodo de trabajo* (*WE*) es donde ocurren los procesos electroquímicos de interés. Luego la corriente circula, por un circuito externo, hacia el *electrodo auxiliar* o *contraelectrodo* (*CE*). Es importante notar que el contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que la del electrodo de trabajo, para no limitar el flujo de carga eléctrica, y que el circuito se cierra por el transporte de iones en la solución (generalmente KNO_3 en medios acuosos, y $N(Bu)_4PF_6$ en solventes orgánicos). Por último, se emplea un *electrodo de referencia* (*RE*)

cuya función es controlar el potencial del electrodo de trabajo, aclarando que por el mismo no circula corriente debido a su alta impedancia.

5.1.1 Consideraciones Generales

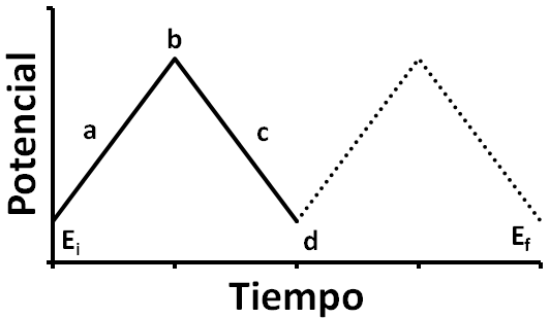
En una reacción donde se involucra un electrodo necesariamente existe una etapa de transferencia de carga desde o hacia una superficie conductora (reacción interfacial). La reacción de electrodo comprende a todos los procesos que vinculan el paso de transferencia de carga, entre ellos: reacción química, reorganización estructural y adsorción. Las especies electroactivas pueden estar disueltas, ser el mismo solvente, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo mismo.[156,157]

Una reacción de electrodo: $O + ne^- \leftrightarrow R$ (con O y R las especies oxidadas y reducidas, y n el número de electrones) involucra una secuencia de pasos que incluye el transporte de reactivos hasta la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la eliminación del producto de la superficie del electrodo. Es importante notar que la velocidad del proceso global está determinada por la velocidad del paso más lento.[156,157]

En esta tesis se utilizaron las técnicas electroquímicas: voltametría cíclica (VC), voltametría diferencial de pulso (VDP) y amperometría. A continuación se detallan los fundamentos de cada una de ellas.

<u>Voltametría Cíclica</u>

En esta técnica se aplica sobre el sistema en estudio una variación lineal del potencial, empezando en un potencial inicial *Ei*. A todo tiempo el potencial aplicado es $E = Ei + vt$ con v la velocidad de variación del potencial con el tiempo, dE/dt.



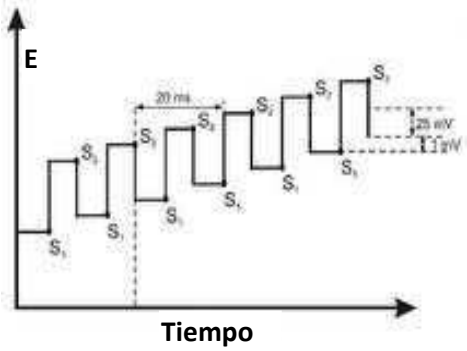
El potencial es variado linealmente en función del tiempo a una dada velocidad (v), comenzando en un valor E_i hasta un valor E_f, luego se puede volver al mismo valor inicial E_i o a otro. La velocidad de barrido utilizada en esta tesis se encuentra entre los 5 y 100 mV/s.

Esta técnica suele utilizarse inicialmente en cualquier estudio electroquímico pues da una primera información acerca del proceso de electrodo. En virtud de la forma de la curva

de intensidad vs potencial se conoce la reversibilidad (o no) del mismo, es decir, si la velocidad de transferencia electrónica de la reacción es tan rápida que el potencial del electrodo de trabajo cumple la ecuación de Nernst, y las etapas en las que se lleva a cabo.

Voltametría Diferencial de Pulso

A diferencia de la voltametría cíclica, en esta técnica el barrido de potencial se realiza aplicando pulsos de potencial de baja amplitud como lo muestra el esquema adjunto. Se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado, uno a tiempo S_1, inmediatamente antes del pulso, y el segundo a tiempo S_2, justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva (correspondiente a la carga de la doble capa) cayó prácticamente a cero, haciendo que la corriente medida sea netamente farádica. De esta forma, la técnica DPV gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas (VC). La grafica obtenida es la diferencia de corriente, $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$, versus el potencial base, E.



Amperometría

En las técnicas amperométricas un potencial fijo es aplicado entre el electrodo de trabajo y el de referencia, midiéndose la corriente circulante por el electrodo de trabajo. Las consideraciones particulares de esta técnica serán consideradas y ampliadas en la sección 7, junto con los resultados obtenidos.

Consideraciones Prácticas

Las voltametrías cíclicas (VC) y voltametrías de pulso diferencial (DPV) se llevaron a cabo con un potenciostato TEQ03. Para las voltametrías en medios no acuosos (CH_2Cl_2) se utilizó un sistema de tres electrodos, que consta de dos electrodos de platino, y un electrodo de trabajo de carbono vítreo, el electrolito de soporte (ES) fue $N(Bu)_4PF_6$ 0,1 M. El potencial se midió contra pseudoreferencia de ferroceno.

Las voltametrías cíclicas para los electrodos modificados con porfirina o para los electrodos de oro utilizados como controles se realizaron utilizando el electrodo

correspondiente, como electrodo de trabajo. En solución acuosa, un electrodo de Agº/AgCl saturado de KCl fue utilizado como referencia y un alambre de platino como el contraelectrodo según se muestra en la figura 9. Los electrolitos soportes en estos casos fueron KNO_3 y $KClO_4$ 0,1 M, ambos a pH 7. Las soluciones en la celda se cambiaron periódicamente para evitar la contaminación a través de Agº/AgCl. El CH_2Cl_2 se destila a partir de agentes de secado apropiados (CaH_2) en atmósfera de nitrógeno justo antes del uso. Se realizó la purga de oxígeno de todas las soluciones haciendo pasar una corriente de argón de alta pureza a través de la solución durante 40 min y se mantuvo el flujo de gas inerte a través de la solución mientras se tomaron las mediciones. El argón se satura con el disolvente correspondiente antes de entrar en la celda para reducir al mínimo la evaporación del mismo.

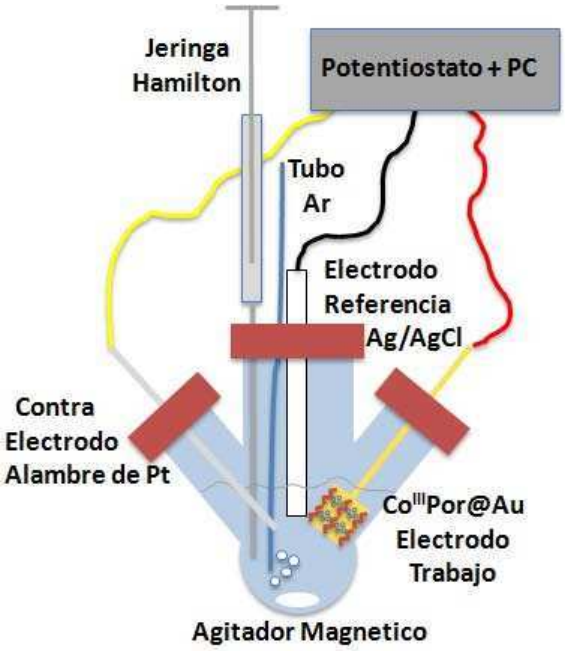


Figura 9 - Sistema de tres electrodos utilizado en todos los sistemas de medición

Los valores de potencial medio ($E_{1/2}$) se midieron como el potencial a medio camino que se extiende entre la oxidación y la reducción de pico para un par dado. Los experimentos acuosos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (~25°C). Los experimentos en CH_2Cl_2 se llevaron a cabo a temperatura ambiente (ondas catódica) y - 60°C (ondas anódicas). En el último caso se utilizó un baño de acetona-etanol enfriado con nitrógeno líquido para mantener la temperatura. En solución acuosa el potencial se

midió contra una referencia de Agº/AgCl y se convirtió a SCE mediante el uso de E (SCE) = E (Agº/AgCl) + 0,045 V con fines comparativos.

5.1.2 Preparación de electrodos

Antes de cada experimento, la superficie del electrodo de oro se pulió primero con polvo de alúmina (diámetro 0,3 y 0,05 μm) y se lavó con agua pura. A continuación, este electrodo se limpió en una solución Piraña [H_2SO_4: H_2O_2 (30% aq.), 2:1] durante 5 min. Después de lavarlo con abundante agua Milli-Q, el electrodo de Au se limpió electroquímicamente en 0,5 M de H_2SO_4 por barrido del potencial de 0 a 1,5 V frente a Agº/AgCl hasta que se obtuvo un voltamograma cíclico típico de oro limpio. Después de haber sido enjuagados con agua, etanol y secados, el electrodo está listo para ser modificado.

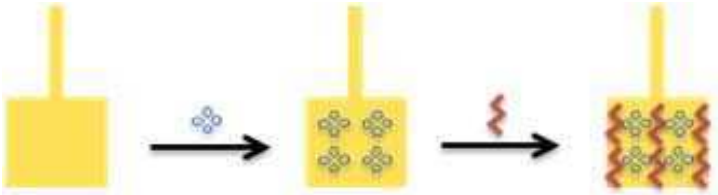
5.1.3 Inmovilización de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^-$ sobre una superficie de oro.

Para la adsorción de porfirina, se preparó una solución disolviendo 0,5 mg de Co(P) o $Co^{III}(P)NO^-$ en 4 ml de CH_2Cl_2 (0,1 mM). La eliminación de los grupos S-acetilo se llevó a cabo mediante la adición de gotas de HCl concentrado. La superficie de Au se sumergió en la solución resultante durante una noche. Finalmente, la muestra se enjuagó con CH_2Cl_2, seguido de un lavado con agua Milli-Q y finalmente se secó con una corriente de argón (ver esquema 12).

Las multicapas de porfirina de Co sobre Au (111) se prepararon mediante la colocación de una gota de la solución 0,1 mM de porfirina en CH_2Cl_2 sobre una superficie de oro recién limpia. Después de que todo el disolvente se evaporó, la muestra se midió por XPS sin ningún procedimiento de enjuague.

5.1.4 Adsorción de cistamina y tioles sobre la superficie modificada con Co(P).

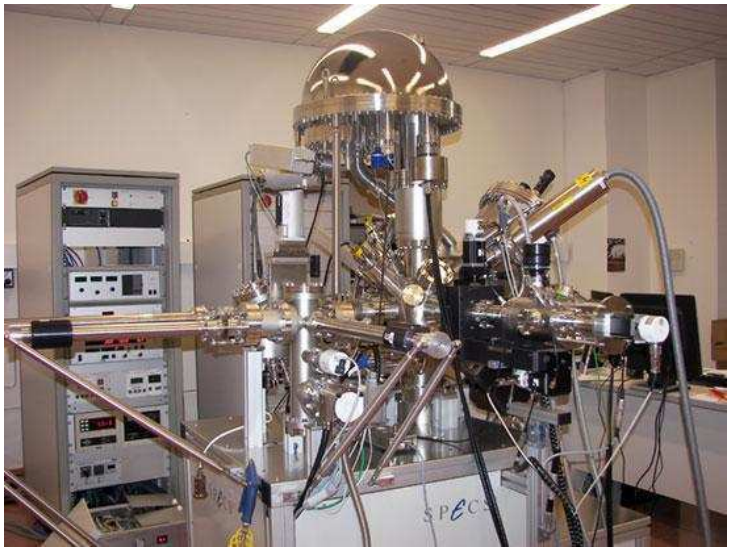
Después de la adsorción de porfirina, las muestras fueron modificadas con cistamina o con decanotiol. Esto se llevó a cabo mediante la inmersión de los electrodos modificados ``Co (P)``en solución acuosa 0,1 M del correspondiente compuesto durante 24 horas. Por último, los electrodos lavaron con agua destilada, agua miliQ y se secaron bajo corriente de argón (ver esquema 12).



Esquema 12 – Esquema de preparación de los electrodos modificados, en celeste la adsorción de porfirina y en rojo la de tioles.

5.2 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X es una técnica de análisis elemental cualitativa que permite estudiar la superficie de los materiales.[158,159] El análisis se hace sobre las capas más cercanas a la superficie (alrededor de 5 nm de profundidad). Esta técnica permite detectar todos los elementos con números atómicos mayores a 2. Una gran ventaja respecto a otras técnicas es que permite determinar *el estado químico de los átomos* que se encuentran en la muestra (por ejemplo si los átomos de carbono están unidos a átomos de oxígeno, estado de oxidación, etc.). Es una técnica muy utilizada para películas delgadas, catalizadores metálicos, microchips, polímeros, entre otros materiales. Los espectros XPS son obtenidos cuando una muestra es irradiada por rayos X (habitualmente el ánodo puede ser de Al o Mg) al tiempo que se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado. Para una medición de XPS (Fig. 10) se requieren condiciones de ultra-alto vacío debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción de contaminación sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas por segundo, impidiendo la medición de la superficie que realmente se quiere analizar.[158,159]



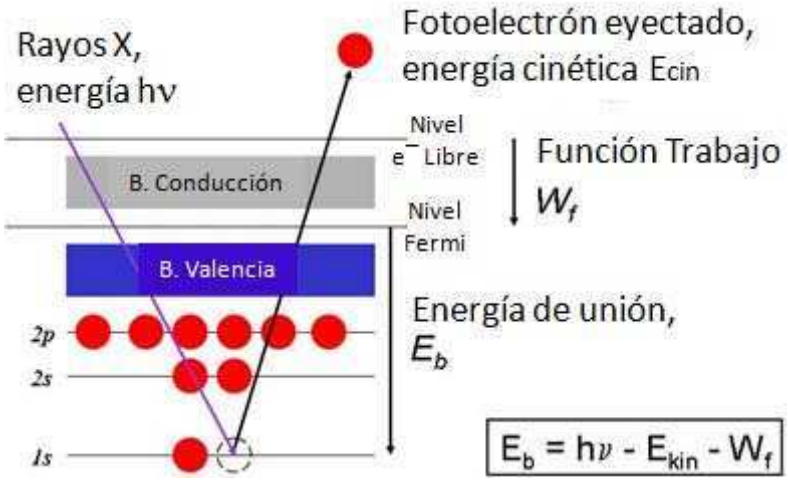


Figura 10 – A) Equipo de medición de XPS B) Principio de funcionamiento

Las mediciones se realizaron en el INIFTA, en colaboración con Mariano Fonticelli, Aldo Rupert y Roberto Salvarezza. Las muestras de Au(111) modificadas de Co(P) y ``Co(P) + cistamina`` se analizaron por XPS utilizando una fuente de radiación Ka Mg (XR50, Especificaciones GmbH) y un analizador de energía semiesférica (Phoibos 100, Especificaciones GmbH). Previamente, la calibración de dos puntos de la escala de energía se realizó utilizando bombardeo iónico sobre muestras de oro limpio (Au 4f7/2, energía de enlace = 84,00 eV) y cobre limpio (Cu 2p3/2, energía de enlace = 933,67 eV). Las relaciones de elementos se calcularon mediante la medición de las áreas corregidas por sus factores de sensibilidad relativos (RSF). Los datos espectrales reportados fueron recogidos con la mejor relación posible entre la resolución y el daño de la muestra. Para la región S2p de los espectros se utilizaron deconvoluciones de fondo del tipo Shirley y una combinación

de funciones lorentzianas y gaussianas. La anchura a media altura (FWHM) se fijó en 1,1 eV y la separación de doblete spin-órbita de la señal S2p se estableció en 1,2 eV. Las energías de enlace y las áreas de los picos fueron optimizadas para conseguir el mejor ajuste.

5.3 Caracterización por Microscopia de Efecto Túnel (STM)

Dicha microscopía está basada en el concepto de efecto túnel.[160] Cuando una punta conductora es colocada muy cerca de la superficie a ser examinada, una corriente de polarización (diferencia de voltaje) aplicada entre las dos permite a los electrones pasar al otro lado mediante efecto túnel a través del vacío entre ellas. La ``corriente de tunelización`` resultante es una función de la posición de la punta, el voltaje aplicado y la densidad local de estados (LDOS) de la muestra.[160,161] La información es adquirida monitoreando la corriente conforme la posición de la punta escanea a través de la superficie. Si la punta se mueve a través de la muestra en el plano x-y, los cambios en la altura de la superficie y la densidad de estados causan cambios en la corriente; estos cambios son mapeados en imágenes. El cambio en la corriente con respecto a la posición puede en sí mismo ser medido, o bien, puede ser medida la altura de la punta, z, correspondiente a una corriente constante.[161] Estos dos modos de operación son llamados modo de altura constante y modo de corriente constante, respectivamente. En el modo de corriente constante, la electrónica de retroalimentación ajusta la altura por un voltaje al mecanismo piezoeléctrico de control de altura.[162] Esto lleva a una variación de altura y así la imagen viene de la topografía de la punta a través de la muestra y da una superficie de densidad de carga constante; esto significa que el contraste en la imagen es debido a variaciones en la densidad de carga.[163] En el modo de altura constante, el voltaje y la altura se mantienen ambos constantes mientras que la corriente cambia para impedir que el voltaje cambie; esto lleva a una imagen hecha de cambios de corriente sobre la superficie, que pueden ser relacionados a la densidad de carga.[163] El beneficio de usar un modo de altura constante es que es más rápido, debido a que los movimientos del piezoeléctrico requieren más tiempo para registrar el cambio de altura en el modo de corriente constante, que el cambio de voltaje en el modo de altura constante.[163]

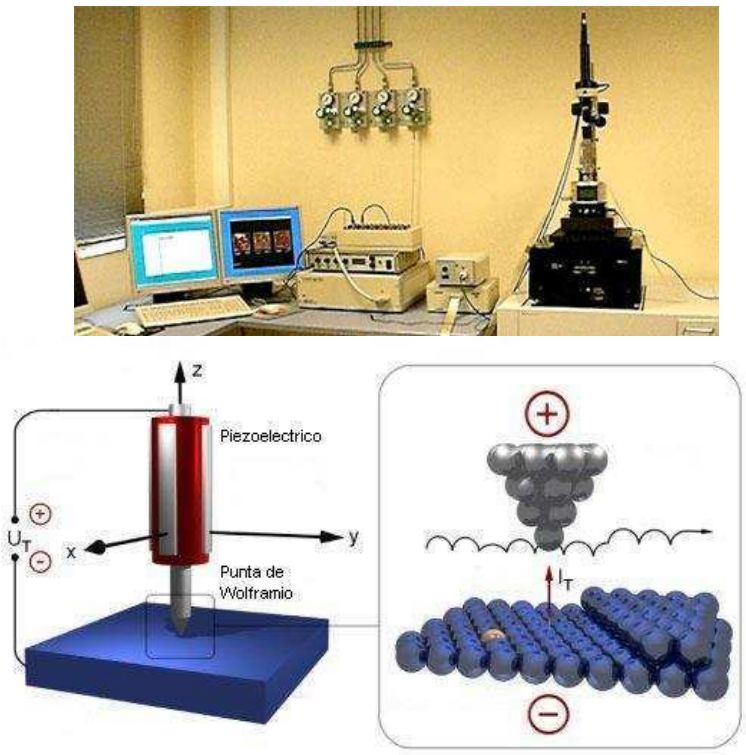


Figura 11 – Imagen del equipo y esquema básico de un microscopio de efecto túnel

Las mediciones se realizaron en el INIFTA, en colaboración con Mariano Fonticelli, Aldo Rupert y Roberto Salvarezza. Para las imágenes por STM las porfirinas de cobalto fueron adsorbidas sobre sustratos de Au orientado sobre la cara (111) (de Arrandee's™). Después del recocido durante diez minutos con llama de hidrógeno, estos sustratos de Au presentan terrazas atómicamente lisas (111) separadas por escalones, mono y diatómicos en altura, como se observa por STM (Fig 11). La formación de imágenes STM se hizo en aire, en el modo de corriente constante, con un microscopio IIE Nanoscope de Digital Instruments (Santa Barbara, CA) y mediante el uso de tips comerciales Pt-Ir. Corrientes túnel típicas, voltajes de polarización y tasas de exploración fueron de 0,5 nA, 600 mV y 10 a 15 Hz, respectivamente. Las calibraciones del escáner piezoeléctrico para el plano xy se llevaron a cabo mediante la formación de imágenes de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG).[164] Los escalones presentes en la superficie del Au (111) de 0,24 nm en altura[165,166] se utilizaron para calibrar el piezo-tubo en la dirección Z. El análisis de imágenes se realizó utilizando el software del microscopio, versión 5.30r3.sr3 de Digital Instruments. Para el análisis de distribución de tamaño se utilizó la densidad espectral de potencia isotrópica de dos dimensiones (PSD) después del filtrado de paso alto de la imagen.

5.4 Determinación de la estructura electrónica del sistema CoP-Au con Teoría del Funcional de Densidad (DFT)

Esta parte fue llevada a cabo en colaboración con los Dres. Ezequiel de la Llave y Damián Scherlis. Los cálculos de DFT, en condiciones de contorno periódicas, se realizaron utilizando el código Quantum Espresso,[167] que se basa en la aproximación pseudopotencial para representar las interacciones ión-electrón, y una base de ondas planas para expandir los orbitales Kohn-Sham. Se adoptó un pseudopotencial tipo Ultrasoft,[168] junto con el formalismo PBE para calcular el término de intercambio de correlación.[169] Un punto de corte de energía de 25 y 200 Ry se utilizó para ampliar las funciones de onda electrónicas y la densidad de carga, respectivamente. La superficie de Au (111) se modela como una capa infinita de átomos de Au truncada en la geometría (111), en superceldas de dimensiones 15,04 x 11,57 x 15,04 $Å^3$ (Fig 12). Dado el gran tamaño de la supercelda necesaria para dar cabida a la molécula de porfirina, la representación de la superficie estaba limitada a dos capas de átomos de Au, y el muestreo de la zona de Brillouin se hizo con una grilla Monkhorst-Pack de 2x2x1.[170] Todas las coordenadas atómicas fueron totalmente relajadas, con la excepción de los pertenecientes a la segunda capa de Au, que se congeló en su estructura mayor.

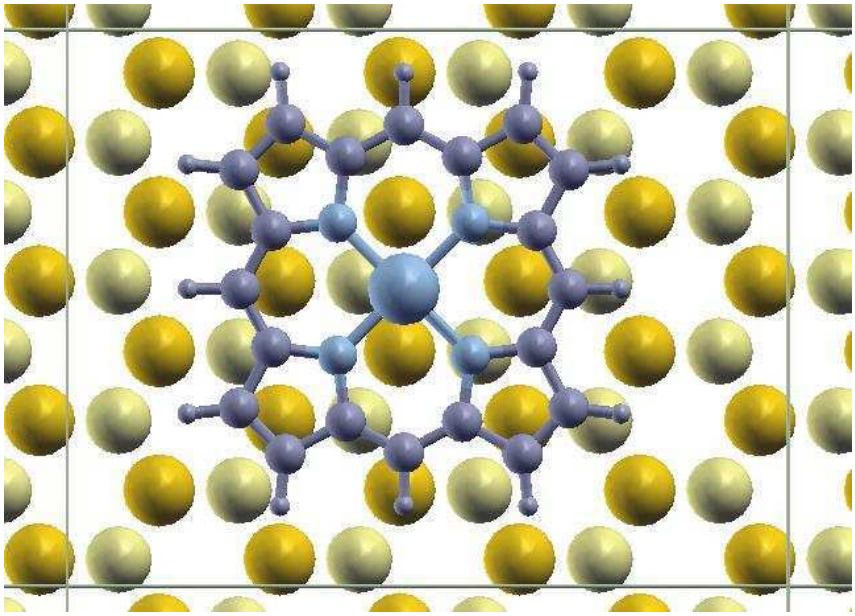
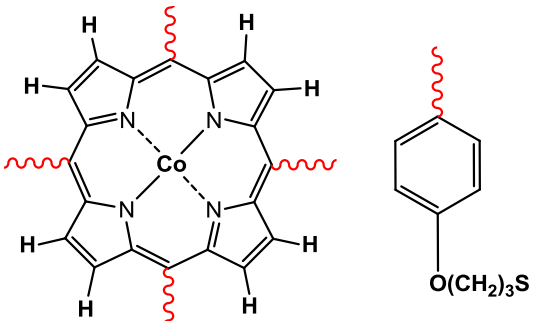


Figura 12. Supercelda para los cálculos de DFT, delimitada por las líneas rectas grises. Vista superior de un modelo de Co^{II}(P) adsorbida en la superficie de Au (111), donde los átomos de color amarillo brillante y pálido pertenecen a la primera y segunda capa respectivamente.

CÁPITULO III

RESULTADOS

6. Desarrollo y caracterización del electrodo sensor de HNO



Dada la coincidencia de los blancos y la reactividad entre el NO y HNO, es muy difícil diferenciar concluyentemente su papel físico-patológico, y la precisa discriminación entre ellos sigue siendo fundamental. Dada la alta reactividad y la estabilidad de las porfirinas de Co^{III} con el HNO junto a la fácil y eficiente manera de unirse covalentemente a los electrodos a través de enlaces S-Au, se probó la cobalto(II)-5,10,15,20-tetraquis[3-(p-acetiltiopropoxi)fenil] porfirina [Co(P)], como un posible candidato para la discriminación electroquímica de ambas especies. Para ello se estudió la reacción en solución entre NO, dadores de NO y los dadores de nitroxilo de uso común, con Co^{II}(P) y Co^{III}(P). En segundo lugar, se unió covalentemente la Co(P) a electrodos de oro caracterizando sus propiedades redox y estructurales por técnicas electroquímicas así como con cálculos de teoría del funcional de la densidad del estado sólido, microscopía de efecto túnel y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X. Finalmente, se estudió electroquímicamente las reacciones de NO y dadores de HNO con Co(P) unida al electrodo.

6.1 Voltametrías Cíclicas de Co(P) en solución de CH_2Cl_2

Para comenzar la caracterización y reactividad de las CoP y sus derivados nitrosilados, primero se caracterizaron las propiedades redox de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ en solución, comparando los resultados con datos anteriores reportados para otras porfirinas de cobalto. La Figura 13 muestra voltagramas cíclicos de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ en CH_2C1_2 con 0,1 M $N(Bu)_4PF_6$ como electrolito soporte. Las mediciones se realizaron tanto a temperatura ambiente (20 º C) como a baja temperatura (-60 º C).[171]

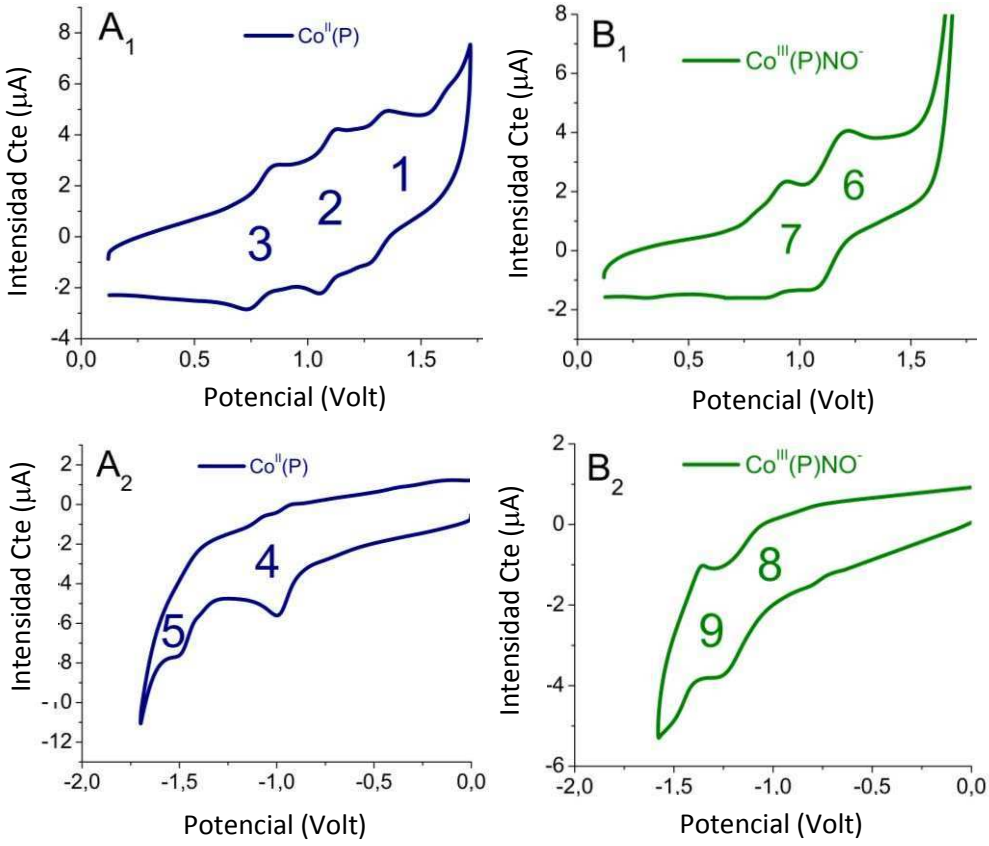


Figura 13. Voltagramas de **Co(P)** (panel izquierdo A_1 y A_2) y **$Co^{III}(P)NO^-$** (panel derecho B_1 y B_2) en solución de CH_2C1_2 / 0.1 M $N(Bu)_4PF_6$, velocidad de barrido 0,1 Volt/s. Los potenciales (volt) están reportados versus SCE. En A_1 y B_1 la medición fue realizada hacia potenciales positivos (medido a TA), mientras que en A_2 y B_2 la medición fue realizada hacia potenciales negativos (medido a -60°C).

Como se muestra en el panel izquierdo de la figura 13 se observan cinco cuplas redox para Co(P). A partir del estado redox $Co^{II}(P)$, y de lo reportado ampliamente en la literatura,[171,172] se asignaron dichas cuplas a las siguientes reacciones (ver Tabla 3):

$$[Co^{III}(P)]^{3+} + e^- \longleftrightarrow [Co^{III}(P)]^{2+} \quad (1)$$

$$[Co^{III}(P)]^{2+} + e^- \longleftrightarrow [Co^{III}(P)]^{+} \quad (2)$$

$$\mathbf{[Co^{III}(P)]^{+} + e^- \longleftrightarrow Co^{II}(P)} \quad \mathbf{(3)}$$

$$Co^{II}(P) + e^- \longleftrightarrow [Co^{I}(P)]^- \quad (4)$$

$$[Co^{I}(P)]^- + e^- \longleftrightarrow [Co^{I}(P)]^{2-} \quad (5)$$

Las tres primeras reacciones (panel A_1), corresponden a oxidaciones por un electrón, mientras que las ondas que se muestran en A_2 corresponden a dos reducciones por un electron. Para el complejo nitrosilado $Co^{III}(P)NO^{-}$ se observan cuatro ondas en los paneles de la derecha de la Figura 13 (B1 y B2), que se asignan a las siguientes reacciones (ver Tabla 3):

$$[Co(P)NO]^{2+} + e^- \longleftrightarrow [Co(P)NO]^+ \quad (6)$$

$$\mathbf{[Co^{III}(P)NO]^+ + e^- \longleftrightarrow Co^{III}(P)NO^-} \quad \mathbf{(7)}$$

$$Co(P)NO + e^- \longleftrightarrow [Co(P)NO]^- \quad (8)$$

$$[Co(P)NO]^- + e^- \longleftrightarrow [Co(P)NO]^{2-} \quad (9)$$

Los resultados son consistentes con las mediciones anteriores de otras porfirinas de cobalto.[172] En concordancia con lo descripto por Richter-Addo, et al.,[171] la nitroxil-porfirina posee dos oxidaciones y dos reducciones. El $E_{1/2}$ de separación del primer proceso de oxidación para $Co^{II}(P)$ ("Co(P)") y $Co^{III}(P)NO^-$ ("Co(P)NO", carga global cero) en solución es solamente 100mV (**3**,**7**), y aun menor para el segundo. Las cuplas de reducción en solución están separadas por 340 mV (**4**,**8**).

6.2 Unión covalente y voltametrías cíclicas de Co(P) sobre electrodo de oro

La confirmación directa de la adsorción de Co(P) se realizó mediante mediciones electroquímicas de los ´´electrodos Co(P)´´ después de limpiar las superficies con abundante agua. Los datos de XPS (que se presentan en la siguiente sección, 6.3) dan una mayor comprensión acerca de la estructura de Co(P) sobre los sustratos de Au. La figura 14A muestra voltagramas cíclicos del ´´electrodo Co(P)´´ en 0,1 M de KNO_3 comparado con la Co(P) en solución de CH_2Cl_2 (Co(P) no es soluble en agua). La Figura 14A muestra un proceso de oxidación reversible con un valor de $E_{1/2}$ de aproximadamente 0,4 V. La reacción corresponde a la cupla Co^{III}/Co^{II} (reacción 3), y, sorprendentemente, el valor se desplaza ca. 400 mV a potenciales más bajos en comparación con los valores obtenidos en solución. Estos resultados muestran que la adsorción de Co(P) en el electrodo de oro facilita la oxidación de Co^{II}. Se obtuvieron los mismos resultados para las mediciones electroquímicas correspondientes en solución de CH_2Cl_2. Todos los potenciales redox resultantes (en solución y adsorbido) se resumen en la Tabla 3.

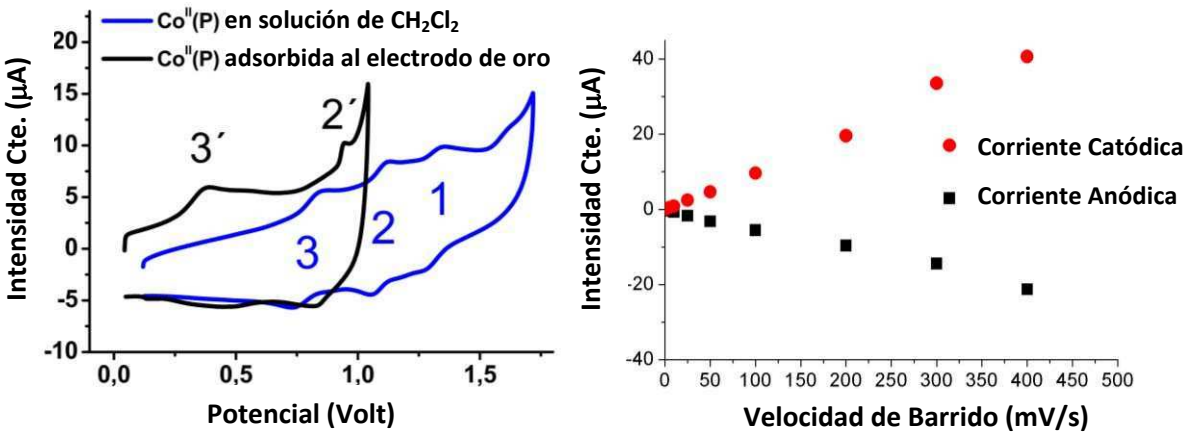


Figura 14. A) Voltagramas cíclicos de electrodos de oro modificados con Co(P) en solución 0,1M de KNO_3 en agua (línea de color negro) y Co(P) en solución CH_2C1_2 / 0.1 M $N(Bu)_4$ PF_6 (línea azul). Los valores son referidos a SCE, velocidad de barrido 0,1 Volt/s. B) Procesos de oxidación de Co(P) unido a electrodos de oro (especies adsorbidas). Intensidad de corriente vs velocidad de barrido para el primer proceso de oxidación de ´´electrodos Co(P)´´. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Para confirmar que el proceso corresponde a la reducción del electrodo unido a porfirina, se midieron las intensidades de los picos como función de la velocidad de barrido. El gráfico resultante se muestra en la Figura 14B y demuestra claramente que el proceso corresponde a especies adsorbidas.

Tabla 3. Potenciales redox medidos para Co(P) y $Co^{III}(P)NO^-$

Porfirina	Solvente – Medio / ES	Condición	$E_{½}$ (Volt vs. SCE)				
			1	2 , 6	**3 , 7**	4 , 8	5 , 9[a]
Co(P)	CH_2Cl_2 / $N(Bu)_4$ PF_6 0.1M	Solución[b]	1,29 V	1,09 V	**0,79 V**	-0,80 V	-1,30 V
		Adsorbido[c]	-----	1,10 V	**0,44 V**	- 0,70 V	-----
	Agua / KNO_3 0.1 M	Adsorbido[c]	-----	0,90 V	**0,40 V**	-0,79 V	-----
$Co^{III}(P)NO^-$	CH_2Cl_2 / $N(Bu)_4$ PF_6 0.1M	Solución[b]	-----	1,14 V	**0,89 V**	-1,14 V	-1,41 V
		Adsorbido[c]	-----	0,94 V	**0,86 V**	- 1,01 V	------
	Agua / KNO_3 0.1 M	Adsorbido[c]	-----	-----	**0,83 V**	- 0,98 V	------

[a] Número de reacción. [b] Se utilizó un sistema de tres electrodos, que consta de dos electrodos de platino, y un electrodo de trabajo de carbono vitreo (velocidad de barrido 0,1 Volt/s). Las ondas catódicas fueron medidas a temperatura ambiente, las ondas anódicas a -60 °C. [c] Los electrodos modificados con porfirina de cobalto fueron utilizados como electrodos de trabajo. En solución acuosa, un electrodo Ag^o/AgCl (saturada) en KCl fue utilizado como el electrodo de referencia y un alambre de platino como contraelectrodo. Para las mediciones correspondientes en solventes orgánicos se utilizaron dos electrodos de platino. (Velocidad de barrido 0,1 Volt/s, medida a temperatura ambiente)

Voltagramas cíclicos de $Co^{III}(P)NO^{-}$. Utilizando la misma técnica que para Co(P), $Co^{III}(P)NO^{-}$ (preparado como se ha descripto en la sección 4.4, utilizando NO gas) se une covalentemente a electrodos de oro y fue caracterizado electroquímicamente. Los voltagramas cíclicos de los ´´electrodos $Co^{III}(P)NO^{-}$´´ en solución acuosa 0,1 M de KNO_3 muestran una clara onda correspondiente a la primera oxidación por un electrón (la inversa de la reacción 7) en 0.83 V vs SCE (Figura 15A). En este caso, el desplazamiento debido al efecto de superficie de oro es mucho más pequeño que antes, sólo 60 mV. Una vez más, como se esperaba, las intensidades muestran una dependencia lineal con la velocidad de barrido que confirma que el proceso corresponde a una señal derivada de especies adsorbidas (Fig 15B). Se obtuvieron resultados similares para las mediciones en medios orgánicos. Todos los valores de $E_{1/2}$ resultantes se resumen en la Tabla 3.

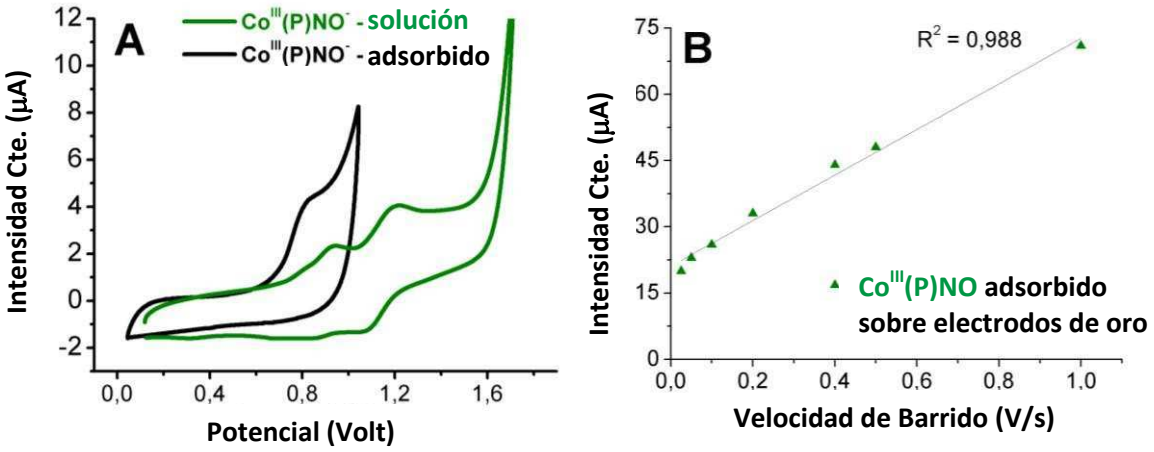


Figura 15. A) Voltagramas cíclicos tanto de $Co^{III}(P)NO^{-}$ en solución (línea verde) y adsorbido a los electrodos en CH_2C1_2 / 0.1 M $N(Bu)_4PF_6$ (línea negra) B) Intensidad de corriente vs velocidad de barrido para el primer proceso de oxidación de ´´electrodos $Co^{III}(P)NO^{-}$´´. Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

En resumen, los resultados de la Tabla 3 muestran que, debido a la adsorción de la porfirina de cobalto sobre la superficie de oro, se observa una disminución de 400 mV en la cupla Co^{III}/Co^{II}, y por lo tanto existe una diferencia significativa en el potencial redox para el proceso correspondiente entre las porfirinas: libre y con NO. ***El primer proceso de oxidación resultante se produce a ≈ 0,4 V para Co^{III}/Co^{II} y a 0,83 V para $Co^{III}(P)NO/Co^{III}(P)NO^{-}$ en medios acuosos.*** Los mismos resultados se observan en solvente orgánico, lo que demuestra que este no es un efecto del solvente, sino que esta relacionado con la superficie. Curiosamente, los otros dos procesos redox (2 y 4) no se ven afectados por la misma. El origen de los efectos de superficie se estudió adicionalmente usando métodos DFT como se describe más adelante.

6.3 Caracterización de electrodos modificados por XPS y STM

En esta sección se describen los resultados de los análisis de XPS y STM de Co(P) y ´´Co(P) + cistamina´´ en sustratos de Au en orientación preferencial (111). La cistamina se utiliza para evitar una señal espuria por la reacción con el electrodo sin recubrir (ver página 79). La Tabla 4 muestra las relaciones elementales para Au4f, Co2p, C1s, O1s, S2p, referenciados a N1s para Co(P) (múltiples capas) y ´´Co (P) + cistamina´´. La intensidad N/C y la relación N/O superan la estequiometría molecular exacta sólo para las especies que contienen oxígeno. La fuente de oxígeno adicional es probablemente oxígeno molecular que puede adsorberse en el cobalto.[173,174] El C1s surge no sólo de las moléculas orgánicas, sino también de la contaminación durante la transferencia a la cámara de UHV. La relación N/Co, es ligeramente más alta que el valor estequiométrico de Co(P), e indica una demetalación de la porfirina. Para ambas muestras la relación N/S está estrechamente por encima de uno, de acuerdo con el valor estequiométrico. Estos resultados se pueden explicar suponiendo que la mayor parte de los restos de azufre han sido anclados a la superficie de oro. Por lo tanto los valores de N/S son mayores que uno, debido a la atenuación de la señal de azufre, que está unido directamente a Au y más profundo que el nitrógeno.

Tabla 4. Relación de elementos para las capas de Co(P) y ´´Co(P) + cistamina´´ sobre oro.

	N/S	N/Au	N/C	N/O	N/Co
Co(P)	1	-	0.06	1	4
Co(P) sobre Au(111)	1.2	0.05	0.04	0.14	5.1
¨Co(P) + cistamina¨ sobre Au(111)	1.2	0.10	0.05	0.15	7.7

La Figura 16A muestra la presencia de regiones N1s y Co2p para Co(P) sobre Au (111). El pico Co 2p3/2 se encuentra en 780,3 eV. Los N1s revelan un pico principal (centrado a 398,4 eV), y una característica señal ancha a alta energía de enlace (401,25 eV). Pequeñas cantidades de porfirinas demetaladas también podrían contribuir a esta señal. Además, pueden estar presentes contaminantes producto del manejo de la muestra en aire.

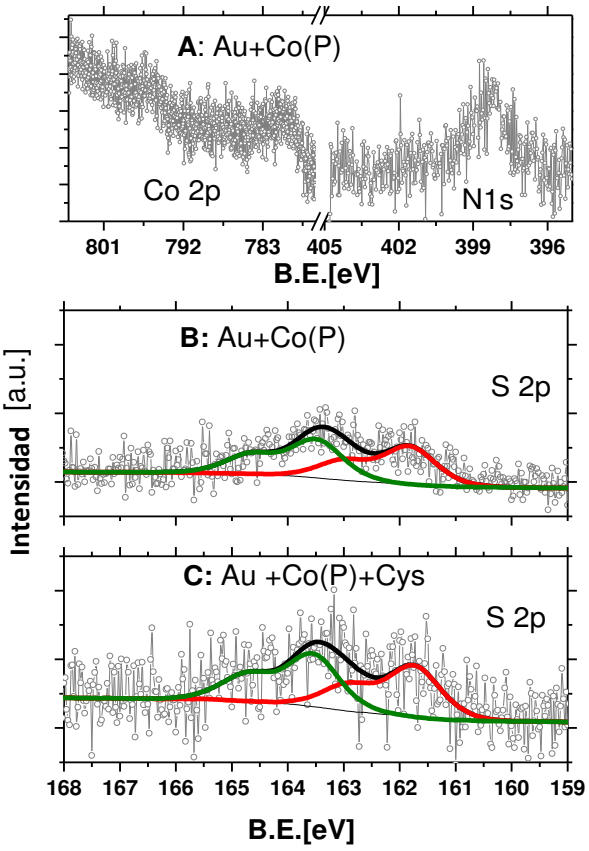


Figura 16. Espectros XPS de A) regiones Co2p y N1s B) Región S2p para Co(P) sobre Au(111). C) Region S2p para ´´Co (P) + cistamina´´ sobre Au (111). Las regiones S2p se muestran como dos picos deconvolucionados para ambas muestras.

En lo sucesivo, el valor absoluto de la energía de enlace (BE) de la S2p3/2 se emplea para obtener información sobre la unión química del S a la superficie de Au. Vale la pena remarcar que la señal del núcleo (S2p3/2) del alcanotiol sobre Au (SAMs) se puede deconvolucionar en tres componentes diferentes, C1 a 161 eV, C2 a 162 eV, C3 a 163-164 eV.[175] El componente C1 se relaciona con especies atómicas de azufre adsorbidas.[176] El componente C2 está relacionado con S quimiadsorbido sobre la superficie metálica a través de un enlace tiolato; mientras que el componente C3 se ha asignado tanto a tiol como a disulfuro libre.[177–179] La deconvolución espectral de la región S2p, (Figura 16B y 16C) muestra dos componentes de las energías de enlace de 161,9 - 162,1 eV (C2) y 163,3 - 163,4 eV (C3). El componente C2 corresponde a un doblete p de tiolatos unidos a Au, mientras que la contribución C3 está relacionada con tioles, tioacetilos libres y disufuros. Se obtuvieron resultados similares para las porfirinas con grupos acetilos (protegidas para la adsorción) en solución [174,180] y en condiciones de ultra alto vacío.[181] Vale la pena señalar que no está claro qué fracción del componente C3 está relacionado con alguna de las especies que contribuyen a esta señal. Sea cual sea el origen de este componente, es evidente que parece ser aproximadamente la mitad de la cantidad total de azufre. Entonces, podría afirmarse que Co(P) estaría adsorbido tanto con su anillo de porfirina paralelo a la superficie o cerca de lo normal a su superficie. En este sentido, Berner *et* . *al*. han llevado a cabo la medición de XPS en diferentes ángulos de despegue (TOA) estableciendo que los tioacetilos o tioles libres se encuentran en la parte más externa de la superficie.[174,180] Basandonos en estos resultados, podemos presuponer que la cantidad de azufre unido se debe estimar teniendo en cuenta alguna atenuación. Entonces, es razonable suponer que el número de especies de azufre unido al substrato es mayor que la que corresponde a las especies relacionadas con C3. Bajo esta circunstancia, la configuración que esta acostada estaría, en promedio, favorecida. Se presentan más datos en favor de que las moléculas tienen el anillo de porfirina en paralelo a la superficie mediante la realización de imágenes de STM de las superficies modificadas con Co(P) (ver páginas subsiguientes).

Por otro lado, el análisis de XPS indica un aumento en las relaciones de intensidad de S/Au y N/Au después de la adsorción de cistamina. Teniendo en cuenta que durante dicho proceso cada molécula da lugar a dos tioles después de la ruptura del enlace S-S,[182] este resultado muestra que los sitios libres de Au son probablemente bloqueados. No hay especies de azufre oxidados (S2p BE> 166 eV), tales como sulfonato, en las muestras.

Caracterización de Co(P) unida a una superficie de oro mediante microscopía de efecto túnel. También se caracterizó por imágenes de STM la Co(P) unida covalentemente a nivel molecular. Este es un punto clave con respecto a la actividad química de moléculas inmovilizadas, ya que depende en gran medida de la estructura multicapa y de la geometría de la adsorción de las moléculas individuales. En la Figura 17A se muestran imágenes típicas de STM de la Co(P) cubriendo superficies de Au (111). Se ve un escalón entre dos terrazas de Au (111) cerca de la esquina inferior izquierda (en paralelo a la línea negra, se indica como "B"). También se distinguen claramente las islas vacantes de oro en las terrazas atómicamente suaves del sustrato Au (111), esto se observa con frecuencia en superficies modificadas con tioles. El sustrato posee una gran cantidad de puntos brillantes distribuidos aleatoriamente que están relacionados con adsorción de porfirina. La figura 17 muestra que hay dos tipos de elementos, las observadas más frecuentemente son de 0,42 ± 0,11 nm de altura (ver sección transversal en la figura 17B), mientras que las más grandes y brillantes poseen 0,87 ± 0,08 nm de altura (ver sección transversal en la figura 17C). Las de 0,4 nm de altura están de acuerdo con datos anteriores de contraste molecular en imágenes de STM para porfirinas metaladas [173,183] y ftalocianinas.[184] Las manchas más brillantes con alturas de aproximadamente 0,9 nm se pueden asignar a aglomerados en una segunda capa. De hecho, se ha demostrado que las porfirinas son capaces de formar bicapas[173,183] (ver el histograma de altura en la Figura 17D). Si las moléculas estuvieran orientadas con el plano de la porfirina perpendicular a la superficie deberían mostrar una altura aparente de aproximadamente 3 nm. La posibilidad de tener agregados de porfirina, en los que no todas las funciones mercapto están unidos covalentemente al sustrato es consistente con los resultados de XPS que muestra la contribución a la señal de azufre de los tioles protegidos con grupos acetilo, tioles o disulfuros no unidos. ***El escaneado repetitivo con la punta del STM no eliminó las moléculas, lo que indica que están fuertemente unidas a la superficie de oro, y también que la segunda capa se une firmemente a la primera.***

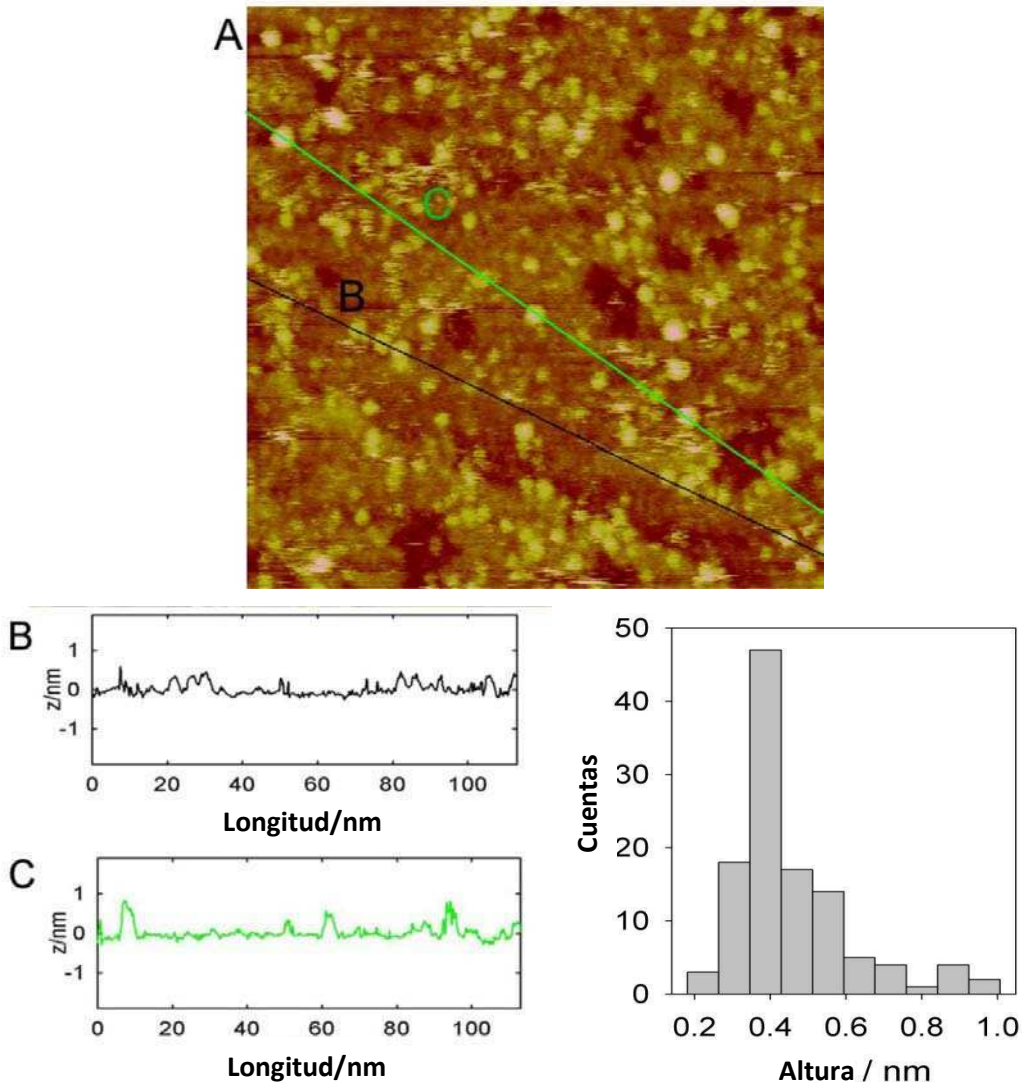


Figura 17. A) Imagen STM de 100 nm x 100 nm para un sustrato de Au (111) modificado con Co(P). B) Perfil transversal de una sección correspondiente a la traza negra en la figura 17A. C) Perfil transversal de una sección correspondiente a la traza verde en la figura 17A. D) Histograma de la altura aparente del STM a corriente constante.

En cuanto a la orientación de la porfirina con respecto a la superficie, se analizó el tamaño aparente de porfirina en el plano xy. Los dos análisis de *Power Spectral Density* tridimensional de una imagen de 150 nm x 150 nm (después del filtrado de paso alto) muestra una amplia distribución de puntos con tamaño promedio de 2,9 nm (Figura 18A). Estos puntos son consistentes con porfirinas similares de cobalto quimisorbidas en superficies de Au.[174] También sugiere que las mismas están en una configuración acostada.

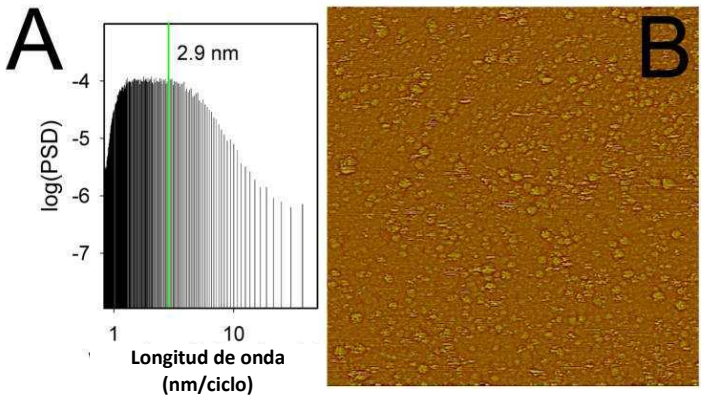


Figura 18. A) Grafico de *Power Spectral Density* obtenido por el análisis de la imagen en el panel de "B". Tener en cuenta que la potencia y longitud de onda se indican en escalas logarítmicas. B) Imágen de 150 nm x 150 nm para especies Co(P) adsorbidas en una terraza Au (111) después de un filtrado de paso alto.

A partir de los análisis de las superficies modificadas por XPS y STM se puede inferir que la mayoría de las moléculas de Co(P) están adsorbidas en una configuración paralela a la superficie de Au mediante uniones múltiples, con algunas moléculas en una segunda capa. La fuerte interacción adsorbato-superficie explica la distribución aleatoria de porfirinas a través de las terrazas Au (111). En consecuencia, teniendo en cuenta que se forma una monocapa desordenada de Co(P), sitios vacantes de Au pueden ser ocupados por adsorbatos que tienen un tamaño lateral más pequeño. También se prevee que estos resultados sean válidos en el caso de porfirina inmovilizada sobre electrodos policristalinos como los utilizados en los experimentos electroquímicos.

6.3.1 Medición de la cobertura con Co(P) del electrodo de oro.

Para calcular la cobertura de la superficie, se llevó a cabo una desorción reductora [185,186] de las porfirinas tioladas en medio básico (KOH 0,1 M). Del pico catódico en el voltagrama (Fig 19) se midió la densidad de carga implicada en la reducción de los tioles. El valor de densidad de carga permite estimar el número de moléculas de porfirina presente en la superficie de Au suponiendo un electrón por union de tiolato. Se determinó una cobertura de la superficie del 25% (ver siguiente página para más detalles sobre el cálculo). Este valor es similar, dentro del error experimental, a la obtenida usando STM.

El pico resultante a -0,9 V corresponde con el proceso de reducción de tioles y por lo tanto el desprendimiento de Co(P) del electrodo. La integración del área del pico (Figura

19B) permite calcular el número de electrones que participan y por lo tanto el número de moléculas de Co(P).

$$\Gamma = \text{Área pico reducción}/(n° e^- . F . \text{Superfie Efectiva}) \quad (10)$$

- Cálculo del área del pico de corriente catódica: 2,3 10^{-6} Coulomb (A.seg)
- Luego, con la constante de Faraday se obtienen los moles de porfirina: 2,4 10^{-11} moles
- Hay 4 electrones por porfirina, así que tenemos que dividirlos: **6,0 10^{-12} moles**
- Para calcular la cobertura, necesitamos la superficie efectiva del electrodo (calculado en el paso siguiente Fig 19B): **1,4 cm^2**
- **Concentración superficial**, Γ = moles porfirina / sup. electrodo = **4,3 x10^{-12} moles/cm^2**

Para poder estimar la cobertura superficial de porfirina, θ, se necesita la concentración superficial de una monocapa ideal (teórica), $\Gamma_{monocapa}$. Para eso, se la calcula considerando a la superficie de oro, como un área hexagonal compacta con distancias intermoleculares de 0,29 nm. Por lo tanto, $\Gamma_{monocapa}$ **= 2,3 x 10^{-11} moles /cm^2** y **θ ≅ 0,2**

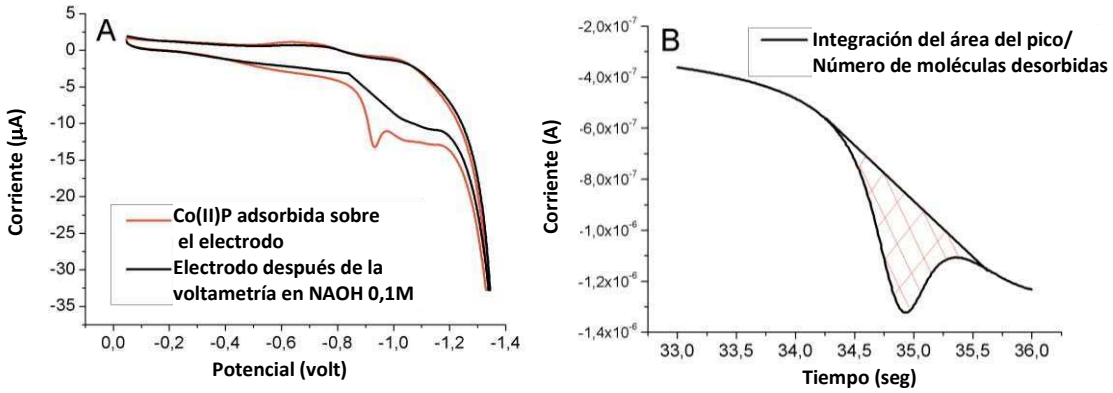


Figura 19. Desorción electroquímica de porfirina, la cual se llevó a cabo en medio básico. A) Voltametría en KOH 0,1 M vs SCE B) Integración del área de la onda.

6.3.2 Medición del área superficial efectiva del electrodo.

Dado que los electrodos no son perfectamente lisos (poseen imperfecciones naturales), debe calcularse el factor de rugosidad de los mismos. El área superficial efectiva de los electrodos de trabajo se determinó mediante la medición de la carga necesaria para reducir una monocapa de óxido de oro, que es un proceso de dos electrones (Figura 20A). Esto se hizo mediante la integración del pico catódico principal en las curvas de corriente-potencial (Figura 20B). Por otro lado, se sabe que en un plano ideal de Au (111) hay 1,4 x

10^{15} atomos/cm^2, y por lo tanto, la carga requerida para formar una monocapa de especies que ocupan un sitio (y que requieren un electrón por sitio) es 222 μC.cm^{-2}.[187] Con ambos datos, el teorico y el calculado, se determió el factor de rugosidad definido como la relación del área superficial real vs. la geométrica, que arrojó un valor de 1,33.

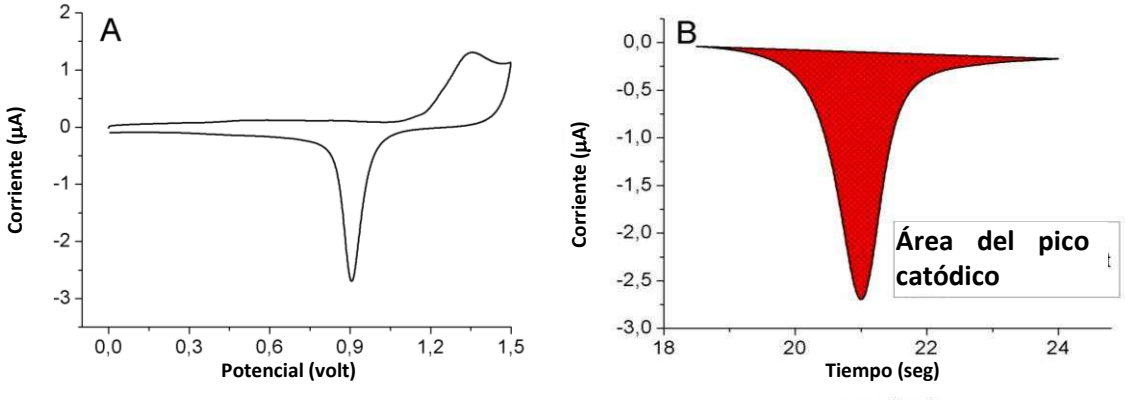


Figura 20. A) Voltagrama cíclico de electrodos de oro en solución de H_2SO_4 0,5 M. vs SCE B) Cálculo del área de la onda catódica.

6.4 Cálculos de estructura electrónica de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$

Para describir la estructura electrónica de los sistemas Co(P), se optimizaron modelos estructurales de los complejos Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ sobre una superficie de Au (111) mediante cálculos DFT. Se deja relajar la geometría a partir de configuraciones equivalentes para ambos sistemas, con los macrociclos de las porfirina a alrededor de 3,7 Å sobre la superficie. Sorprendentemente, las optimizaciones condujeron a las estructuras finales representadas en la Figura 21: las longitudes medias de la primera capa de Au con respecto al plano de la molécula resultaron ser 3,8 y 4,4 Å para las porfirinas libres y nitrosilada, respectivamente. La separación obtenida para el modelo Co(P) está razonablemente de acuerdo con el valor observado de los adsorbatos por STM, 0,42 ± 0,11 nm. Los átomos de Co se ubican entre dos átomos de oro en un sitio puente.

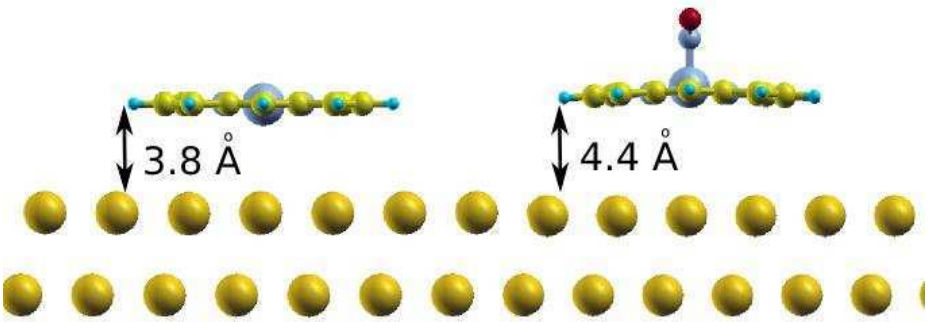


Figura 21. Estructuras optimizadas por cálculos DFT de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ en la superficie de Au (111).

Las cargas atómicas resultantes de un análisis de la población Lowdin se muestran en la Tabla 5. En Co(P), la carga sobre el cobalto se hace menos positiva tras la unión al oro. En contraste, la carga aumenta ligeramente en $Co^{III}(P)NO^{-}$ cuando la molécula se aproxima de la superficie de oro al ser adsorbida. Este comportamiento es indicativo de la diferente naturaleza de la interacción de los átomos Co-Au en presencia y en ausencia de NO. Al mismo tiempo, la densidad electrónica parece fluir lejos de los átomos de nitrógeno de la porfirina en Co(P), mientras que las poblaciones atómicas de los átomos de nitrógeno ecuatoriales apenas se ven afectados cuando el NO está coordinado. ***Podemos entonces concluir que la coordinación de NO separa la porfirina de la superficie de oro y disminuye la transferencia de carga desde la superficie hasta el centro metálico de Co***, consistente con lo que se informó previamente por Flechtner *et.al.* para una superficie de Ag.[188,189]

Tabla 5. Cargas atómicas de acuerdo con un análisis de la población Lowdin, para las estructuras relajadas de Co(P) y $Co^{III}(P)NO^{-}$ en vacío (aislada) y en una superficie de Au (111) (adsorbida). ∑Np y ∑NO representa la carga sumada de los átomos de nitrógeno de la porfirina y de los átomos de NO, respectivamente.

		Co	$\sum N_p$	∑NO
Co(P)	Aislada	+0.83	-1.00	-
	Adsorbida	+0.78	-0.89	-
$Co^{III}(P)NO^{-}$	Aislada	+0.73	-0.89	+0.06
	Adsorbida	+0.77	-0.87	+0.12

6.5 Detección y discriminación de HNO/NO utilizando el electrodo de oro modificado con Co(P)

Como se ha mencionado en la introducción, el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un dispositivo que sea capaz de detectar y discriminar HNO de NO, usando una Co(P). Para lograr este objetivo, el ``electrodo Co(P)`` debe ser capaz de reaccionar con HNO, pero no con NO (o cualquier otra especie similar) y producir una respuesta electroquímica a la presencia de HNO. Alternativamente, un detector de NO selectivo debe reaccionar con NO, pero no con HNO. Dada la reactividad conocida en solución, que muestra que Co^{II}(P) reacciona rápido con NO, pero no con HNO, mientras que lo contrario se observa para Co^{III}(P), hemos probado ambas reacciones para los electrodos de oro modificados con Co(P). Las reacciones se controlaron electroquímicamente utilizando el mismo protocolo mencionado anteriormente. Por ejemplo, para analizar la reacción Co^{III}(P) con HNO (o NO), se realizó un voltagrama de Co(P) antes y después de la adición de un dador de HNO (o NO), como se muestra en la Figura 22A. Antes de la adición de SA, cuando la porfirina de cobalto es llevada electroquímicamente al estado +3 se observa la cupla Co^{III}/Co^{II} (línea azul, 0,4 V). Al añadir SA en las mismas condiciones (Co^{III}) da como resultado un desplazamiento del voltagrama correspondiente al esperado para $Co^{III}(P)NO^{-}$ (línea verde, 0,83V). Esto muestra claramente la reacción *in situ* de Co^{III}(P) con HNO. Para verificar que el cambio es debido a un efecto de superficie y que no se ve afectada por el electrolito soporte, la misma experiencia se realizó pero con $KClO_4$ 0,1 M, pH 6. A su vez, ya que la cupla redox observada fue seudo-reversible (línea verde en la figura 22A), los potenciales aparentes se midieron con más cuidado por técnicas DPV (Figura 22B), obteniéndose claramente el potencial esperado para la cupla $Co^{III}(P)NO^{-}$.

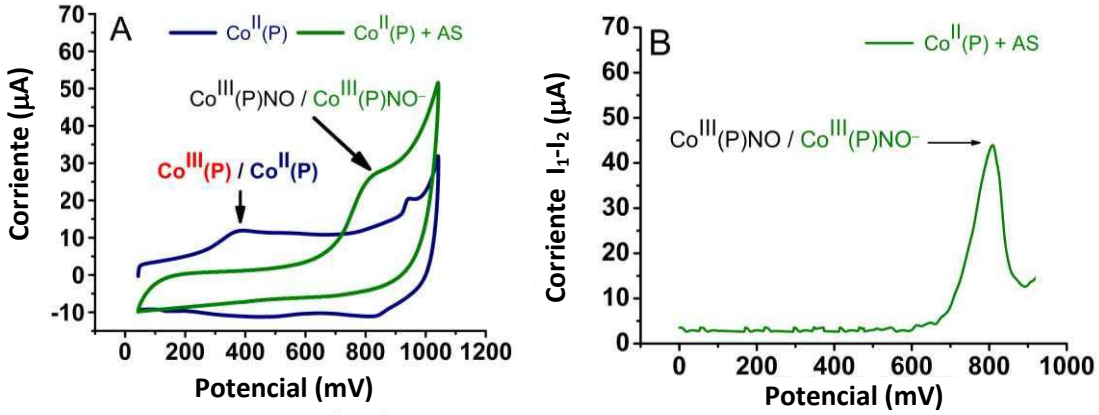


Figura 22. Reacción *in situ* de HNO con Co^{III} (P) adsorbida, los valores de los potenciales están referenciados a SCE, velocidad de barrido 0,1 V/s. A) Voltagramas cíclicos de Co^{III}(P) antes (línea azul) y después (línea verde) de la adición de SA 0,7 mM en 0,1 M KNO_3 (solución acuosa) B) DPV de Co^{III}(P) después de la adición de SA 0,7 mM en 0,1 M $KClO_4$ (solución acuosa). Amplitud: 30 mV, ancho: 25 ms y período: 40 ms del pulso.

Utilizando procedimientos similares, se estudiaron el resto de las reacciones (enumeradas a continuación). Como era de esperar los resultados muestran que Co^{III}(P) reacciona eficazmente con HNO, mientras que no lo hace así con dadores de NO o NO gas. Esto se evidencia por la falta de la señal electroquímica (intensidad de corriente) cuando la porfirina se mantiene en el estado de Co^{III}, a un potencial compatible con la cupla Co^{III}(P)NO/Co^{III}(P)NO^{-} (alrededor de 0,8 V) y la intensidad de corriente se mide después de añadir los dadores de NO. Por otra parte el NO reacciona rápidamente con electrodos modificados en el estado Co^{II}, mientras que HNO no lo hace. Es decir, la cupla Co^{III}(P)NO/Co^{III}(P)NO^{-} se observa después de la adición de dadores de NO al electrodo unido a Co(P) mantenido en el estado Co^{II}(P), mientras que no se observa ningún cambio cuando se usan dadores de HNO. El comportamiento resultante de los electrodos modificados se puede resumir de la siguiente manera (Esquema 13):

$$Co^{II}(P) + NO \longrightarrow Co^{III}(P)NO^{-}$$
$$Co^{II}(P) + HNO \longrightarrow \text{No hay reacción}$$
$$Co^{III}(P) + HNO \longrightarrow Co^{III}(P)NO^{-}$$
$$Co^{III}(P) + NO \longrightarrow \text{No hay reacción}$$

Esquema 13 – Comportamiento de los electrodos frente a dadores de HNO y NO

El NO es capaz de reaccionar con electrodos de oro limpios dando señal en 0,8 V, este hecho es una cuestión muy importante para la detección selectiva de HNO en presencia de óxido nítrico. Por lo tanto, fue necesario evitar esta reacción como una posible fuente de señal espuria. Para estudiar la respuesta de NO en los electrodos modificados con Co(P) se midió la intensidad de corriente producidas por una solución 3 μM de óxido nítrico en: (a) electrodos de oro limpios (curva verde en la Figura 23), (B) ``Electrodos Co(P)`` (curva de color rojo en la Figura. 23), y (c) Electrodos de oro modificados ``Co(P) + cistamina``

(curva de negro en la Figura 23). El NO se produjo por el uso de N-nitrosomelatonina y flash de luz.[154,155] La cantidad de óxido nítrico producido por cada destello se midió por espectroscopia UV-Vis. La señal se registró fijando el potencial a 0,8 V (vs SCE) y midiendo la intensidad de corriente en función del tiempo después de la adición de NO.

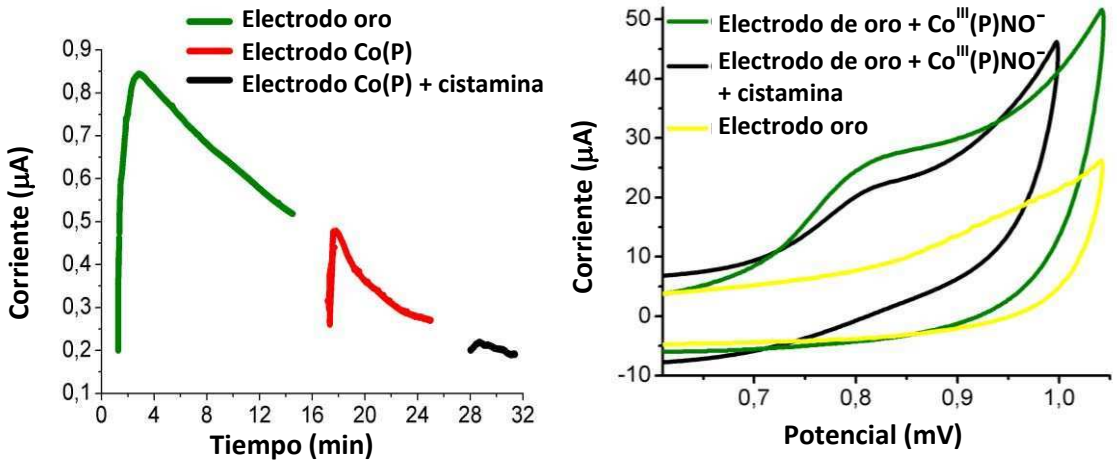


Figura 23. A) Intensidad de corriente obtenida en presencia de 3 μM de NO en solución, con electrodos de oro (verde) en los electrodos de oro (verde), ``electrodo Co(P)`` (rojo), y ``electrodo Co(P) + cistamina`` (negro). La señal se registró fijando el potencial a 0,8 V vs SCE. B) Voltagramas cíclicos de electrodos de oro (línea amarilla), electrodos unidos a $Co^{III}(P)NO^{-}$ (línea verde) y unidos a ``$Co^{III}(P)NO^{-}$ + cistamina`` (línea negra)

Como se muestra en la Figura 23A, se observa una intensidad de corriente considerable debido a la presencia de una solución 3 μM de NO cuando se usan electrodos de oro limpios como electrodos de trabajo. La porfirina Co(P) bloquea parcialmente la señal (la señal restante es ca. 50% con respecto al electrodo de oro), aunque debido a la cobertura del 25% de la superficie de oro por la Co(P), la señal sigue siendo significativa. Para bloquear completamente la señal procedente de la interacción directa del NO con los sitios de oro, los electrodos de Co(P) fueron modificados posteriormente con cistamina (en la seccion 8.2 también se protegieron con tioles de 6 y 10 carbonos). Como era de esperarse, para estos electrodos la intensidad de corriente se redujo a menos del 5% de la señal original, lo que demuestra que la reacción de NO con el electrodo modificado está casi completamente bloqueada. Finalmente, se verificó que la cistamina no interfiere con la señal electroquímica de $Co^{III}(P)NO^{-}$, como se muestra en la Figura 23B. Para analizar este

efecto, se realizaron voltagramas cíclicos de electrodos de oro unidos a $Co^{III}(P)NO^{-}$ (curva verde) y ``$Co^{III}(P)NO^{-}$ + cistamina`` (curva de negra). Los datos muestran que el efecto de la cobertura con cistamina no afecta significativamente a la señal electroquímica de la Co(P) y sus reacciones con HNO/NO.

En resumen

En esta sección se mostró el desarrollo de un sensor selectivo de HNO y su caracterización desde el punto de vista fisicoquímico a través de distintas técnicas (Uv-Vis, electroquímica, STM, XPS, DFT). Después de varias pruebas preliminares en solución se seleccionó la porfirina de cobalto(II) 5,10,15,20-tetraquis[3-(p-acetiltiopropoxi)fenil] [Co(P)], la cual se puede inmovilizar covalentemente en electrodos de oro. El mismo mostró una buena selectividad hacia azanona, siendo capaz de formar aductos estables $Co^{III}(P)NO^{-}$ a través de la reacción de Co^{III} con dadores de HNO (Figura 24). La superficie restante se cubrió con cistamina ($HSCH_2CH_2NH_2$), haciéndolo totalmente inerte a NO. Los resultados de este capitulo muestran que la Co(P) se coloca sobre la superficie de oro en configuración horizontal y se observa un efecto de superficie que disminuye el potencial redox de $Co^{III}(P)$ (pero no $Co^{III}(P)NO^{-}$) en 0,4 V. Usando esta información y fijando el potencial a valores que oxidan $Co^{III}(P)NO^{-}$ (0,8 V vs SCE), el HNO pueden ser detectado por técnicas amperométricas. En estas condiciones la Co(P) reacciona con HNO de una manera rápida, eficiente y selectiva con la formación simultanea del complejo $Co^{III}(P)NO^{-}$, mientras que es inerte o reacciona muy lentamente con NO.

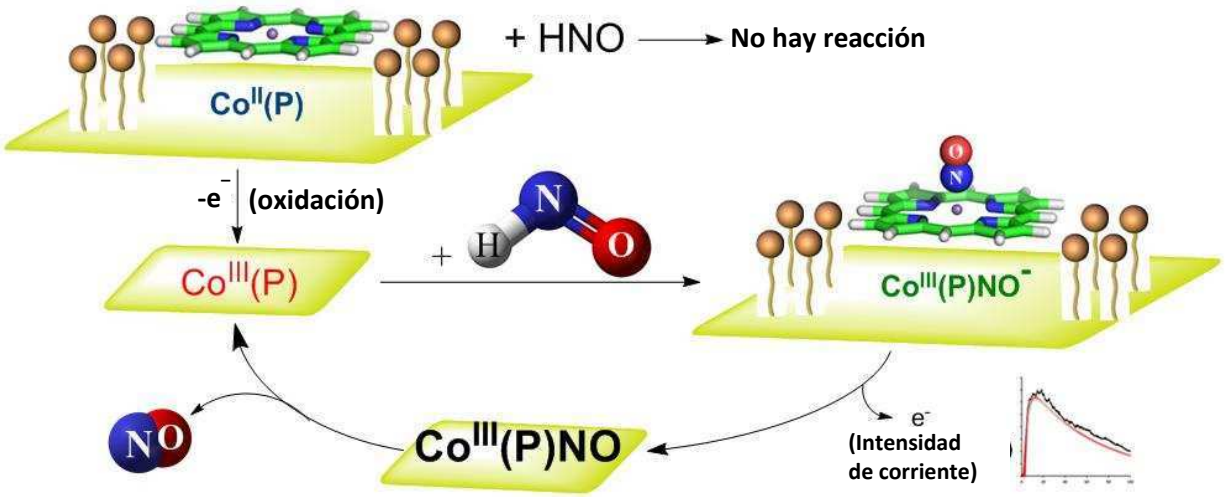
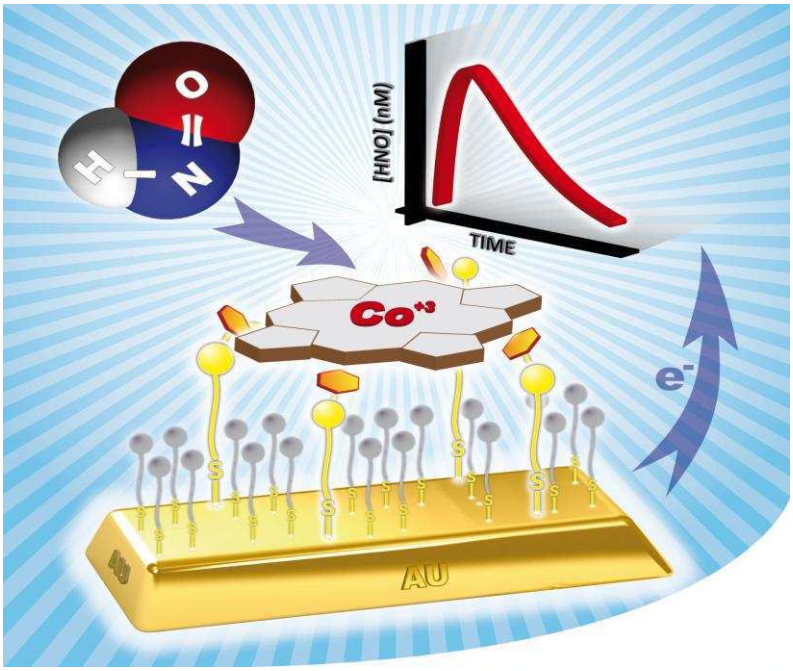


Figura 24. Mecanismo de detección electroquímica de HNO con Co(P) unida covalentemente a una superficie de oro.

7. Detección y cuantificación *en tiempo real* de HNO utilizando el sensor amperométrico



Durante los últimos años se han desarrollado varios métodos para la detección de HNO, que se basan en reacciones químicas seguidos por espectrometría de masas, caracterización por HPLC y metodologías de atrapado basados en UV-Vis o fluorescencia. En esta sección el electrodo desarrollado para la detección de HNO, basado en la unión covalente de [Co(P)] a un electrodo de oro, se ha caracterizado a fondo en términos de sensibilidad, exactitud, detección resuelta en el tiempo y compatibilidad con medios biológicos complejos.

7.1 Análisis cinético de la respuesta resuelta en el tiempo del electrodo para HNO

En la sección 6, se demostró que en la generación de azanona en solución usando SA como dador, se puede obtener una respuesta eléctrica dependiente del tiempo. En esta parte, se logró registrar el cambio en la intensidad de corriente y relacionar su valor a la presencia de HNO en solución. Los gráficos de intensidad de corriente en función del tiempo (que se presentan en la Figura 25A) muestran que unos segundos después de la adición de SA se observa un fuerte incremento en la señal, y que la máxima variación de la señal amperométrica (ΔC) es mayor a medida que las concentraciones de dador aumentan. En todos los casos se alcanza un valor máximo y, posteriormente, la señal decae lentamente en

la misma escala de tiempo que la descomposición de dador. El aumento proporcional de ΔC para concentraciones crecientes de SA, la forma de la caída de la señal y la escala de tiempo, sugieren fuertemente que el electrodo de Co(P) está sensando [HNO] de una manera resuelta en el tiempo. Por lo tanto, se analizó la forma del gráfico mediante un modelo cinético, y se trató de determinar si es posible extraer información cinética importante del correspondiente proceso de producción de azanona.

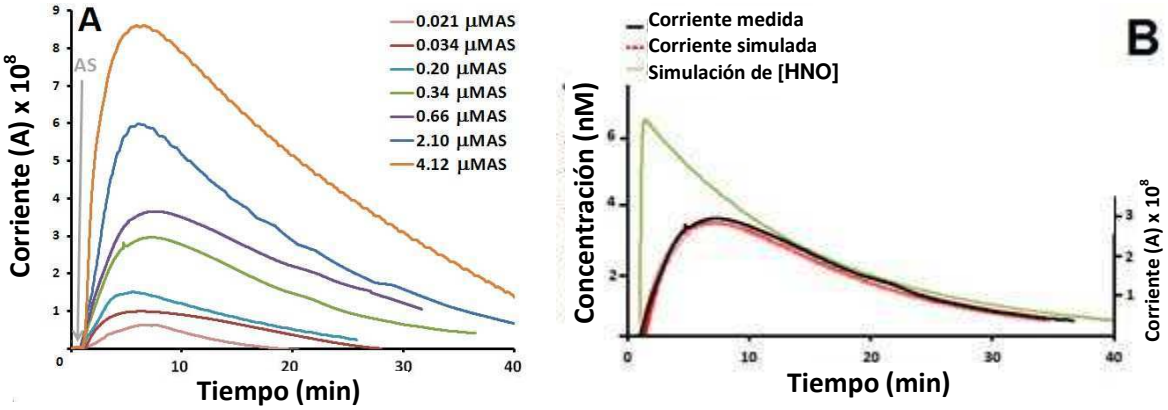
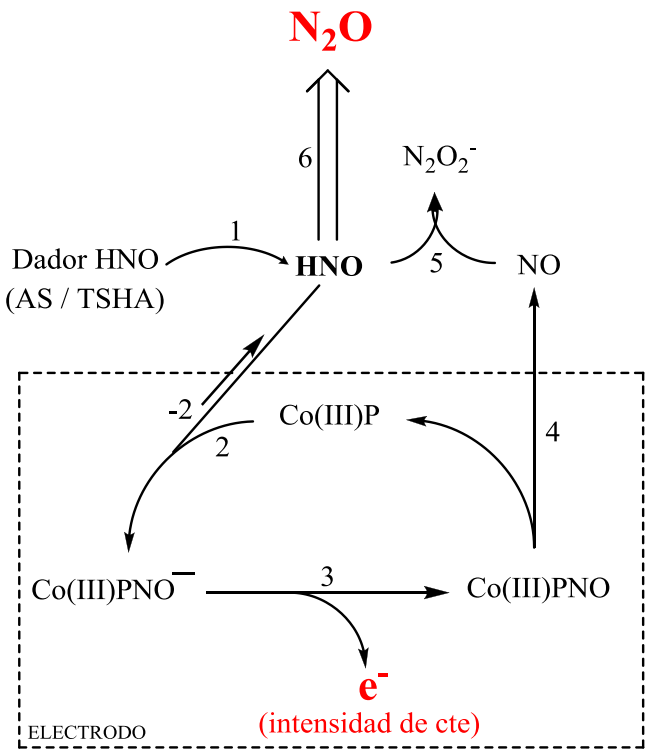


Figura 25 – A) Intensidad de corriente vs. tiempo para el electrodo modificado Co(P) después de la adición creciente de la concentración inicial de dador de HNO ($[AS]_0$). Cada curva corresponde a una $[AS]_0$ diferente y el tiempo de adición se indica mediante la flecha. B) Medición y simulación de la corriente vs t (negro y rojo, respectivamente, eje derecho) y simulación de [HNO] a la misma concentración de dador (0,34 µM, verde, eje de la izquierda). Se observa un ligero retraso en la señal.

7.1.1 Modelo cinético de la respuesta de Co(P) a SA.

Vamos a utilizar como punto de partida en nuestro análisis cinético, la señal producida por el HNO producto de la descomposición de SA, mostrada anteriormente. El mínimo modelo cinético del mecanismo de reacción (descripto en el Esquema 14), comprende la descomposición espontánea del dador con el fin de generar HNO (Reacción 1), que puede dimerizar a N_2O (Reacción 6) o reaccionar con el electrodo por coordinación a la porfirina Co(III)P (Reacción 2) unida covalentemente. El complejo resultante Co(III)PNO^- se oxida en el electrodo, lo que genera la corriente eléctrica medida y Co(III)PNO (reacción 3). En este complejo el enlace Co-NO es lábil y se libera NO rápidamente, regenerando la porfirina libre (Reacción 4). Por último, el NO también puede

reaccionar con HNO (Reacción 5). Para las reacciones 1, 2, 5 y 6, se conocen las correspondientes constantes cinéticas de velocidad (véase la Tabla 6). La liberación de HNO/NO^- y NO de la Co(P) (reacciones -2 y 4) no se conocen para esta porfirina de cobalto. Sin embargo, pueden ser razonablemente aproximadas para las mismas reacciones con otras porfirinas de Co conocidas en la literatura, que adoptan valores ca.10^{-3} s^{-1}.



d([Dador HNO])/dt = - k_{desc}.[DadorHNO]
d(HNO)/dt = k_{desc}.[DadorHNO] - 2(k_{dim}.[HNO]^2) - k_{on}.[HNO].[Co(III)] + $k_{off.}$[Co(III)NO$^-$] - k_{NO_HNO}.[NO].[HNO]
d(N_2O)/dt = k_{dim}[HNO]^2
d(NO)/dt = k_{OFF_NO}.[Co(III)NO] - $k_{NO_HNO.}$[NO].[HNO]
d(N_2O_2)/dt = k_{NO_HNO}.[NO].[HNO]
d([Co(III)NO$^-$])/dt = k_{on}.[HNO].[Co(III)] -(k_{off}.[Co(III)NO$^-$] - k_{ox}.[Co(III)NO$^-$]
d([Co(III)NO])/dt = k_{ox}.[Co(III)NO$^-$] - $k_{OFF\ NO}$.[Co(III)NO]

Esquema 14 – Mecanismo de reacción para el análisis cinético de la respuesta del electrodo frente a una fuente de HNO (en este caso el dador Sal de Angeli).

Tabla 6. Reacciones cinéticas utilizadas para modelar la respuesta electroquímica de SA.

#	Reacción	Constante		
1	Sal de Angeli → HNO	0.0023 s^{-1}	(k_{dec})	63,123,140
2	$Co(III)P + HNO \leftrightarrow Co(III)PNO^{-} + H^{+}$	3 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$	(k_{on})	116,123
-2		3.5 x 10^{-3} s^{-1}	(k_{off})	Esta tesis
3	$Co(III)PNO^{-} \rightarrow Co(III)PNO + e^{-}$	5.4 x 10^{-4} s^{-1}	(k_{ox})	Esta tesis
4	$Co(III)PNO \rightarrow Co(III)P + NO$	5.2 x 10^{-3} s^{-1}	(k_{off_NO})	116
5	$HNO + NO \rightarrow N_2O_2^{-} + H^{+}$	5.8 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$	(k_{NO_HNO})	72
6	$2HNO \rightarrow N_2O + H_2O$	8 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$	(k_{dim})	13,63,190

En este contexto, la reacción clave a caracterizar y relacionar con la concentración de HNO en el seno de la solución es la número 3, y para analizarla utilizaremos el modelo de Nerst. Cerca de la superficie del electrodo, se establece una capa delgada, donde la velocidad de flujo es esencialmente cero. El transporte de masa se lleva a cabo por difusión y por lo tanto solo se requiere un flujo continuo para mantener las concentraciones en la superficie según la ecuación de Nernst. La convección mantiene un suministro constante de HNO en el borde exterior de la capa de difusión, que es proporcional a la concentración de nitroxilo en el seno de la solución. La corriente observada por lo tanto dependerá de la velocidad de difusión de HNO, del espesor de la capa de difusión y de las concentraciones de HNO en la superficie del electrodo y en el seno de la solución. Suponiendo que Co(P) está unida al electrodo y que la reacción de HNO con la porfirina es muy rápida (se espera k_{on} en el orden de 10^4 $M^{-1}s^{-1}$) para una capa delgada, y dado que la concentración de HNO en el electrodo se aproxima a cero (ya que se une y se consume por el Co(P)), la intensidad de la corriente resultante (i) es directamente proporcional a la concentración de azanona en el seno de la solución [HNO], según la ecuación 7:

$$i_I = \frac{n.F.A.D_{HNO}}{\delta} C_{HNO} = k_{eHNO} C_{HNO} \quad (7)$$

donde, n es el número de electrones por mol de HNO, F es la constante de Faraday, A es el área superficial del electrodo (cm^2), D_{HNO} es el coeficiente de difusión para azanona y δ, el espesor de la capa de difusión. Como $n.F.A.D_{HNO}$ y δ son constantes para la arquitectura del sistema, se agrupan como una constante efectiva, k_{eHNO}. Es importante tener en cuenta que, si bien este modelo se basa en una imagen simplificada de la capa de difusión, no

obstante proporciona una aproximación razonable de la relación entre la corriente y las variables que la afectan, en este caso la concentración de HNO en la solución (ver más abajo).

Resolviendo numéricamente el conjunto de ecuaciones diferenciales (utilizando el Matlab 2009) que se describen en el esquema de reacción 14, y utilizando los valores de la Tabla 6, se obtiene un muy buen ajuste de la intensidad de corriente en función del tiempo (Figura 25B). Para hacer una prueba más rigurosa del modelo, se realizó el mismo análisis para todas las concentraciones de dador medido. En todos los casos hay un excelente ajuste entre la intensidad de corriente observada observada y calculada en función del tiempo, el grafico de ΔC simulada vs ΔC experimental (Figura 26A) muestra la relación lineal esperada con pendiente 0.9977, en todo el rango probado (R^2 = 0,9973). Por último, después de resolver el conjunto de ecuaciones, puede analizarse la forma de dicha traza (utilizando el Matlab 2009). Como se muestra en las Figuras 25B y 26B) el rápido aumento de la señal refleja que la concentración (simulada) inicial de HNO es máxima (producida por la descomposición de SA) en el pH de trabajo y su retardo en el tiempo está relacionado con la difusión a la superficie del electrodo a través de la capa de difusión de Nernst, más el tiempo involucrado en la formación del complejo [Co(III)NO^-]. El decaimiento exponencial refleja la caída de [HNO] en el bulk, como consecuencia de la disminución exponencial de la concentración de SA (su vida media en las mismas condiciones es ca.15 min y sigue una cinética de primer orden similar a la señal observada). ***En resumen, la señal del electrodo refleja la concentración real de azanona de una manera resuelta en el tiempo permitiendo de este modo realizar mediciones cinéticas de producción/consumo de HNO.***

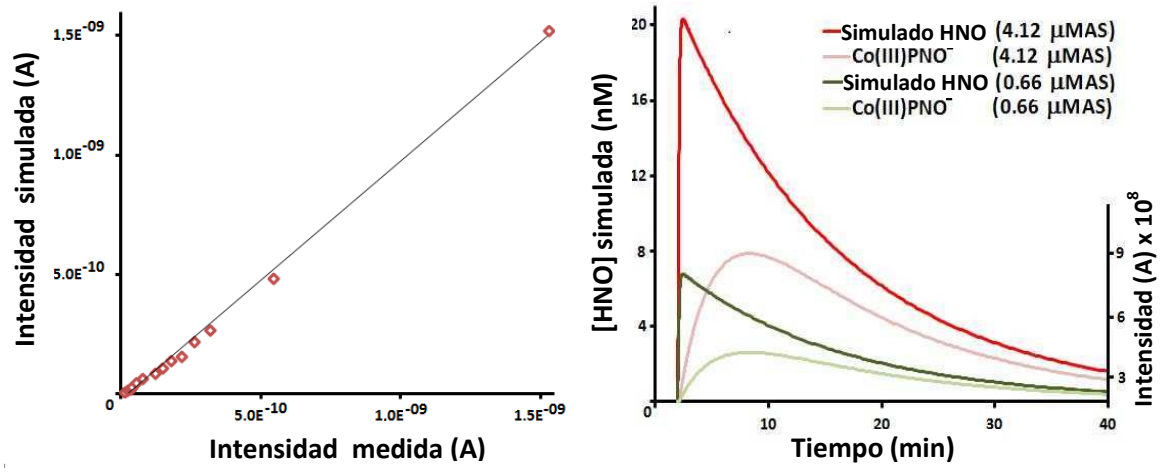


Figura 26 – A) Corriente medida vs simulada en I_{MAX} (350 seg). B) Intensidad de corriente medida de Co(III)PNO^{-} vs t (eje derecho) y [HNO] simulada vs t (eje izquierdo) a dos concentraciones de dador diferente (0,66 y 4,12 µM). Se observa un ligero retraso en la señal.

7.1.2 Uso de la señal resuelta en el tiempo del electrodo Co(P) para determinar parámetros cinéticos de reacciones relacionadas con HNO.

Para analizar y validar la performance del electrodo (utilizando el conjunto de las ecuaciones diferenciales asociadas y las constantes de velocidad obtenidas) como un método para determinar constantes de velocidad desconocidas asociadas a reacciones que involucren HNO, se midió la respuesta del electrodo a una solución de concentración conocida de TSHA (otro dador de HNO). La traza resultante (que se muestra en la Figura 27) fue analizada con el conjunto de ecuaciones descripto anteriormente, y dejando libre en el modelo (para así determinarla) la velocidad de descomposición del TSHA. El valor obtenido de 5.5×10^{-4} s^{-1} a 25 ºC, se encuentra en excelente acuerdo con el valor reportado de 4.4×10^{-4} s^{-1} medido por espectroscopia UV-Vis, demostrando que el electrodo de Co(P) y el modelo de cinético asociado es apropiado para analizar cinéticamente reacciones que involucren HNO.

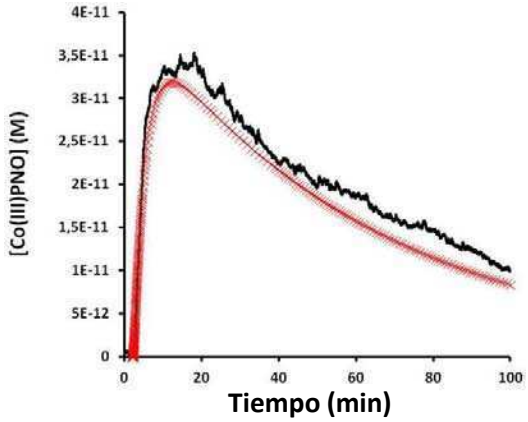


Figura 27 -Respuesta del electrodo a una solución 3,4 μM TSHA (negro) y simulada (rojo)

7.2 Determinación del rango dinámico de la detección cuantitativa amperométrica de azanona (HNO) usando el electrodo de Co(P).

En una siguiente etapa, se estudió la determinación del rango dinámico (es decir, el intervalo de concentraciones de HNO en el bulk) que el electrodo es capaz de detectar en forma cuantitativa. Para ello, primero se calibró la respuesta del mismo (ΔC) con [HNO] conocidas en solución. Es importante saber que, debido a su propiedad intrínseca reactiva, la precisa determinación de las concentraciones de azanona no es una tarea fácil, por lo tanto se utilizaron dos enfoques diferentes para determinarla.

1) Estimación de HNO

a) En primer lugar, y como se mostró anteriormente en varios trabajos de nuestro grupo[41,123,124] y otros,[71,138] puede estimarse la [HNO] como resultado del rápido equilibrio establecido entre la producción continua de azanona (por la descomposición espontánea del dador) y su dimerización. Se consigue así una concentración de nitroxilo instantánea en estado cuasiestacionario, que posteriormente disminuye lentamente según se consume el dador. Además, dado que la dimerización es de segundo orden en [HNO], a mayor la concentración de HNO más rápido dimeriza lo que resulta en una relación cuadrática inversa entre el dador y la concentración inicial de azanona, que puede ser aproximada por la ecuación 8, como se muestra a continuación:

$$[HNO] = \sqrt{\frac{k_d [Donor]}{2k_h}} \quad (8)$$

Donde k_d es la constante de velocidad de primer orden de la descomposición del dador y k_H es la constante de velocidad bimolecular de dimerización de HNO. Una consecuencia directa de esta relación, es que no pueden ser alcanzadas altas concentraciones de azanona con dadores relativamente lentos, como la SA. Se evidencia claramente en la Figura 28, donde el ΔC_{max} medido se representa frente a la concentración inicial de SA, la relación cuadrática inversa descripta anteriormente entre el dador y la [HNO] y el límite superior alcanzado para la concentración de nitroxilo para valores del orden μM.

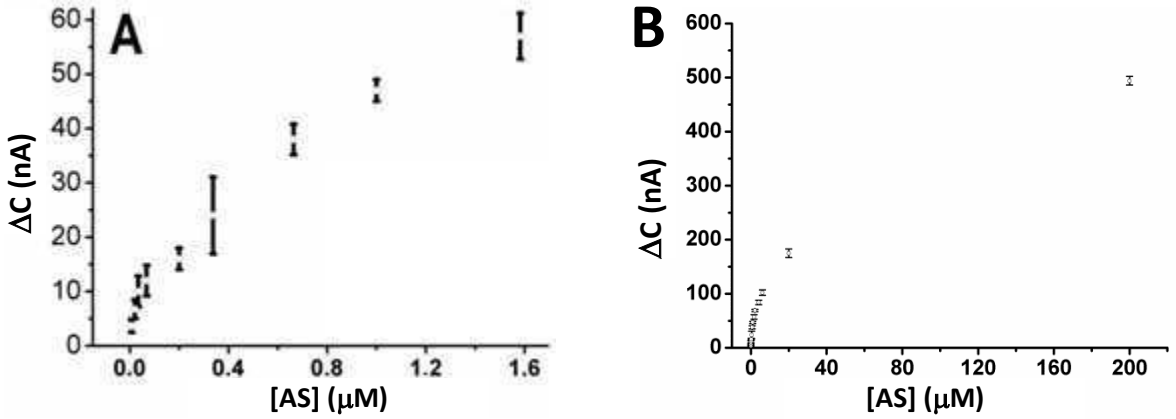


Figura 28 – A) Intensidad de señal ΔC (nA) detectada por electrodos de oro modificados Co(P) como función de la concentración de SA (rango: 0-1,6 μM). B) Rango 0-200 μM.

b) Puede tenerse una estimación más precisa de [HNO], para eso se lo calculó usando el esquema cinético descripto anteriormente. La curva de calibración resultante ΔC vs [HNO] estimada, que se muestra en los puntos negros en la Figura 29, muestra una excelente respuesta lineal (R^2 = 0,9899) en el rango de 1-150 nM, y es capaz de detectar concentraciones de HNO tan pequeñas como 0,7 nM. La diferencia entre la estimación de la concentración de azanona mediante el uso de la ecuación 8 y del esquema cinético, es que con la ecuación 8 se obtienen [HNO] ligeramente más altas para una determinada concentración de dador. La diferencia con el modelo cinético aumenta a concentraciones crecientes del mismo (datos no mostrados). Sin embargo, cabe resaltar que el uso de la ecuación 8 es muy simple y a grandes rasgos da una muy buena idea del valor de la [HNO].

2) Determinación experimental de [HNO]

La concentración de azanona tambien se puede determinar experimentalmente mediante su atrapamiento con una porfirina, cuya constante de reacción con nitroxilo es conocida,

como la Mn(III)TSPP en medios anaeróbicos, como se informó anteriormente por Schoenfisch *et. al*.[134] En este método la [HNO] se determina a partir de la relación entre la velocidad observada de la producción de nitrosil-porfirina (dMn(II)(NO)TSPP/dt) y la correspondiente constante de velocidad bimolecular (k_{on}) para la reacción de asociación, de acuerdo con la Ecuación 12 (ver apartado página 90). Por lo tanto, con el fin de determinar la [HNO] para cada concentración de SA utilizada para obtener los valores reportados en la Figura 29 (puntos rojos), se mide la velocidad de producción de Mn(II)(NO)TSPP, para cada concentración de dador, utilizando espectroscopía UV-Vis.

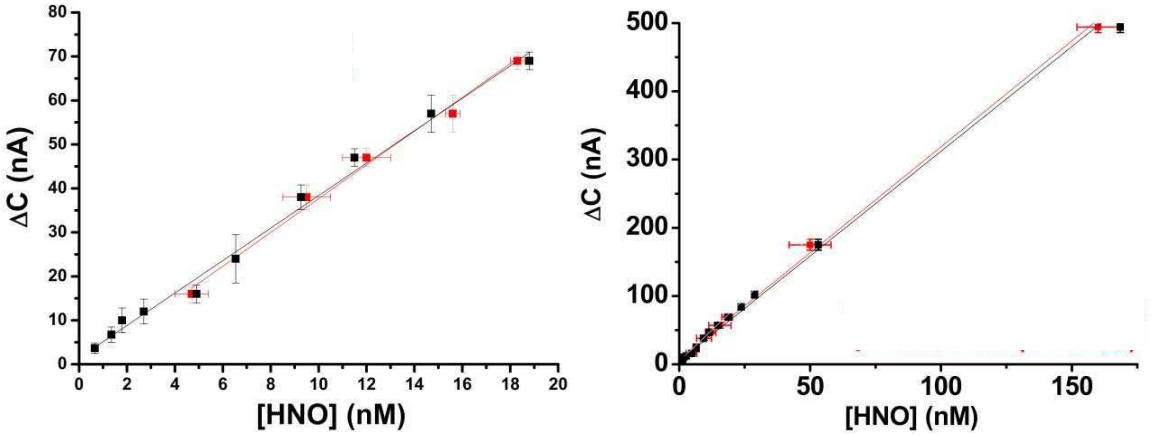


Figura 29 - A) Los puntos rojos muestran la calibración de la intensidad de corriente mediante el método de Schoenfisch *et. al.* a través eq. 12. Debido a las limitaciones instrumentales (intensidad de la banda Soret) [HNO] no se puede medir con este método por debajo de 4 nM. Los puntos negros muestran la calibración de la intensidad de corriente mediante el cálculo de [HNO] a través de la simulación que se ha descripto anteriormente. En el rango de [HNO] es ca. 1-20 nm. B) [HNO] en el rango de ca. 1-150 nm. Tener en cuenta que ambas son prácticamente lineales, incluso a las concentraciones más altas de HNO.

La Figura 29 muestra muy bien que los valores de [HNO] obtenidos mediante el uso de la simulación cinética son muy parecidos a los determinados experimentalmente. También es importante tener en cuenta que debido a las limitaciones en la señal de UV-Vis para medir la velocidad de formación de nitrosil-porfirina, el método químico no se puede utilizar para valores de SA por debajo de 0,2 μM (correspondiente a una concentración de HNO de aproximadamente 5 nM). En resumen, independientemente del método utilizado para determinar o estimar la concentración de azanona en los sistemas de reacción, los

resultados de la Figura 29 muestran claramente que ***mediante el uso del electrodo de Co(P), HNO puede ser fiable y cuantitativamente determinado en concentraciones de orden nanomolar*** (menor a 1 nM). Asi también, muestra una respuesta lineal a [HNO] en el rango de 1 a 1000 nM.

Por último, después de haber realizado el análisis de la forma de la señal y la curva de calibración que relaciona la señal electroquímica con la concentración de HNO, se puede determinar cuánto de la azanona en solución está reaccionando efectivamente con el electrodo (y por lo tanto también determina la cantidad de NO que se libera como producto secundario). El área bajo la curva del grafico de corriente en función del tiempo para un intervalo de tiempo dado, permite la determinación del número real de moléculas de HNO que se reducen a NO por el electrodo Co(P) . Las simulaciones cinéticas muestran que el turnover de Co(P) es ca. 10 milisegundos. Teniendo en cuenta este intervalo de tiempo, para una concentración inicial de SA 340 nM, la intensidad máxima se corresponde con 2,5 x 10^{-13} moles de Co(P) unido y HNO oxidado. En este sistema (volumen total = 5 ml) el [HNO] bulk, corresponde a un valor máximo de 3.3 x 10^{-11} moles de HNO libre en solución. Por lo tanto ***el electrodo de Co(P) está reaccionando con menos del 1 % de las moléculas de HNO disponibles***. El mismo tipo de análisis nos permite determinar qué tan lejos de la saturación (cuando todas las moléculas de porfirina están unidas a HNO), está el electrodo de Co(P). En la sección anterior, se determinó que cada electrodo se cubre con una concentración superficial de 4.3 x 10^{-12} mol/cm^2.[126] Por lo tanto un electrodo que tiene una superficie total de 1,4 cm^2 podría reaccionar con una concentración de azanona mayor a 5 μM, que está muy por encima de la curva de calibración determinada.

<u>Apartado:</u> determinación cinética de las concentraciones de HNO en solución (derivado de SA) utilizando una porfirina de Mn como atrapante

Para obtener la concentración de HNO se consideraron las siguientes reacciones:

$$\frac{\partial[AS]}{\partial t} = \boldsymbol{k_1}[\mathbf{AS}] \qquad (9)$$

$$\frac{\partial[Mn(II)(NO)TSPP]}{\partial t} = \boldsymbol{k_{on}}[\mathbf{HNO}][\mathbf{Mn(III)}\boldsymbol{TSPP}] \qquad (10)$$

$$\frac{\partial[N_2O]}{\partial t} = \boldsymbol{k_2}[\mathbf{HNO}]^{\mathbf{2}} \qquad (11)$$

Donde la reacción (9) representa la descomposición de los dadores caracterizado por la constante de velocidad de primer orden k_1, (10) la reacción de HNO con la

metaloporfirina (Mn(III)TSPP) caracterizada por la constante de velocidad k_{on}, y (11) representa la dimerización bimolecular de HNO caracterizada por el constante de velocidad k_2. La reacción (9) se consideró como una reacción irreversible debido a que su velocidad inversa es despreciable con respecto a la reacción (10) en la condición de velocidades iniciales. La reacción (11) es irreversible. La descomposición de los dadores obedece una cinética de primer orden, descripta por k_1 ($k_{1(AS)}$ = 8 x 10^{-4} s^{-1}), la reacción con la porfirina está caracterizada por k_{on} ($k_{on(HNO)}$ = 4 x 10^4 $M^{-1}s^{-1}$) mientras que la dimerización es una reacción de velocidad de segundo orden representada por k_2 (k_2 = 8 x 10^6 $M^{-1}s^{-1}$)

Por lo tanto, con el fin de cuantificar [HNO] por estudios cinéticos de la reacción con Mn(III)TSPP (como se ha descrito previamente por Schoenfisch *et. al.*) debe medirse la velocidad de formación de la porfirina nitrosilada. Luego, [HNO] se puede calcular de la ecuación 12 (obtenida de la ecuación 11) como se muestra a continuación:

$$[\mathbf{HNO}] = \frac{\partial[\boldsymbol{Mn(II)(NO)TSPP}]}{\partial t} / \boldsymbol{k_{on}}[\boldsymbol{Mn(III)TSPP}] \qquad (12)$$

7.3 Análisis de posibles señales espurias debido a interacciones de otras moléculas pequeñas con el electrodo de Co(P).

7.3.1 Respuesta del electrodo en presencia de oxígeno.

El oxígeno es un actor ubicuo en los medios fisiológicos y aunque los estudios en células y tejidos pueden llevarse a cabo en condiciones anaeróbicas, se probó la respuesta del electrodo en atmósfera de aire y se comparó con los resultados obtenidos anteriormente. El oxígeno reacciona lentamente con HNO, siendo la constante de velocidad bimolecular correspondiente ``pequeña`` k ≈10^3 $M^{-1}s^{-1}$,[72] debido a que la reacción implica cruce de spin. Sorprendentemente, el producto de reacción es todavía desconocido.[13] La Figura 30A presenta los valores de ΔC obtenidos para diferentes concentraciones iniciales de SA en medios anaeróbicos y aeróbicos. Una primera vista de la gráfica resultante muestra claramente que la respuesta del electrodo es notablemente inferior en presencia de oxígeno. En el caso de una concentración inicial de SA 1 μM, que corresponde a una [HNO] de ca. 10 nM en medios anaerobios, el oxígeno reduce el 90% de la azanona lo que resulta en una medición de aproximadamente 1 nM de HNO. Por lo tanto (como se esperaba), aunque ***el oxígeno reduzca la [HNO]***, el experimento demuestra que ***la azanona todavía puede ser***

detectada y cuantificada en presencia de altas concentraciones de oxígeno, tales como las que se encuentran en medios aeróbicos.

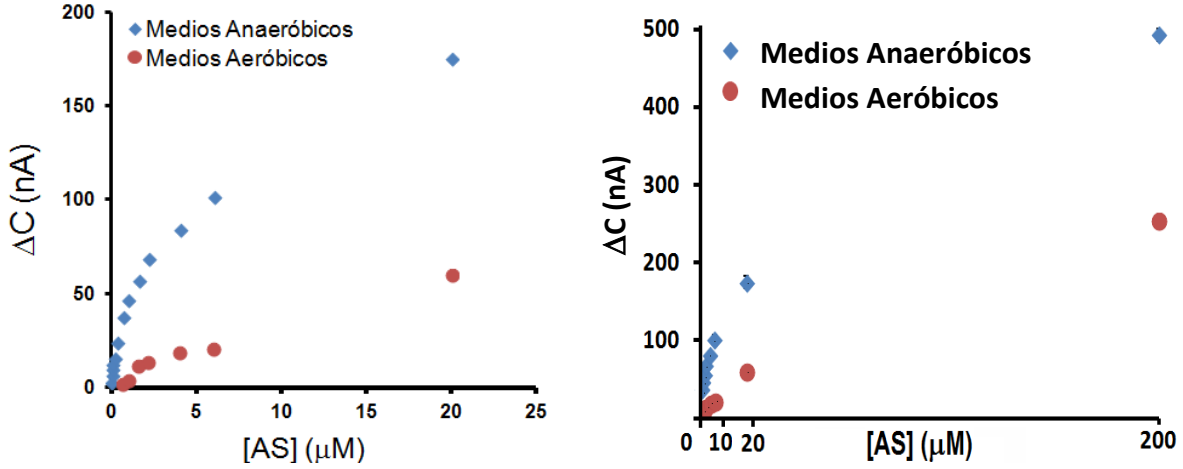


Figura 30 – A) Valores de ΔC obtenidos para diferentes concentraciones iniciales de SA (hasta 20 μM) en medios anaeróbicos (azul) y aeróbicos (rojo). B) Hasta 200 μM de SA

7.3.2 Respuesta del electrodo en la presencia de otras especies reactivas de nitrógeno y oxígeno biológicamente relevante (RNOS).

Además de oxígeno, otros RNOS biológicamente relevantes podrían interferir o reaccionar con el electrodo de Co(P), dando lugar a una señal espuria que podría enmascarar o disminuir la señal de HNO, o incluso peor, producir un falso positivo (es decir, un ΔC significativo en ausencia de HNO). Con el fin de analizar los posibles efectos sobre la señal de RNOS que se encuentran en medios fisiológicos comunes, se midió la respuesta del electrodo solo y modificado con Co(P), bajo varias condiciones. En primer, lugar se realizaron voltametrías cíclicas de un electrodo de oro en presencia de KNO_3 (como electrolito) en medios anaeróbicos y aeróbicos en presencia de las siguientes moléculas: $NaNO_2$ (0,1 M), H_2O_2 (0,1 M), NH_2OH (0,1 M), obteniendo el mismo voltamograma en todos los casos, correspondiente a la Co(P) depositada. Por otra parte, también se realizaron las mediciones con $KClO_4$ en lugar de KNO_3, obteniéndose los mismos resultados. Estos datos muestran que ninguna de las moléculas ensayadas produce una señal electroquímica apreciable, en el rango de trabajo del ``electrodo Co(P)``. En segundo lugar, se midió la respuesta del electrodo Co(P) (ΔC) a la adición de SA, tanto en los medios aeróbicos como anaeróbicos, en presencia de 0,1 M de cada uno de los mencionados RNOS. Es importante llevar a cabo las reacciones en medios aeróbicos, ya

que los RNOS probados pueden reaccionar con el oxígeno libre produciendo otros RNOS. Los resultados correspondientes, presentados en la Figura 31, muestran claramente que ΔC medido es completamente independiente de la presencia de cualquiera de los RNOS ensayadas (KNO_3, KNO_2, NH_2OH y H_2O_2), tanto en medio anaeróbico (izquierda) como aeróbico (centro y derecha).

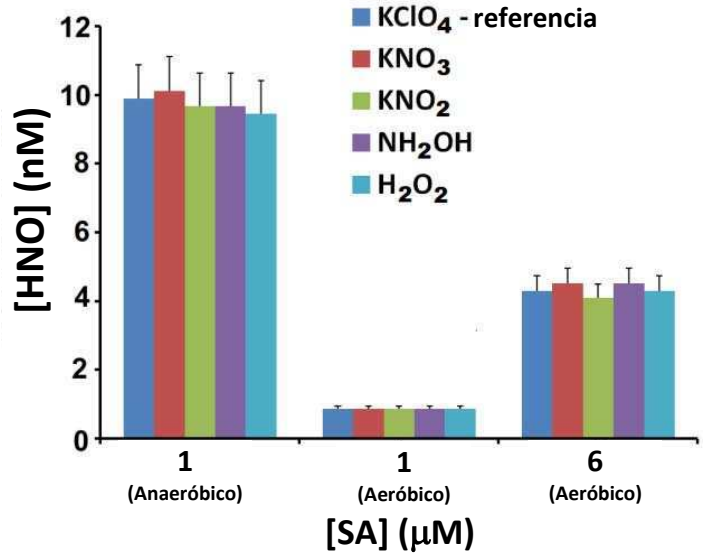


Figura 31 – Pico de [HNO] detectado por descomposición de SA en la presencia de cualquiera de los RNOS probados (KNO_3, KNO_2, NH_2OH o H_2O_2), en ambos medios, anaeróbico (izquierda) y aeróbico (central y derecho).

Además, el electrodo de Co(P) conserva la respuesta dependiente de la concentración de azanona. En resumen, ***el electrodo es selectivo para HNO mientras que otros oxoaniones de nitrógeno, NO,***[126] ***oxígeno, peróxido de hidrógeno y sus posibles productos de reacción no parecen interferir con la señal del electrodo, mostrando que el método de detección es robusto y confiable*** .

7.4 Prueba de la respuesta del electrodo de Co(P) en medios biológicos.

A continuación se evaluó la capacidad del electrodo modificado para funcionar en un verdadero medio biológico, como lo realizado previamente por Lippard y Yao.[136,191] Para ello, se utilizaron células de Xenopus melanophores crecidas en una placa. El electrodo de trabajo se ubica en contacto directo y cercano con las células embebidas en medios fisiológicos. En estas condiciones cuando el electrodo se establece en el potencial de

trabajo no se observa corriente significativa, lo que muestra que los medios biológicos no dan lugar a señal espuria. A continuación, se analizó la respuesta del electrodo en contacto con las células vivas tras la adición de cantidades variables de SA. También se midió la misma respuesta con el medio de cultivo solo (es decir, sin células) y, finalmente, después de realizar un lisado celular. Como en los casos anteriores, los experimentos se realizaron en medios anaeróbicos (a excepción de las células intactas) y aeróbicos. Los resultados se muestran en la Figura 32.

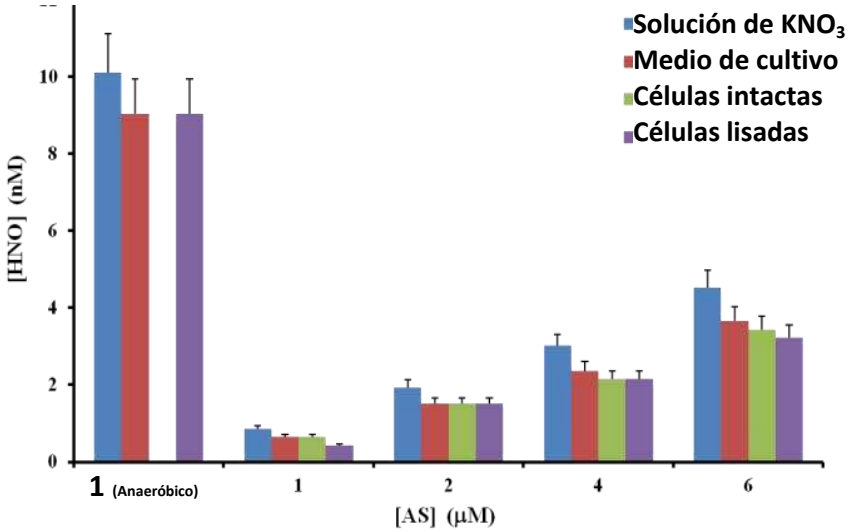


Figura 32 - [HNO] producido por la descomposición de SA en presencia de un cultivo célular de *Xenopus* melanophores. Los experimentos se realizaron bajo atmósfera de aire a menos que se indique lo contrario. Sólo las células lisadas se midieron anaeróbicamente

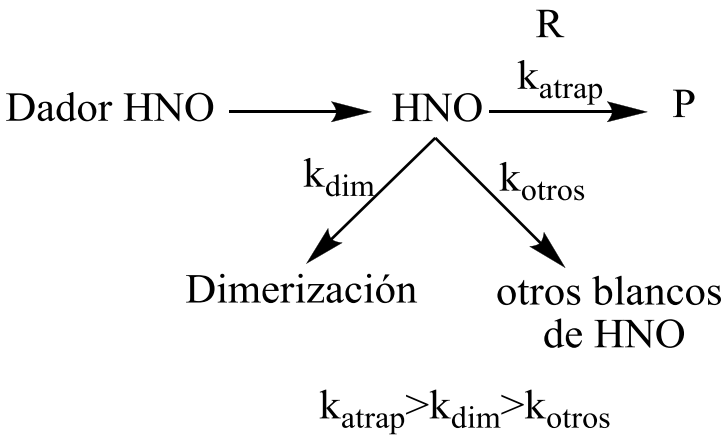
Los resultados de la Figura 32 muestran claramente que ***el electrodo de Co(P) es biológicamente compatible, siendo capaz de detectar y cuantificar HNO en medios biológicos, incluyendo células intactas o lisadas***, y en presencia de oxígeno. Es interesante observar que la señal se reduce ligeramente en el siguiente orden: solución de KNO_3> medios de cultivo libres de células > células intactas > células lisadas. La pequeña disminución de la señal es más evidente para las concentraciones más altas de HNO. Este resultado es completamente razonable ya que HNO es una molécula altamente reactiva, y es esperable que reaccione con otras moléculas presentes en el medio, disminuyendo de esta manera su concentración. La presencia de células, y más aún después de la lisis, seguramente resulta en un aumento de moléculas reactivas a HNO (hemo-proteínas, tioles, y otros). Estos experimentos muestran que el electrodo modificado todavía funciona en

presencia de las células y los contenidos celulares, aunque *aún no se ha demostrado que puede detectar HNO dentro de las mismas*. Por último, los resultados muestran que en un lisado celular en un ambiente aeróbico, HNO puede ser detectado en una concentración de hasta 10 nM.

En resumen:

En esta sección se realizó una caracterización (y análisis) del sensor de HNO desde el punto de vista analítico. Se comprobó que el electrodo puede ser usado para detectar de forma resuelta en el tiempo y cuantificar azanona en diversos medios (inclusive celulares), y en presencia de oxígeno.

Por otro lado, es un buen punto para analizar el principio de funcionamiento del método utilizado hasta aqui. Al ser la azanona una especie muy reactiva (con una velocidad de dimerización alta) optimizar la cuantificación de HNO es un reto. Dos metodologías diferentes han sido exploradas hasta este momento con el fin de cuantificarlo. El enfoque tradicional (Esquema 15) era usar una segunda molécula (R) que reacciona más rápido con HNO que consigo mismo, por lo tanto, en realidad lo "atrapa" conduciendo a un nuevo producto estable (P), que se identifica posteriormente y, si es posible, se cuantifica.



Esquema 15 - Atrapado de azanona y la competencia con otras reacciones.

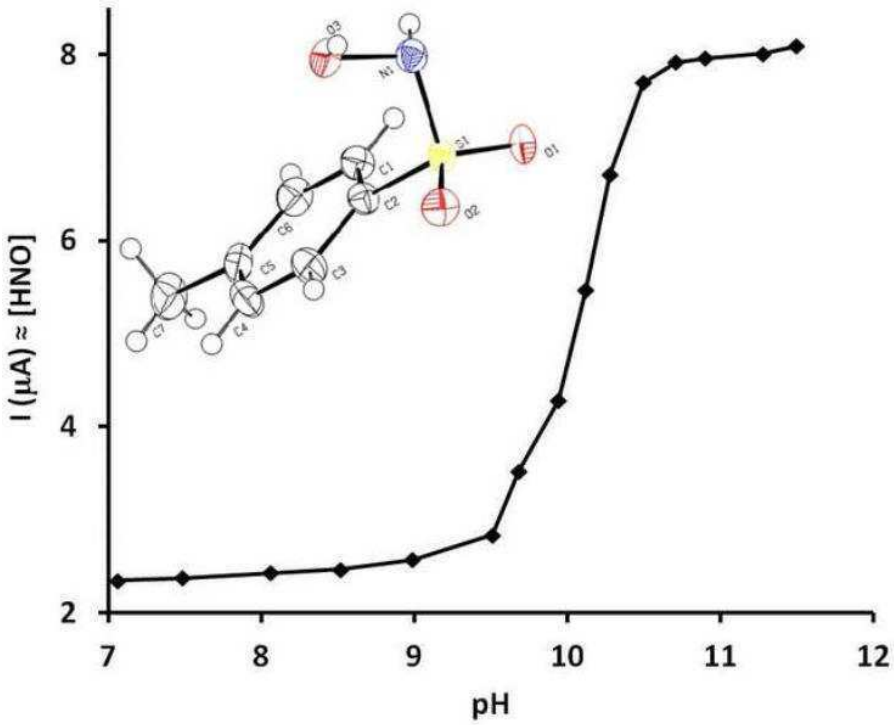
La ventaja de este tipo de enfoque es que hay varios reactivos diferentes que se pueden utilizar para atrapar específicamente HNO, y varias técnicas se pueden utilizar para medir [P]. Por otro lado, una de las desventajas es que la mayoría de las veces sólo se puede obtener el total (o una fracción del total) de la cantidad de HNO producido en una ventana de tiempo dado (durante el curso de la reacción de captura). Por otra parte, como el agente

R está por lo general en exceso en relación con la concentración de azanona se impide la cuantificación de HNO durante estas reacciones, ya que el agente de captura modifica significativa e inevitablemente (o interfiere) con la reacción estudiada. La mayoría de las técnicas de UV-Vis y por espectrometría de masas se basan en de alguna manera en este enfoque.

Por otro lado, el uso del electrodo ha permitido la detección en tiempo real, lo cual, a priori, es mucho más complicado, Hemos demostrado que es posible "detectar" una cantidad muy pequeña de azanona y, como la cantidad de HNO "consumido" por el sensor es insignificante, es posible obtener su concentración instantáneamente. Por lo tanto, seguir la señal eléctrica a todo momento proporciona un método para estudiar las reacciones en las que interviene HNO en tiempo real.

8. Reacciones en las cuales la azanona ha sido propuesta como intermediario

8.1 Dadores de HNO derivados del ácido de Piloty

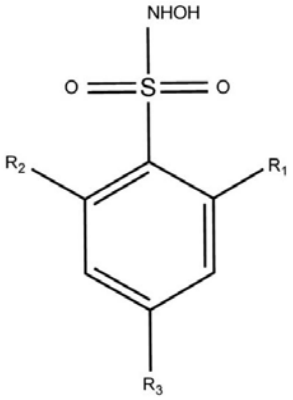


En esta sección, se utilizará el sensor de Co-porfirina diseñado y caracterizado anteriormente, para evaluar la liberación de HNO en función del pH de distintos dadores de azanona, por medición directa de la [HNO]. Se sintetizara un grupo de derivados del Ácido de Piloty (N-hidroxi bencenosulfonamida, AP), caracterizandolos completamente con el fin de evaluar la velocidad y el pH de donación de nitroxilo en medios acuosos. Los derivados, con sustituyentes dadores y atractores de electrones, incluyen metilo, nitro, fluoro, tri-isopropilo, trifluorometilo y grupos metoxi. Los resultados se contrastaran con cálculos DFT con el fin de comprender los efectos electrónicos ejercidos por los sustituyentes del anillo.

8.1.1 Medición de la descomposición como función del pH

Como se describió en la sección 1.5, el mecanismo aceptado para la descomposición espontánea para dar HNO de estos dadores, implica la deprotonation del grupo NHOH a NHO^{-}, por lo que el efecto del pH y del p*Ka* del compuesto son variables fundamentales a conocer.

La síntesis de los compuestos fue descripta en el Capítulo 2 – Materiales y Métodos.



	Abreviación	R_1	R_2	R_3
1	Me – AP (or TSHA)	H	H	Me
2	NO_2 – AP	H	H	NO_2
3	F – AP	H	H	F
4	TriIso - AP	IsoP	IsoP	IsoP
5	OMe – AP	H	H	OMe
6	(NO_2-CF_3) – AP	H	NO_2	CF_3

Con el fin de estudiar el efecto del pH sobre la descomposición de los mismos, se realizaron cinéticas (por UV-Vis o ^{1}H RMN durante 5 horas) para cada compuesto a diferentes valores de pH a 25 °C (véase la figura 33). Las velocidades de descomposición se ensayaron a diversos valores de pH en experimentos independientes, y se determinó el valor aproximado en el que se empezó a observar la misma.

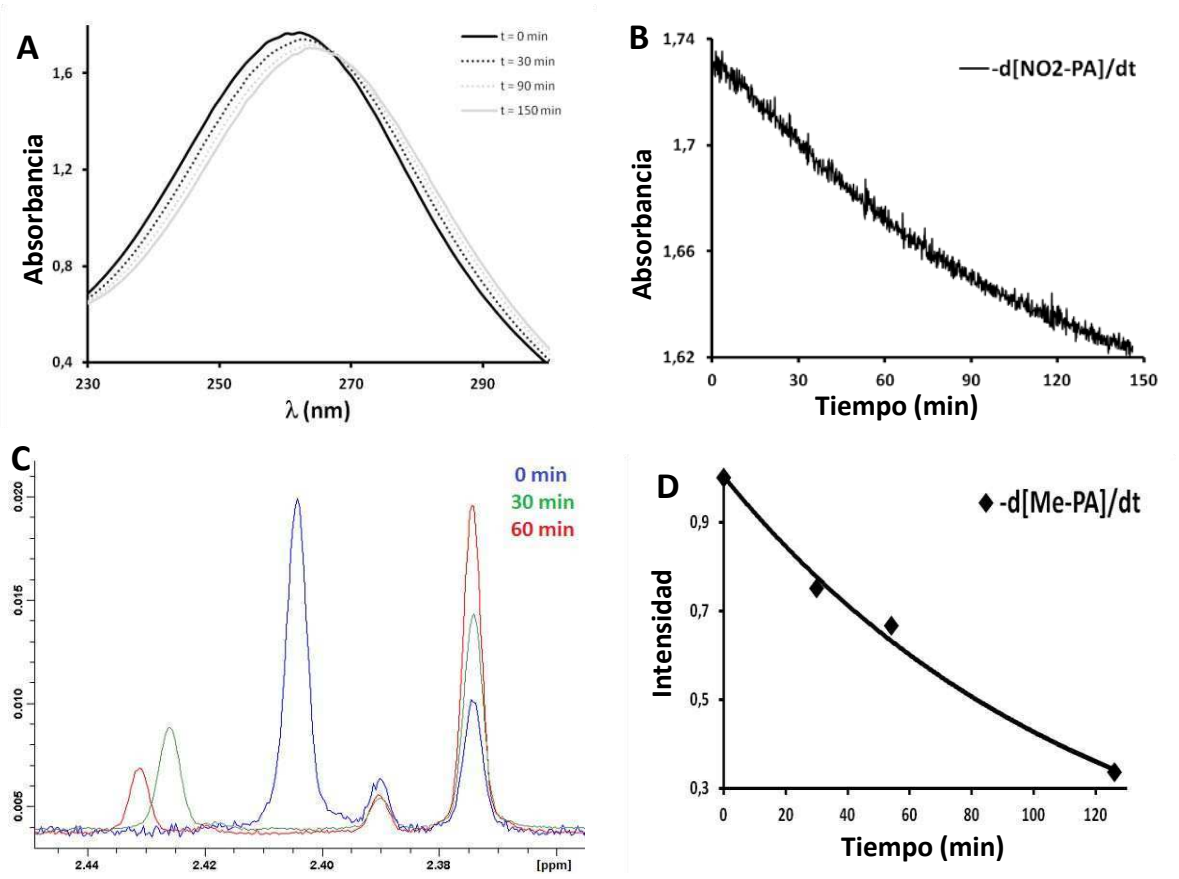


Figura 33 – A) Medición por UV-Vis de NO_2–AP, 10 μM, pH 5, t.a. B) -d[NO_2-AP]/dt C) Medición por RMN de Me–AP (10 μM) en H_2O, pH 10 (con D_2O para el lock), t.a. D) -d[Me-AP]/dt

La Tabla 7 muestra las constantes de velocidad para la descomposición de los derivados de AP, las mismas fueron modeladas como una reacción de primer orden. Como se puede observar, la velocidad de descomposición se encuentra en todos los casos en el rango de 10^{-3} a 10^{-4} s^{-1}. Sin embargo, el pH al cual los dadores comienzan a descomponerse muestra una amplia gama de valores (ca. 10 unidades de pH). Esto no puede ser debido sólo a un cambio en la acidez del sustituyente -NHOH, ya que por ejemplo en el caso de los ácidos arenosulfónicos, sustituyentes similares en el anillo aromático producen un cambio en la acidez del grupo -SO_3H de menos de 1 unidad de pH (-7,18 para p-NO_2 frente a -6,5 de p-CH_3)[192]. Por otro lado, OMe-AP, que contiene en sustituyente dador de electrones, se descompone en el mismo pH que el NO_2-AP, que contiene un sustituyente atractor de electrones. Por lo tanto, para explicar la dependencia con el pH, se deben considerar otros factores tales como la fuerza del enlace N-O de la fracción -SO_2-NHOH y los efectos de solvatación, como se discutirá a continuación.

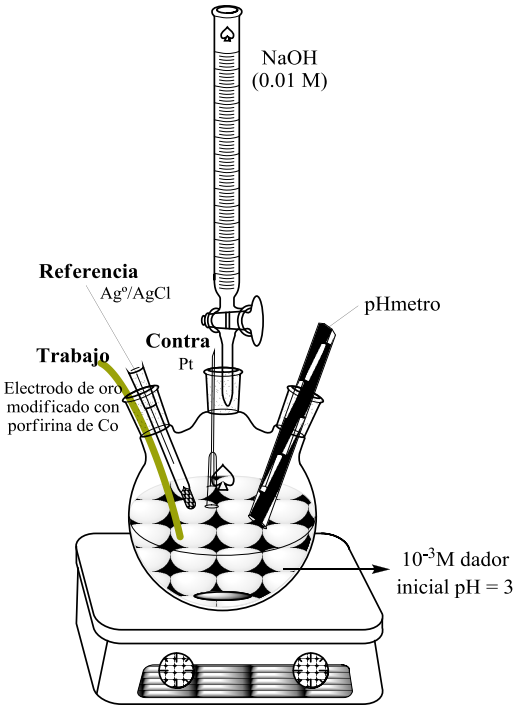
Tabla 7. Constantes de velocidad para la descomposición de derivados del ácido de Piloty.

	Compuesto	**Constante de velocidad (k, s^{-1})[a]**	**pH de descomposición[b]**	**pH de donación de HNO[c]**
	AP	(2.44 ± 0.23) x 10^{-4} [88]	9.3[88]	-
1	Me – AP	(4.4 ± 0.6) x 10^{-4}	9	10.0 ± 0.5
2	NO_2 – AP	(3.6 ± 0.4) x 10^{-4}	5	5.7 ± 0.8
3	F – AP	(1.9 ± 0.3) x 10^{-3}	3	4.0 ± 0.3
4	TriIso – AP	(5.0 ± 0.5) x 10^{-3}	3	5.4 ± 0.2
5	OMe – AP	(3.5 ± 0.4) x 10^{-4}	5	5.8 ± 0.7
6	(NO_2-CF_3) – AP	(6.3 ± 0.8) x 10^{-4}	ca -1	No medido

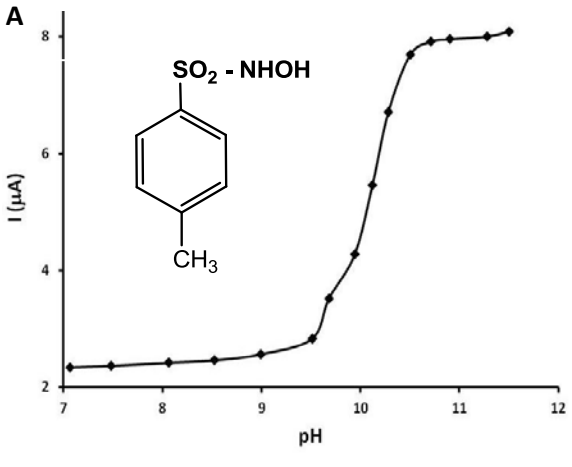
[a] Constante de velocidad en el pH en el que la corriente de electrodo de HNO alcanza una plateau (Figuras 34). En el caso de 6, la velocidad fue tomada dos unidades de pH después del pH de descomposición. [b] pH en el que la descomposición comienza a ser observada por UV-visible y/o RMN. [c] Punto de inflexión para las curvas de corriente vs pH (Figuras 34).

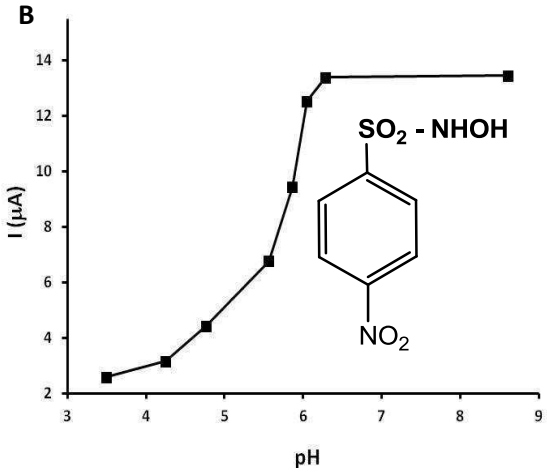
8.1.2 Medición de la producción de HNO como función del pH.

También se determinó en cada caso el pH al cual se inicia la donación de nitroxilo mediante el uso del electrodo selectivo de HNO,[126] en el cual, como se mencionó en las secciones 6 y 7, la señal de intensidad de corriente es proporcional a [HNO] y es completamente insensible a NO. Bajo atmósfera inerte y a partir de una solución del dador a un pH en la cual el compuesto es estable, se elevó el mismo lentamente por adición de NaOH diluido, durante lo cual se midieron simultáneamente el pH, la corriente y el tiempo (Esquema adjunto). Un gran aumento de la corriente indica que el [HNO] está creciendo, alcanzando una meseta cuando se obtiene la velocidad máxima de la formación del mismo. La Tabla 7 muestra que el punto de inflexión de la curva de corriente vs pH es en la mayoría de los casos alrededor de una unidad de pH mayor que el pH en el que la descomposición comienza a ser observada, a excepción de TriIso-AP (Figura 34).



Se muestran a continuación las producciones de HNO en función del tiempo y el pH, los cuales se miden simultáneamente (el pH se elevó mediante la adición de NaOH (ac.)).





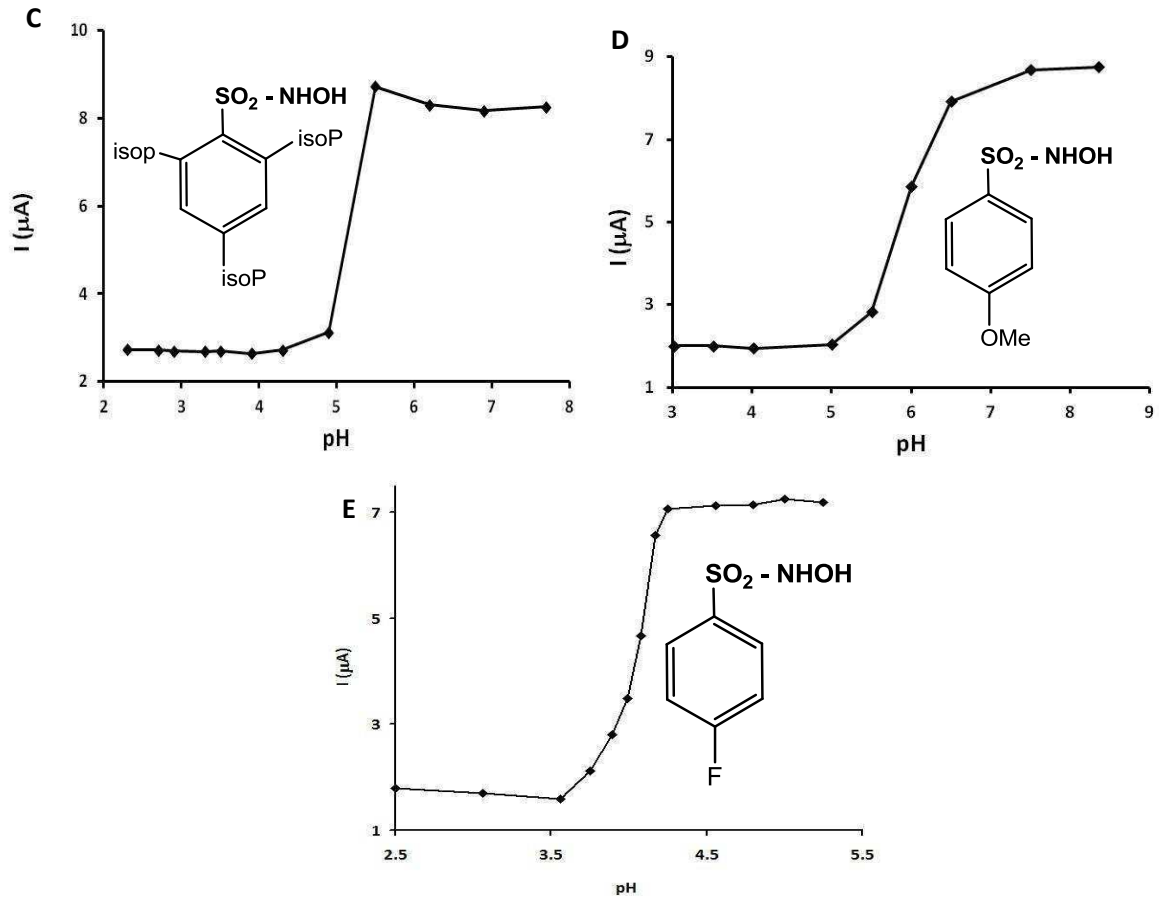
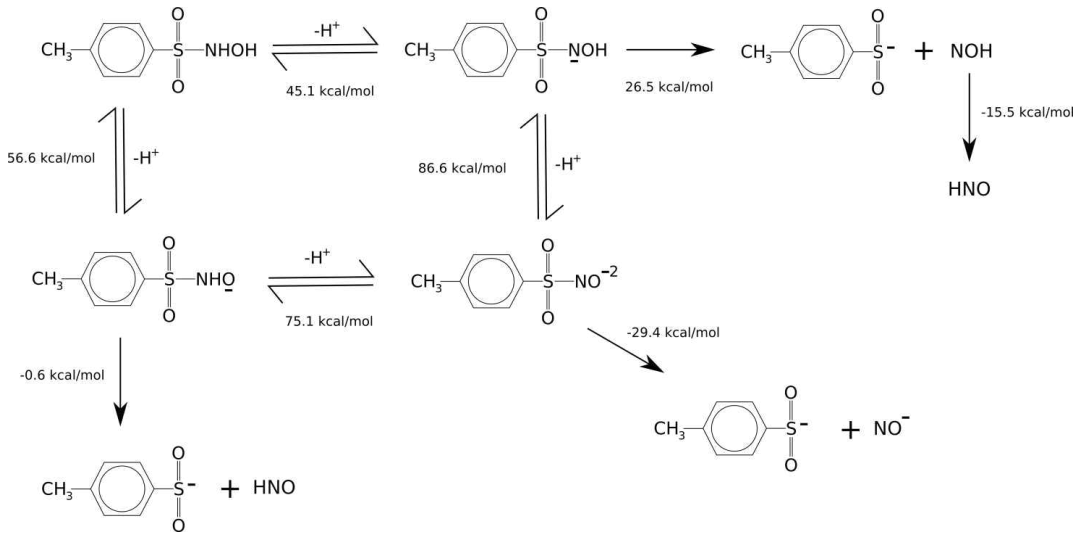


Figura 34 – I vs. pH para cada dador A) Me-AP; B) NO_2-AP; C) TriIso-AP; D) OMe-AP; E) F-AP.

8.1.3 Deprotonación NH versus OH, y grupos atractores de electrones versus dadores de electrones.

Se ha sugerido a la deprotonación como el primer paso para la descomposición de AP.[193] El grupo $-SO_2NHOH$ contiene dos átomos de hidrógeno como protones, uno en el átomo de N y el otro en el átomo de O. Una pregunta que surge es si la descomposición ocurre por la pérdida del protón ubicado en el grupo NH, o el que se encuentra en el OH. Por medio de cálculos de estructura electrónica hemos optimizado las estructuras para TSHA (Me-AP), sus dos derivados de monoaniones, y el dianión. Los procesos de deprotonación se representan en el Esquema 16. Los resultados muestran que ambas desprotonaciones tienen requerimientos energéticos similares, la N-deprotonación produce un anión más estable que la O-deprotonación por ca. 10 kcal/mol. Sin embargo, la descomposición desde el O-anión es más favorable que desde el N-anión en casi 30

kcal/mol. Por otra parte la O-deprotonación, para formar el anión correspondiente, coloca al resto de la molécula $-SO_2NHOH$ para liberar HNO mientras que en el caso del N-anión, la ruptura del enlace SN produce el isómero NOH que eventualmente puede convertirse a HNO. El proceso $^3NOH \rightarrow {}^1HNO$ es favorable desde el punto de vista energetico, -15.5 kcal/mol de acuerdo a los calculos realizados, y ca. -20 kcal/mol según mediciones previas de literatura,[3] pero ha de tenerse en cuenta que en este proceso la transición del triplete al singlete está prohibido y podría ser relativamente lento. Resumiendo, teniendo en cuenta los requerimientos energéticos, en medios acuosos parece más probable que tenga lugar la O-deprotonación y su posterior liberación de ^1HNO que la N-deprotonación y la liberación de ^3NOH, contrariamente a lo que se ha sugerido antes en disolventes orgánicos.[194] En cuanto a la segunda deprotonación, la liberación de energía más alta es a partir del N-anión para dar el dianión. A partir de este punto, la ruptura para producir NO^- es un proceso muy favorable, lo que sugiere que a valores extremadamente altos de pH, el NO^- podría ser formado directamente desde el dianión.



Esquema 16. Mecanismo de liberación de HNO/NO^- por TSHA.

También se calcularon todas las energías discutidas anteriormente para el resto de los derivados de AP. La Tabla 8 presenta las energías calculadas para los procesos:

O- deprotonación (ΔE OH)	$R\text{-}SO_2\text{-}NH\text{-}OH \rightarrow [R\text{-}SO_2\text{-}NH\text{-}O]^- + H^+$	(1)
N- deprotonación (ΔE NH)	$R\text{-}SO_2\text{-}NH\text{-}OH \rightarrow [R\text{-}SO_2\text{-}N\text{-}OH]^- + H^+$	(2)
Descomposición desde O-anión (ΔE HNO)	$[R\text{-}SO_2\text{-}NH\text{-}O]^- \rightarrow [R\text{-}SO_2]^- + HNO + H^+$	(3)
Descomposición desde N-anión (ΔE NOH)	$[R\text{-}SO_2\text{-}N\text{-}OH]^- \rightarrow [R\text{-}SO_2]^- + NOH + H^+$	(4)

Tabla 8. Energías calculadas para las reacciones 1-4 (kcal/mol).

	R	ΔE_{OH}	ΔE_{NH}	ΔE_{HNO}	ΔE_{NOH}
	H	56,1	44,4	-1,0	26,2
1	**Me**	56,6	45,1	-0,6	26,5
2	**NO_2**	52,5	40,0	-3,2	24,8
3	**F**	55,5	43,9	-1,3	25,9
4	**iPr_3**	55,0	45,7	-3,8	21,1
5	**OMe**	57,0 (56,7)[a]	45,7 (45,3)[a]	-0,3 (-0,5)[a]	26,6 (26,4)[a]

[a]Calculado con la adición de una molécula de agua unida por H a **5**.

Las tendencias que se presentan en la Tabla 8 se pueden racionalizar en términos de la naturaleza dador/atractor de electrones del sustituyente. De hecho, la deprotonación se produce más fácil para el nitro-derivado cuyo grupo -NHOH tiene menor densidad electrónica por el efecto atractor del grupo NO_2, y por lo tanto su anión es más estable. Por otro lado, -OMe (un grupo dador de electrones en la posición *para*, pero aceptor de electrones por efecto inductivo en la posición *meta*) desestabiliza el anión formado en la posición *para* y por lo tanto su deprotonación es menos favorable. Los efectos son más importantes para los grupos aceptores de electrones que para los dadores. Por ejemplo, para la deprotonación de –OH, la diferencia entre el AP (sustituyente "H", ΔE_{OH} = 56,1 kcal/mol) y el aceptor de electrones más fuerte (grupo nitro(2)) asciende a 3,6 kcal/mol, mientras que la diferencia con el grupo dador de electrones metoxi (5) es de sólo 0,9 kcal/mol. Esta última diferencia se reduce si se agrega a los cálculos una molécula de agua explicita, unida por H, al grupo -OMe (véase la Tabla 8 y en la Fig. 35), y en la presencia de dos moléculas de agua se reduce aún más. Esta tendencia, y la evidencia experimental anterior, indican que en solución acuosa el efecto inductivo atractor de electrones (en la posición *para*) del grupo -OMe predomina sobre el efecto de resonancia dador de electrones.

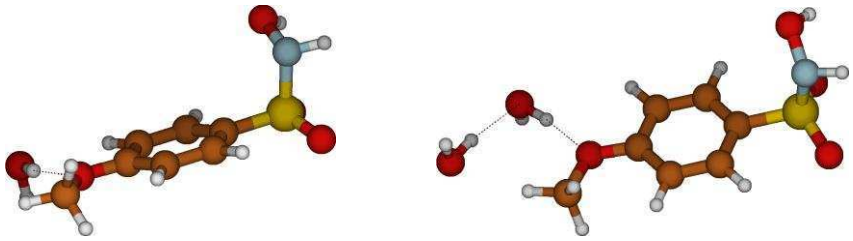


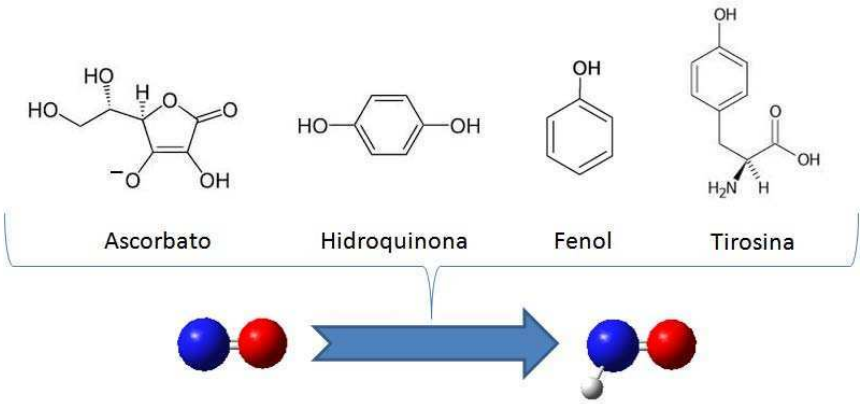
Figura 35. Geometría obtenida por optimización de DFT para OMe-AP para la adición de moléculas de agua unidas por H.

En resumen, ***se han logrado sintetizar derivados del ácido de Piloty y los valores de pH al cual se inicia la donación*** de HNO son aproximadamente coincidentes con los valores de pH de descomposición, los cuales ***cubren un amplio rango de pH (alrededor de -1 a 10).***

Desde el punto de vista cinético, la estabilidad de los aniones derivados de los dadores es similar, ya que ***las constantes de velocidad de descomposición están todas en el rango de 10^{-3} - 10^{-4} s^{-1}.*** Sin embargo, F-AP y TriIso-AP muestran las velocidades de descomposición más rápidas, por lo tanto un efecto cinético podría ser predominante en estos casos. En el caso de AP, así como para los dadores NO_2-AP y Me-AP, el pH al cual comienza la donación de HNO parece estar dominado por las constantes de acidez termodinámicas. Sin embargo, otro efecto predominante parece ser "estructural". Las estructuras de rayos X muestran una clara tendencia: dN─O está en el orden: F-AP (3) < NO_2-AP (2) < AP < Me-AP (1), que sigue la misma tendencia de pH que la donación de HNO. Esto podría ser debido al hecho de que cuanto más corto es este enlace, resulta más fácil la formación de HN=O. Uno esperaría ver que esta situación se refleje en los valores ΔE_{HNO} de la Tabla 8, o sea, más favorables para el NO_2-AP, F-AP y TriIso-AP. Sin embargo, estas diferencias son bastante pequeñas y el solvente puede jugar un papel importante que mejora estas variaciones a través de puentes de H a los átomos N y O del HNO. Por último, el impedimento estérico es un factor importante en el caso de TriIso-AP, y se espera sin dudas que la solvatación sea importante en el caso de OMe-AP a través de puentes de H con el grupo -OMe.

Contrariamente a AP y TSHA, el resto de los derivados, con sustituyentes atractores o dadores de electrones, donan HNO a pH fisiológico. ***Todos estos derivados de AP se sintetizan fácilmente en reacciones de un solo paso***, a partir de los cloruros de sulfonilo correspondientes, con rendimientos de muy buenos a excelentes. Dado que una gran variedad de cloruros de sulfonilo están disponibles comercialmente, se puede obtener en un solo paso de síntesis un enorme número de dadores derivados de AP para trabajar a cualquier pH.

8.2 Reacciones de NO con alcoholes: ¿una posible fuente endógena de HNO?



El papel del óxido nítrico en la biología está bien establecido, sin embargo, la evidencia acumulada en los últimos años, sugiere que la azanona también podría estar involucrada en procesos biológicos, algunos de los cuales se atribuyen al NO. En este contexto, una de las cuestiones más importantes, y aún sin respuesta, es si el HNO se produce *in vivo*, siendo una posible via de su generación la reducción química o enzimática de NO.

La ruta más directa, la reducción química del NO, ha sido históricamente descartada, posiblemente debido al potencial de reducción de -0,8 V reportado para la cupla ($NO/^3NO^-$), que está fuera del rango biológico. Sin embargo, a pH fisiológico, se espera que ^1HNO sea la especie principal (pK_a = 11,4),[13] el cual tiene un valor estimado de $E^o(NO, H^+/^1HNO) \approx -0.14$ V.[13,195] Además, es importante señalar que la reducción de NO a HNO podría ser impulsada por su acoplamiento con reacciones posteriores termodinámicamente favorables, tal como la producción de N_2O (reacción 1) o reacciones entre radicales intermediarios.

$$1)\quad 2\ HNO \rightarrow H_2\ N_2\ O_2 \rightarrow N_2O + H_2O$$

Resultados recientes mostraron que HNO se puede producir *in vivo* por la reacción de NO [196] o especies nitrosilo [197–199] con H_2S ($E°'(S^{\bullet-},2H^+/H_2S) = E°'(S^{\bullet-},H^+/HS^-) = 0.92$ V a pH 7).[197] Por otro lado, existen varios trabajos donde se demostró que el NO reacciona con $H^\bullet$ (generado por irradiación) para producir azanona.[67,200–202]

En la presente sección, hemos utilizado el detector electroquímico selectivo para investigar si el NO se reduce a HNO por alcoholes biológicamente relevantes con capacidad de reducción moderada, como ascorbato o tirosina.

8.2.1 La reacción de NO con alcoholes aromáticos genera HNO

Para determinar la posible producción de HNO en la reacción de NO con alcoholes alifáticos o aromáticos se analizó la conversión de Mn(III)TCPP (Mn(P)) a $\{MnNO\}^6$ utilizando espectroscopía UV-Vis.[129] La figura 36A muestra los cambios de absorbancia obtenidos después de mezclar una solución de NO con ascorbato ($AscH^-$), la especie predominante en las condiciones de reacción (pH 7). Estos cambios son característicos para la reacción entre porfirinas Mn(III) y HNO, con la consiguiente formación de $\{MnNO\}^6$,[123] siendo que esta porfirina de Mn(III) no reacciona ni con NO[123] ni con ascorbato [113] (Fig 36B y 36C). Esta evidencia sugieren fuertemente la producción HNO, obteniéndose resultados similares con hidroquinona (HQ), tirosina (Y) y fenol (PhOH), aunque las velocidades de reacción varían (Tabla 9). No se observó reacción con alcoholes no aromáticos como el metanol, D-manitol o ácido málico.

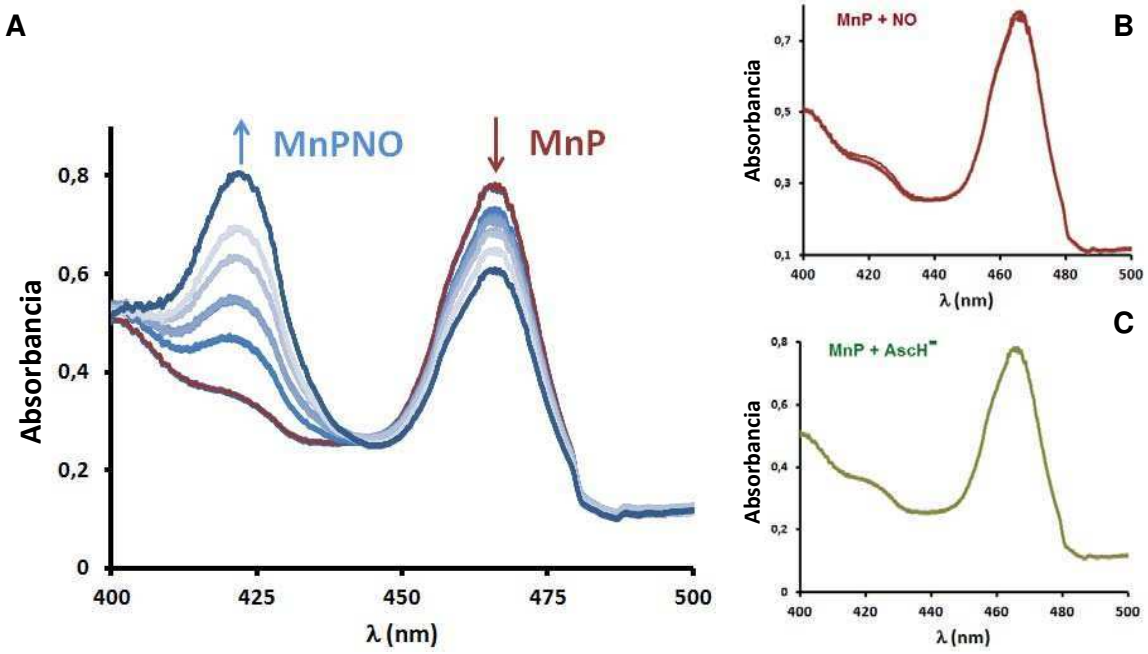


Figura 36. A) Espectros en función del tiempo observados para la reacción entre Mn(P) (rojo, $1x10^{-5}M$) con NO y $AscH^-$ para producir Mn(P)NO (azul) a pH 7,4, t.a. B) No se observan cambios espectrales para la reacción de Mn(P) con NO C) No se observan cambios espectrales para la reacción de Mn(P) con $AscH^-$.

El segundo método utilizado para determinar la posible producción de HNO se basó en el electrodo selectivo de HNO desarrollado durante esta tesis, que, como se mencionó permite la detection nanomolar resuelta en el tiempo.[126,203–205] En un experimento típico,

1,2 a 24 pmoles de ROH (0,2 a 4 μM) se añadieron a 1,2 μmoles de NO disueltos en 6 mL (0,2 mM) de agua destilada desgasada que contiene 0,6 μmoles de DPTA (o EDTA) a t.a. en atmósfera de Ar (o viceversa).

En la Figura 37A se presenta la señal amperométrica vs. tiempo inicial después de la adición de cada alcohol (2 μM) a una solución acuosa anaeróbica de NO (0,2 mM). El aumento en la corriente después de la adición del alcohol demuestra claramente la formación HNO. Como era de esperarse para una reacción bimolecular, la altura de la señal, que refleja la concentración de HNO,[205] es linealmente dependiente en ambos reactivos. En la Figura 37B se muestra el perfil completo de la reacción, observándose que la señal decae debido a las posteriores reacciones de consumo de HNO.

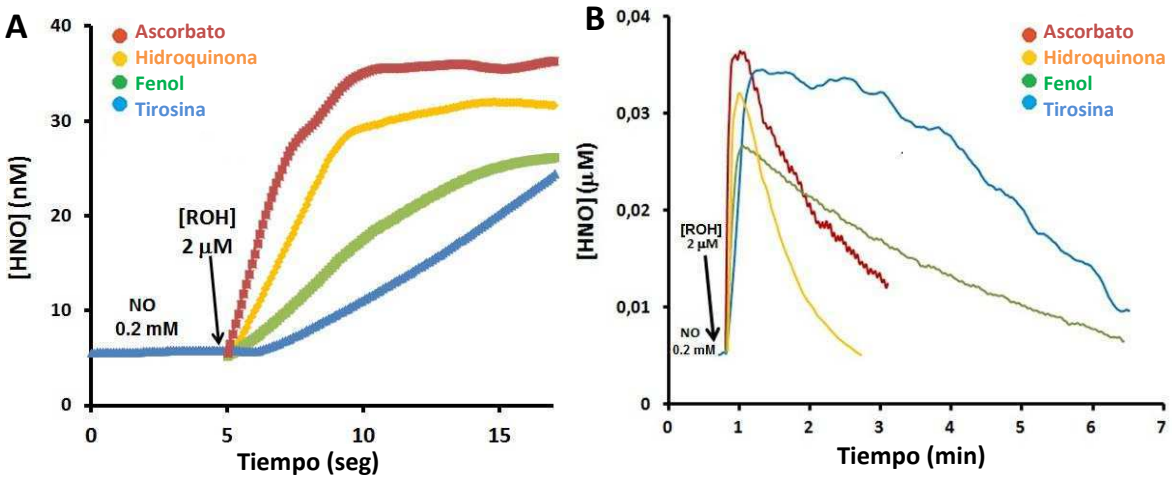


Figura 37. Señal amperométrica en función del tiempo después de la adición de ROH (2 μM) a una solución acuosa anaeróbica de NO (0,2 mM). Eje Y: [HNO] después de calibrar; ROH = Rojo: $AscH^-$; Naranja: HQ; Verde: PhOH; Azul: Y. A) Tiempo inicial B) Perfil completo. La señal disminuye en el tiempo debido a reacciones que consumen HNO

Para cada caso, también se confirmó que la máxima concentración utilizada (0,2 mM) de NO, y de todos los dadores de $H^\bullet$ producen una pequeña señal que puede ser despreciada. Las figuras 38A y 38B muestran que los gráficos de v_i (velocidad inicial) vs. [ROH] y [NO] son lineales. De la pendiente de estos gráficos puede obtenerse una constante bimolecular efectiva (k_{eff}), correspondiente a la reacción 2.

$$2)\quad NO + ROH \rightarrow RO^\bullet + HNO$$

$$v = k_{eff}\,[ROH]\,[NO]$$

Las k_{eff} resultantes se reportan en la Tabla 9, y los datos muestran que ambos dioles (HQ y $AscH^-$) reaccionan ca. 5-10 veces más rápido que los fenoles, siendo el $AscH^-$ el más veloz. Por otra parte, las figuras 38C y 38D muestra que los gráficos (v_i) vs. Log [ROH] y Log [NO] son lineales, con una pendiente cercana a uno, lo que confirma que la reacción es de primer orden en ambos reactivos.

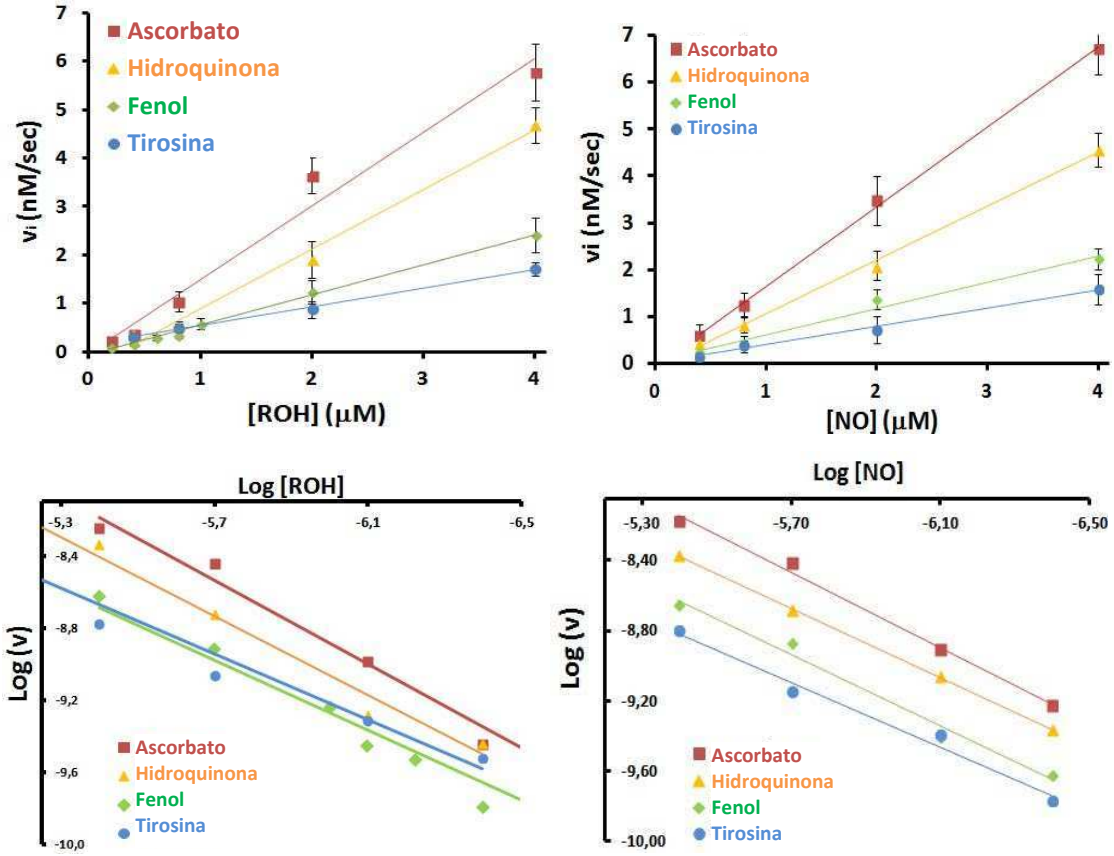


Figura 38. ROH = Rojo: $AscH^-$; Naranja: HQ; Verde: PhOH; Azul: Y. A) v_i vs. [ROH] ; [NO]= 0.2 mM B) v_i vs. [NO] ; [ROH]= 0.2 mM C) log(v_i) vs. log [ROH] ; [NO]= 0.2 mM D) log(v_i) vs. log[NO] ; [ROH]= 0.2 mM

Tabla 9. k_{eff} para la correspondiente reacción de NO con los distintos ROH. Cantidad de N_2O, nitrito y producto orgánico obtenidos para las mismas reacciones.

Compuesto[a]	**k_{eff} ($M^{-1}s^{-1}$)**[b]	**NO_2^- (μmol)**[c]	**N_2O (μmol)**[c]	**Rendimiento N_2O**[c]	**Rendimiento Prod. Org.**[d]
AscH$^-$	8.0 ± 0.5 (43 ± 15)	20	16	50%	> 95% (100%)
HQ	6.1 ± 0.4 (9)	11	9	30%	> 95% (100%)
PhOH	3.2 ± 0.4	8	6	20%	~ 90% (98%)
Y	0.9 ± 0.4	5	4	10%	~ 30% (33%)

[a]No se detectó reacción cuando se utilizan metanol, D-manitol o ácido málico. [b]Determinado a partir de la pendiente de la señal del electrodo. Entre paréntesis, determinado por EPR [c]Después de 24 h, en base a la cantidad inicial de NO (100 μmol). [d]Dehidroascorbato (DHA), benzoquinona (BQ), p-Ph(OH)-NO y o-Y-NO, respectivamente, sobre la base de 17 μmol (cantidad inicial). Entre paréntesis el rendimiento considerando el NO que queda sin reaccionar (ver tabla 10)

Para descartar posible catálisis espurea por contaminantes del solvente, o los reactivos, probamos mediante el sensor electroquímico, si metales como Fe(II/III), Mn(II), Cu(I/II) o Co(II) afectan la producción de HNO en las reacciones descritas. Los resultados confirmaron que los iones metálicos no juegan ningún papel significativo en la producción de HNO (véase la Tabla 10).

Tabla 10. Detección electroquímica de HNO en presencia de iones metálicos añadidos.

Catión agregado	**Intensidad Relativa ≈ [HNO]**
Agua MQ + DPTA	1
Agua MQ	1
Cu^+	1,08
Cu^{2+}	1,17
Co^{2+} y Mn^{2+}	0,83
Fe^{2+} y Fe^{3+}	0,67

En base a los resultados hasta aca presentados, es clara la generación de azanona en la reacción entre alcoholes aromáticos y NO, siendo la misma no favorecida por la presencia de trazas de metales en el medio. Dicha reacción es orden 1 en ambos reactivos y con constantes en el orden de 1-10 $M^{-1}s^{-1}$

Análisis de intermediarios radicalarios por EPR. Como la abstracción formal de un átomo de H de los grupos -OH por NO produciría especies radicalarias, las reacciones fueron estudiadas por EPR en colaboración con el Dr. Nicolas Neuman. Soluciones de ascorbato (0,1-1 mM), hidroquinona (10 mM) y tirosina (2 mM) se mezclaron con volúmenes iguales de soluciones saturadas de NO por inyección simultánea en una celda plana de cuarzo. Se excluyó la presencia de oxígeno y de iones metálicos, utilizando DTPA o EDTA como quelantes. Los dos primeros alcoholes claramente producen señales detectables por EPR como se muestra en la Figura 39. El radical tirosilo no se observó, presumiblemente debido a la lenta velocidad de reacción entre el NO y tirosina, y/o a la menor estabilidad del radical. La Figura 39A muestra la dependencia temporal de la concentración de radical ascorbilo después de mezclar $AscH^-$ y NO.

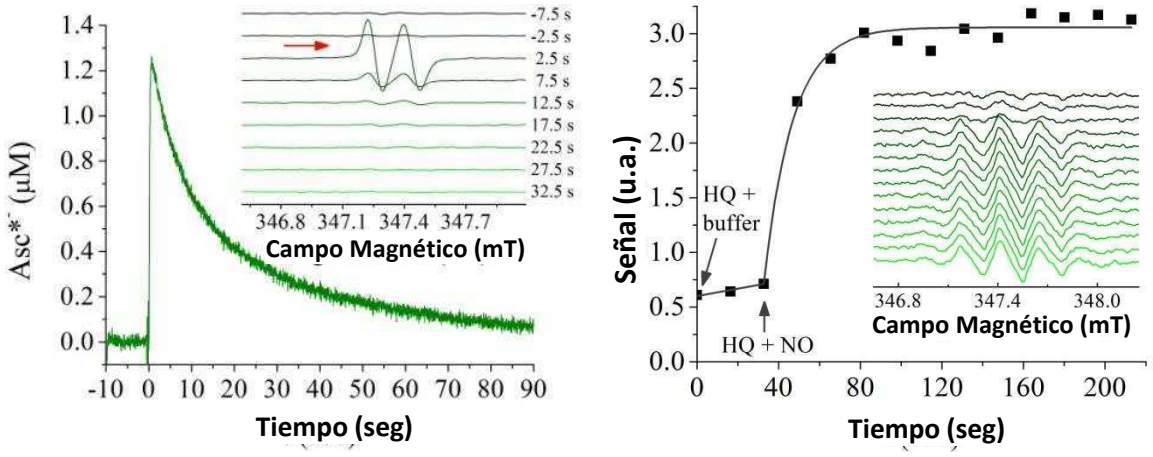
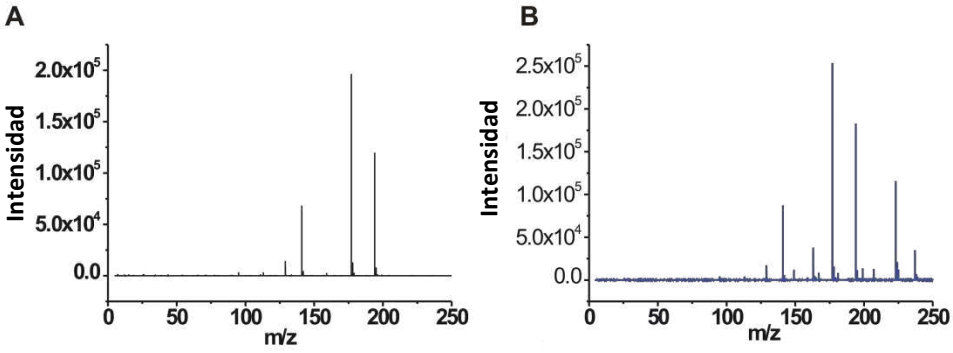


Figura 39. A) Dependencia temporal de la concentración del radical ascorbilo. Inset: espectros consecutivos de EPR de soluciones de ascorbato (1 mM) solo y con NO (1 mM). La flecha indica el comienzo de la reacción. B) Dependencia temporal de la amplitud del pico central de la señal de semiquinona. Inset: espectros consecutivos de EPR de soluciones de hidroquinona (5 mM) sola y con NO (1.5 mM). La primera flecha indica la inyección de HQ y la segunda flecha la inyección de NO en la celda de EPR.

Después de mezclar los reactivos, aparece una intensa señal del radical ascorbilo que posteriormente decae con una vida media de 4-8 segundos. Este comportamiento es consistente con la desproporción del radical en ascorbato y dehidroascorbato,[206] y también la reacción de ascorbilo con NO para dar O-nitrosoascorbato.[207,208] Se obtuvieron resultados similares para la reacción con HQ (mostrado en la Figura 39B), pero la señal correspondiente al radical $HQ^{\bullet}$ aumenta seis veces y se mantiene estable durante varios minutos, decayendo después de 15 minutos. Las señales de EPR también permiten la determinación de la k_{eff} para ambas reacciones (como se muestra en la Tabla 9). Los valores obtenidos de k_{eff} por EPR están en el mismo orden de magnitud que los obtenidos a partir de los datos electroquímicos, subrayando la ocurrencia y caracterización cinética de la reacción 2 propuesta.

Análisis por espectrometría de masas. Se estudió la reacción de $AscH^-$ y NO por espectrometría de masas de alta resolución a baja temperatura, mostrando picos MS (m/z = 207,0368, 223,0591 y 237,0378, Figura 40), que corresponden a la primera adición de NO a ascorbato, y a la segunda adición de NO a cualquiera de los dos primero RO-NO^-, o el radical ascorbilo (ver más abajo el análisis del mecanismo propuesto), dando lugar a: $[AscH_2NO + H]^+$ *m/z* 207.0368 (observado), *m/z* 207.0374 (simulado) (Fig. 40D); $[AscHNO + NH_4]^+$ *m/z* 223.0591 (observado), *m/z* 223.0561 (simulado) (Fig. 40F); $[AscH_2(NO)_2 + H]^+$ *m/z* 237.0378 (observado), *m/z* 237.0353 (simulado) (Fig. 40G).



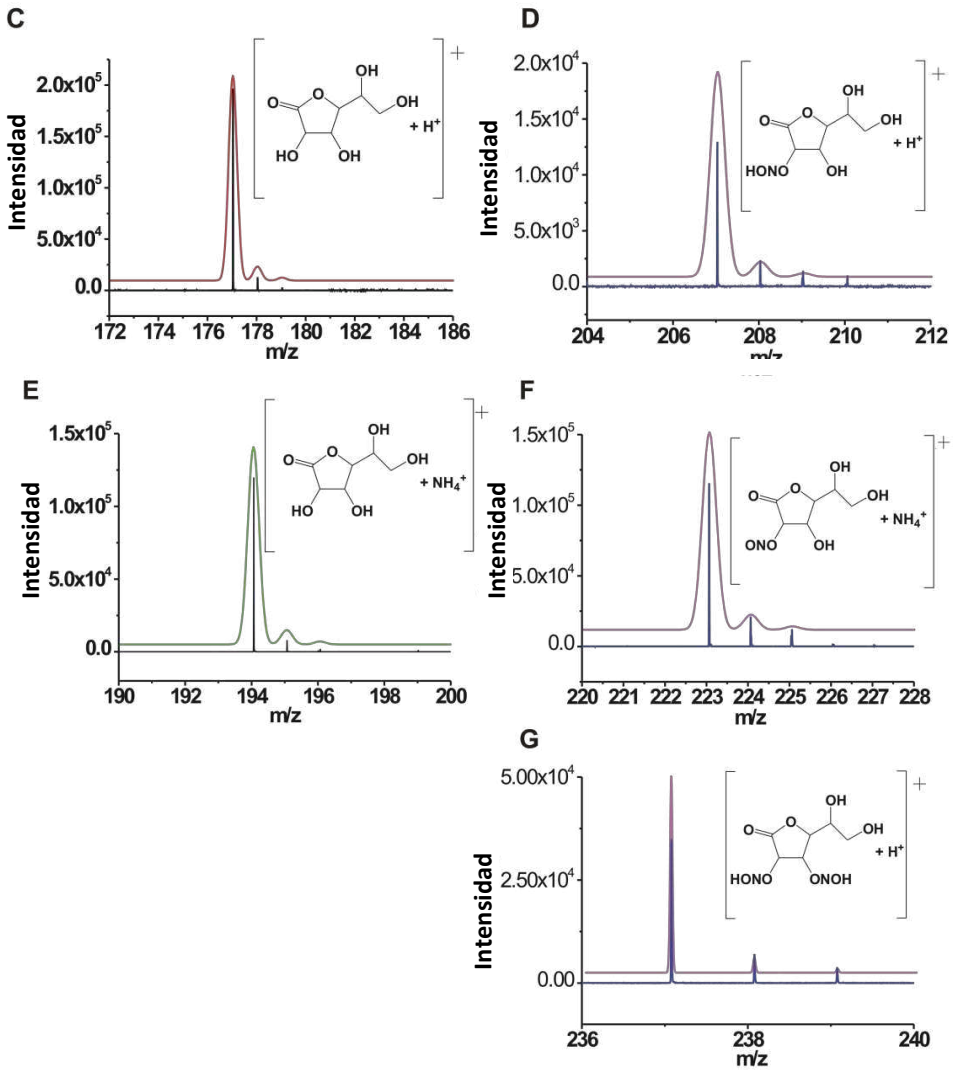


Figura 40 - Análisis de MS de los productos de reacción de la mezcla NO/ascorbato. Los experimentos MS se realizaron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo maXis (Bruker Daltonics) de alta resolución equipado con un módulo de crioionización (Bruker Daltonics). A una solución de 100 mM de ascorbato en 80% de acetonitrilo/ 20% de buffer carbonato de amonio 10 mM pH 7,4, se añadió 500 mM NO y la mezcla de reacción se nubulizó a -20 ºC. A) Todo el espectro m/z de ascorbato solo (línea de color negro) y B) Ascorbato mezclado con NO (línea azul). C-G) Asignación de señales para los espectros obtenidos, simulación de la distribución isotópica correspondiente. C) $[AscH_2 + H]^+$ *m/z* 177.0399 (observado), *m/z* 177.0394 (simulado). D) $[AscH_2NO + H]^+$ *m/z* 207.0368 (observado), *m/z* 207.0374 (simulado). E) $[AscH_2 + NH_4]^+$ *m/z* 194.0665 (observado), *m/z* 194.0659 (simulado). F) $[AscHNO + NH_4]^+$ *m/z* 223.0591 (observado), *m/z* 223.0561 (simulado). G) $[AscH_2(NO)_2 + H]^+$ *m/z* 237.0378 (observado), *m/z* 237.0353 (simulado).

Como fue postulado por Kirsch,[207] una vez que el ester nitrito $[AscONO]^-$ es formado por la reacción de $Asc^{\bullet-}$ con NO, HNO y DHA pueden producirse por un mecanismo de reacción en cadena radicalario:

3) $[AscONO]^- + H^+ \rightarrow DHA + HNO$ [207]

4) $DHA + Asc^- \rightleftharpoons 2\ Asc^{\bullet-}$ [209]

5) $Asc^{\bullet-} + NO \rightarrow [AscONO]^-$ [207]

dando lugar de este modo a la producción de un segundo HNO y la completa oxidación del ascorbato.

8.2.1 Caracterización de productos finales.

Los productos iniciales y secundarios mencionados anteriormente de la reacción de NO con los alcoholes son especies altamente reactivas, y por lo tanto, se esperan continúen reaccionando hasta generar productos finales. Los principales productos estables del HNO estarán dados por su dimerización y/o la reacción con NO,[72] dando N_2O y NO_2^-. Para detectar y cuantificar N_2O se midió el espectro de IR del *headspace* de la celda de reacción. Como era de esperar, la reacción de NO con HQ, $AscH^-$, Y y PhOH genera la aparición de las bandas IR características del N_2O a 2210 y 2230 cm^{-1} (ver Figura 41A),[204,210] y no se observó señal para cualquiera de los reactivos solos. La Figura 41B muestra la curva de calibración correspondiente, que se utiliza para determinar la concentración final de N_2O. Las muestras se midieron 24 horas después de mezclar 50 mL de una solución acuosa saturada de NO ($2x10^{-3}$ M) con los diferentes alcoholes $3{,}3x10^{-4}$ M.

Para validar la metodología utilizada, se uso Sal de Angeli como ``compuesto patrón``. Para ello, se utilizaron 50 mL de soluciones de SA entre 0 y 1 mM verificando la relación conocida de nitrito y N_2O, la cual es 2:1.

6) $2\ HN_2O_3^- \rightarrow 2\ NO_2^- + N_2O + H_2O$

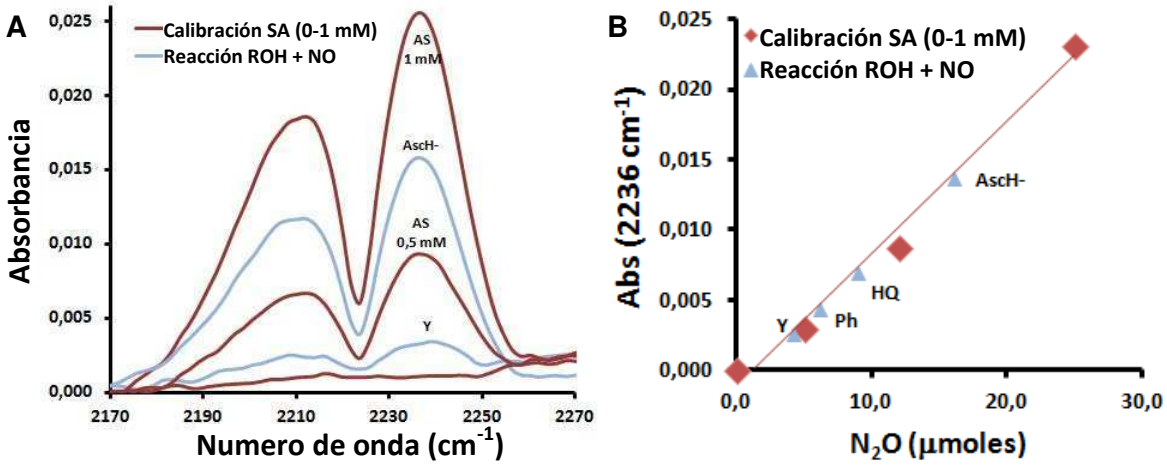
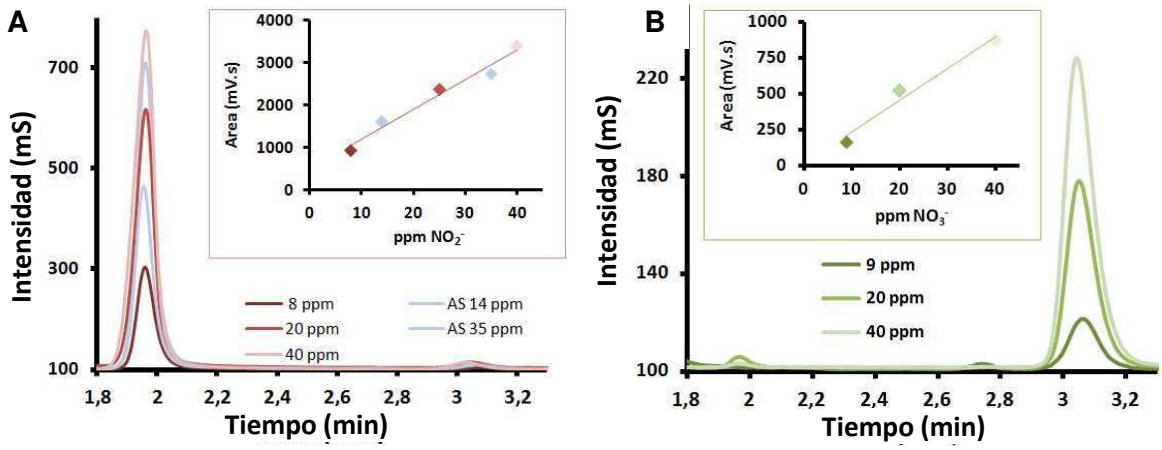


Figura 41. A) Bandas P y R a 2212 cm^{-1} y 2236 cm^{-1} para el estiramiento de N_2O producido *in-situ* por la decomposición de SA (rojo). En azul, los espectros de la reacción de NO con $AscH^-$ e Y, como ejemplos. B) Curva de calibración a 2236 cm^{-1} (rojo), y las medidas de los distintos ROH (azul).

La presencia de nitrito se confirmó mediante cromatografía iónica (Figura 42). Se realizaron dos mediciones diferentes: (i) condiciones anaeróbicas en el que se determinó la cantidad generada de nitrito y (ii) en condiciones aeróbicas, después de exponer una alícuota de la misma mezcla al aire durante dos horas. En estas condiciones, se determinó la cantidad de NO sin reaccionar, la cual se obtiene de relacionar los moles de ``nitrato + nitrito`` obtenidos en condiciones aeróbicas con los moles de nitrito obtenidos en anaerobiosis.

7) $4\ NO + O_2 + 2\ H_2O \rightarrow 4\ HNO_2$

8) $2\ HNO_2 + O_2 \rightarrow 2\ NO_3^- + 2\ H^+$



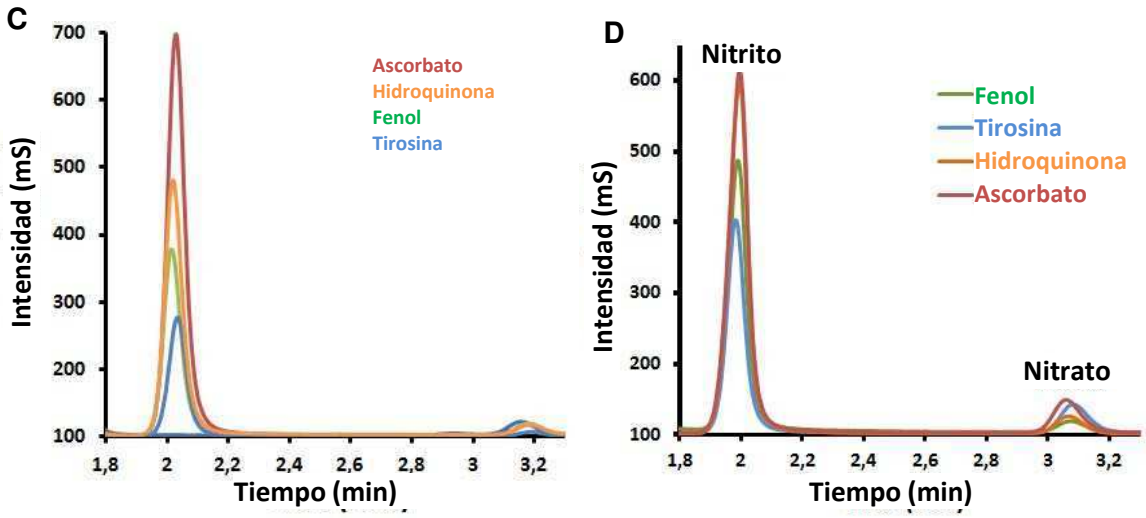


Figura 42 - Cromatogramas de nitritos (tr 2 min) y nitratos (tr 3 min). A) En rojo, patrones de nitrito; en azul, muestras de SA utilizadas para calibrar relación nitrito:N_2O. Inset: Curva de calibración B) Patrones de nitrato. Inset: Curva de calibración. C) Medida 24 horas después de mezclar 50 ml de solución acuosa saturada de NO ($2x10^{-3}$ M) con $3.3x10^{-4}$ M de los diferentes alcoholes (rojo: $AscH^-$; naranja: HQ; verde: PhOH; azul: Y). D) Se determinó la cantidad de NO sin reaccionar mediante la medición de nitrato, después de exponer dos horas la mezcla al aire.

Los resultados muestran que para las reacciones de los compuestos ROH, los productos N_2O y NO_2^- se forman en una relación aproximada de 1:1 (Tabla 11), lo cual es consistente con la siguiente reacción conocida y el mecanismo asociado, que se presenta a continuación:

$$9)\quad 2\ NO + HNO \rightarrow NO_2^- + N_2O + H^+$$

$$10)\quad AscH^- + 6\ NO \rightarrow DHA + 2\ N_2O + 2\ NO_2^- + H^+$$

Tabla 11. Cantidades de N_2O, nitrito y nitrato obtenidos para las reacciones de los dadores de $H^{\bullet}$ con NO (100 μmoles) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Compuesto	μmoles iniciales	Anoxico NO_2^- (μmol)	Aerobico $NO_2^- + NO_3^-$ (μmol)	NO (μmol)	NO_2^- : N_2O
SA $2x10^{-4}$ M	10	10	-	-	2
SA $5x10^{-4}$ M	25	22	-	-	2
$AscH^-$	17	20	26	6	1,25
HQ	17	11	22	11	1,22
PhOH	17	8	16	8	1,33
Y	17	5	14	9	1,25

Productos orgánicos finales

Los radicales R-$O^{\bullet}$ también son inherentemente inestables y por tanto reaccionan para formar compuestos orgánicos de capa cerrada. Para determinar los productos finales correspondientes para cada reacción se utilizaron espectroscopías de RMN, IR y UV. Las muestras se midieron 24 horas después de mezclar 50 ml de una solución acuosa saturada de NO ($2x10^{-3}$ M) con $3.3x10^{-4}$ M de los diferentes alcoholes. Las concentraciones de los productos de ascorbato y fenol se determinaron por UV-Vis usando el ε correspondiente. Los productos de tirosina e hidroquinona se cuantificaron mediante RMN, comparando las señales características de los productos con las señales de los reactivos.

$AscH^-$ da principalmente DHA como producto (IR: 1780 cm^{-1}; UV-Vis: ε = $3.4x10^3$ M^{-1} cm^{-1} (λ_{max}= 300 nm)). HQ da principalmente benzoquinona (^{1}H NMR: 6.8 ppm (s); IR: 1671 – 1665 cm^{-1}). El producto de PhOH es 4-nitrosofenol (^{1}H NMR: 6.6 and 7.6 ppm (s); UV-Vis: ε = $2.6x10^4$ M^{-1} cm^{-1} (λ_{max}= 397 nm)). Por último, la tirosina produce 3-nitrotirosina (IR: 2915 cm^{-1}, ^{1}H NMR, región aromática: 7.7 ppm (s), 7.6 ppm (d), 7.3 ppm (d)), mientras que también dimeriza para dar ditirosina (λ_{max}: 315 nm); estos productos son consistentes con la presencia de radicales $PhO^{\bullet}$ e $Y^{\bullet}$. La falta de señal de EPR en estos casos posiblemente surge debido a su alta reactividad y a la presencia de exceso de NO, que genera los productos nitrosados y nitrados mencionados.

Los rendimientos de los productos orgánicos son más altos que los correspondientes rendimientos de N_2O, lo que indica que estos compuestos también se producen por otras vías que no generan HNO.[211]

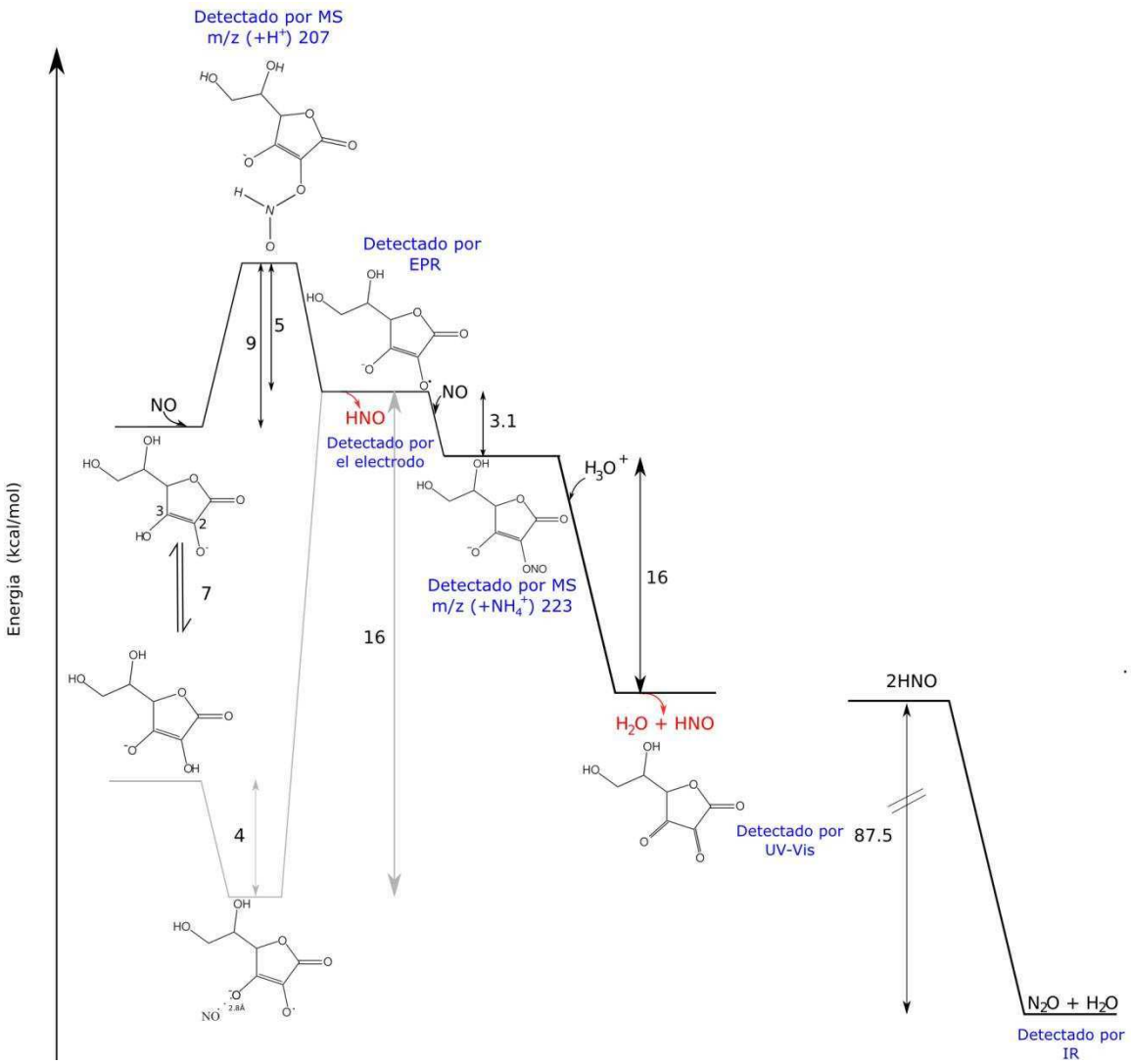
8.2.2 Análisis del mecanismo de reacción.

Para tener información adicional sobre los posibles mecanismos de reacción se llevaron a cabo cálculos DFT usando el software de Gaussian 98. Todas las especies involucradas se optimizaron con el funcional B3LYP usando 6-31G (d, p) para todos los átomos. Se modeló un medio acuoso utilizando agua (modelo polarizable continuo, PCM) con el fin de tener en cuenta los efectos de solvatación. Como ejemplo, los resultados para $AscH^-$ se presentan en el Esquema 17. Los cálculos muestran que la primera etapa de la reacción entre el NO y $AscH^-$ es endergónica (c.a. 16 kcal/mol), produciendo un intermediario radicalario RO-N(H)O$^\bullet$ (en consonancia con una de las señales observadas en el espectrómetro de masas con m/z = 207.0368, véase el Esquema 17 y la Figura 40). Este paso puede ser descrito como un ataque nucleófilo del anión ascorbato al NO (reacción 11), acoplado a la transferencia de protón desde el -OH vecino o el solvente. Por ende, tal mecanismo puede ser descrito como un ataque nucleofílico acoplado a la transferencia de protón (PCNA = proton-coupled nucleophilic attack).

El NO se une preferentemente a C_2-O, mientras que el ascorbato se desprotona preferiblemente en C_3-O (véase el Esquema 17). En este punto es difícil determinar si el NO reacciona con uno u otro tautómero, con el OH o O-, y cómo y cuando se transfieren los protones. Sin embargo, el ataque de O^- al NO parece ser más probable teniendo en cuenta la nucleofilicidad del - O^- con respecto a -OH. El radical intermediario RO-N(H)O$^\bullet$ se descompone produciendo HNO y radical ascorbilo (reacción 12), que luego puede reaccionar con otra molécula de NO para producir un éster nitrito de capa cerrada o-nitrosoascorbato (también observado por MS en m/z = 223,0591) . La reacción del radical con un segundo NO, antes de liberar HNO, posiblemente da a lugar al di-ONO observado por espectrometría de masa (m/z = 237,0378, Figura 40g). El O-nitrosoascorbato también decae después de tomar un protón para producir HNO y DHA, como ya fue observado por Kirsch y colaboradores.[208]

$$11)\ Nu^- (+H^+) + NO^\bullet \rightarrow (Nu - NH - O)^\bullet$$

$$12)\ (Nu - NH - O)^\bullet \rightarrow HNO + (Nu)^\bullet$$



Esquema 17 - Cálculos DFT para la reacción de NO con ascorbato, los valores de energía están reportados en kcal / mol.

Se observa un mecanismo similar para HQ, con dos moléculas de NO reaccionando con cada molécula de diol. Para Y y PhOH, también se postulan los intermediarios radicalarios después de la adición de NO, la formación de RO-N(H)O con la consecuente liberación de HNO, y también la formación de los nitrosoderivados. Es importante notar que, teniendo en cuenta el pK_a del alcohol correspondiente, en estos tres casos, la reacción se produce con un grupo OH neutro, donde se requiere un reordenamiento intramolecular de protones o una protonación asistida por el solvente. Por lo tanto, en estos casos también se propone un mecanismo del tipo PCNA.

Por último, es importante considerar, aunque la primera etapa de reacción entre el NO y el alcohol es endergónica, la reacción es impulsada por las reacciones posteriores de los productos iniciales (HNO y radicales orgánicos). De hecho, la rápida dimerización de HNO compensa la generación endergónica de nitroxilo, dando como resultado un balance de energía libre negativo para la reacción global 10 (véase el Esquema 18), que para AscH- es:

$$10)\ AscH^- + 6NO \rightarrow DHA + 2\ N_2O + 2\ NO_2^- + H^+ \quad (\Delta E° = -58\ kcal/mol)$$

La energía asociada con el primer paso, ya sea para producir directamente HNO por transferencia de un atomo de hidrógeno (HAT) o por PCNA, puede considerarse como una estimación mínima de la barrera de reacción global. Como se muestra en la Tabla 12, los ΔE para los dos primeros pasos (``paso 1-2``) son más pequeños para $AscH^-$ e HQ, que muestran las cinéticas más rápidas (Tabla 11). El mayor ΔE (53,2 kcal/mol) se observa para el MeOH, que no evidencia producción de HNO en las condiciones ensayadas.

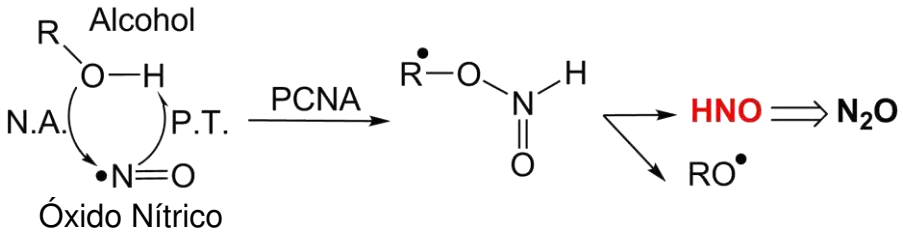
Tabla 12. Energías de reacción (ΔE) en kcal/mol calculadas por métodos Ab-initio para los pasos PCNA y de liberación de HNO.

	pK*a*	E°` (V) (pH 7) $RO^{\bullet},H^+/ROH$	ΔE PCNA[a]	ΔE liberación HNO[a]	ΔE Paso 1-2[a]	Global[a,c]
$AscH^-$	4,11	0.28	+16	- 5	+11	-58
HQ	10	0.10	+ 18	- 10	+ 8	-109
Y	10	0.86	+ 25	+ 7	+32	-63
PhOH	10	0.93	+25	+12	+37	-70
MeOH[b]	15.5	-	+ 19	+ 34	+53	-

[a]$\Delta E°_{PCM}$ (kcal/mol), optimizada al nivel B3LYP usando 6-31 G(d,p) para todos los átomos utilizando agua (modelo polarizable continuo, PCM); Paso 1: PCNA; Paso 2: liberación HNO [b]No se detectó HNO cuando se utilizó metanol. [c]Los productos finales fueron DHA, BQ, *p*-Ph(OH)NO y *o*-YNO respectivamente.

Mecanísticamente, es evidente que la reacción no implica una simple reducción de esfera externa acoplada a la liberación/absorción de protón, que es termodinámicamente desfavorable como lo demuestran los potenciales redox de los alcoholes que se muestran en la Tabla 2. En su lugar, nuestros datos sugieren que hay una adición nucleófilica de ROH/ RO^{-} a NO, acoplado a una transferencia de protón (ya sea intramolecular o a través del solvente) que resulta en un intermediario RO-N(H)O$^{\bullet}$, que decae por la ruptura del enlace ON, produciendo HNO y el radical correspondiente (véase el Esquema 18 y la Tabla 2). La estabilidad del radical RO$^{\bullet}$ (unido a HNO o libre), la endergonicidad de PCNA, y la energía global para los ``pasos 1-2`` (Tabla 2) parecen ser los factores claves para que la reacción se produzca, lo que explica por qué no se observa reacción con MeOH o manitol, y por qué $AscH^{-}$ y HQ reaccionan más rápido.

Esquema 18 - Mecanismo propuesto para la formación de HNO por reacción de NO con ROH



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

La azanona es una molécula intrínsecamente elusiva, con una probada historia de relevante reactividad química y biológica. Después de un poco más de dos décadas de intensa investigación, se han descrito muchos dadores de HNO, posibles reacciones de producción de HNO y posibles efectos biológicos de la azanona. Los dadores de HNO se basan principalmente en hidroxilamina y sus derivados, NONOatos, y C-nitroso compuestos. Se ha sugerido que el nitroxilo puede ser intermediario en muchas reacciones, la mayoría de ellas implican la oxidación de hidroxilamina (desde el estado de oxidación -1 a +1) o la reducción de óxido nítrico (desde el estado de oxidación 2 a -1). Sin embargo, para comprender plenamente el papel que desempeña el HNO como intermediario en las reacciones químicas o como potencial metabolito *in vivo* (endógeno), se requiere una detección inequívoca y eficiente de HNO a una baja concentración (nanomolar).

En el transcurso de esta tesis, se comprobó que el nitroxilo puede ser atrapado de una manera rápida por una porfirina de Co(III) unida covalentemente a una superficie de oro. Debido a esta propiedad única, se puede construir un electrodo basado en estos materiales que permiten detectar y cuantificar selectivamente HNO de una manera resuelta en el tiempo (con resolución de 1 segundo). Con este dispositivo, es posible obtener información cinética sobre las reacciones que involucran azanona en bajas concentraciones (nanomolares) y hasta micromolares en presencia de interferencias (incluyendo NO y otras RNOS), en medios aeróbicos y anaeróbicos. El electrodo también se puede utilizar en tejidos vivos, tales como cultivos celulares, con la ventaja de que se puede introducir en la placa de cultivo y se retira después de las mediciones sin interrumpir o contaminar el tejido.

En un contexto más amplio, la relevancia biológica de nitroxilo tiene al menos dos aspectos importantes. La primera se refiere a los estudios de los efectos farmacológicos de HNO y el esclarecimiento de las similitudes y las diferencias con el NO.[198,212–215] El segundo está relacionado con la posibilidad de su producción endógena como mensajero biológicamente relevante,[212] un metabolito intermediario o un producto no deseado.[43,53,54,216] Se han propuesto varias potenciales fuentes *in vivo* para azanona. Por ejemplo, la producción de HNO podría resultar de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la ausencia del cofactor redox tetrahydrobiopterina.[53,55,216–218] Otra fuente bien

establecida de azanona se basa en la oxidación enzimática *in vitro* de hidroxilamina y otros aminoalcoholes. Varios grupos han demostrado que esta reacción puede ser catalizada por hemo-proteínas como peroxidasas, catalasas o incluso mioglobina.[61,133]

Por otro lado, las vias químicas (no enzimáticas), biológicamente compatibles con HNO han sido mucho menos estudiadas.[207,212] Por ejemplo, junto con Ford y colaboradores, hemos estudiado la transferencia de un átomo de oxígeno desde nitrito hacia fosfinas, mediado por porfirinas de hierro.[204] La generación de HNO desde porfirinas nitrosiladas no se había informado anteriormente bajo ninguna circunstancia. La presencia de fosfina es necesaria para la producción de HNO, ya que el uso de tioles como aceptores de oxígeno no muestr señal del electrodo ni producción de N_2O. Estos resultados no sólo subrayan la utilidad del dispositivo de detección de HNO para el esclarecimiento de los mecanismos de reacción que implican especies reactivas de nitrógeno, donde el HNO es un posible intermediario, sino también llama la atención sobre la potencial producción fisiológica de nitroxilo derivado de complejos de proteínas $\{FeNO\}^7$, tales como el propuesto para la enzima NOS.

Por otra parte, recientemente en colaboración con el grupo del Dr. Filipovic, hemos demostrado que el NO reacciona con H_2S a una gran velocidad por un ataque nucleofílico del HS^- al NO, que forma el anión radical intermediario $HSNO^{-\bullet}$, el cual subsiguientemente genera HNO.[212] En este contexto, experimentos biológicos mostraron que el HNO es un potente activador del canal iónico TRPA1 mediado por la formación de enlaces disulfuro, y la producción conjunta neuronal de NO y H_2S activan el mismo canal. Estos datos proporcionan un fuerte apoyo a una ruta química para la producción biológica de azanona, lo que resulta en una respuesta fisiológica específica.[212]

Finalmente, los resultados presentados en esta tesis, muestran que alcoholes aromáticos o "pseudoaromáticos" (los cuales son reductores moderados), tales como ácido ascórbico e hidroquinona,[219] y compuestos fenólicos como el aminoácido tirosina, reaccionan con NO en una reacción bimolecular para producir eficazmente HNO. Más allá de la novedad química, esta reacción sugiere implicaciones biológicas directas. Por ejemplo, hemos probado la reacción de NO generado en condiciones fisiológicas (macrófagos), con ascorbato. Después de la adición de ascorbato 1 mM se observa un aumento inmediato en la señal, mostrando claramente la formación de HNO (Figura 43).

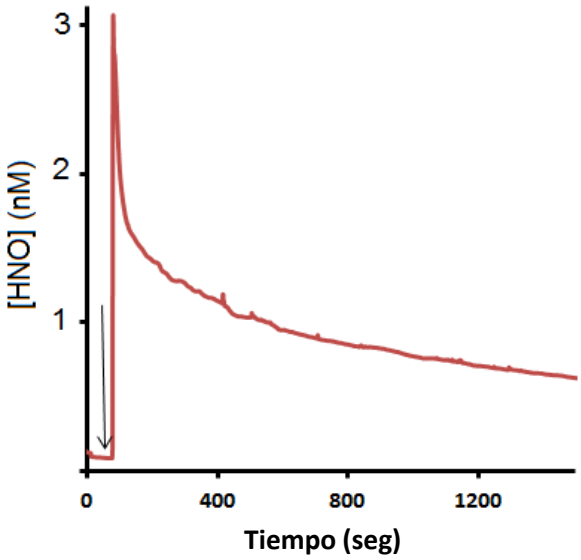


Figura 43. Formación de HNO después de la adición de ascorbato (indicada por la flecha) a los macrófagos immunoestimulados.

Estos resultados, son clara evidencia de una posible fuente de HNO bioquímicamente relevante, ya que estos datos sugieren fuertemente que la azanona podría ser producida en la reacción de NO y $AscH^-$ en condiciones fisiológicas.

Dada la conocida partición del NO en el interior hidrofóbico de membranas biológicas[220] y su papel fisiológico en la mitocondria de plantas y animales,[221,222] puede imaginarse la siguiente situación: en condiciones de hipoxia, se acumulan los intermediarios quinona en cadena respiratoria y aumenta la producción de NO debido a la actividad de nitrito reductasa de la mioglobina,[223] creando una oportunidad ideal para que ocurra la reacción propuesta. Además, la prueba de concepto presentada para la conversión fisiológica de NO a HNO, sugiere que es posible que algunos de los efectos protectores asignados al NO, están en realidad mediados por azanona.[224]

Estos resultados, junto con lo hecho por otros investigadores,[198,210,225] enfatizan el potencial de las reacciones que involucran fuentes endógenas de NO y HNO, particularmente en relación con las diferencias y similitudes en los efectos fisiológicos de ambos. Así como también, las potenciales fuentes bioquímicas de azanona como NO_2^-, hidroxilamina, cianamida, urea, etc.[41,213] Las pruebas definitivas de estas hipótesis necesitan más estudios y abren los caminos para posibles aplicaciones terapéuticas de azanona, tanto en el caso de los dadores como en la comprensión de la producción endógena de HNO.

9 Perspectivas

El futuro de la química-biológica del HNO es muy grande, su papel como intermediario químico, su reactividad y los productos finales en muchas reacciones todavía no se comprende completamente. Su función biológica como molécula mensajera con su propio patrón de efectos en diferentes estados fisio-patológicos, está empezando a surgir y está atrayendo la atención de un número creciente de investigadores biomédicos. No hay que olvidar la posible participación de HNO en el ciclo del nitrógeno, en el contexto de las plantas y el metabolismo microbiano, un campo que se han estudiado poco. Nuestros resultados abren la posibilidad a que se decubran muchas reacciones "insospechadas" entre el NO y otros reductores biológicos pertinentes (acido ascórbico, tirosina, hidroquinona, NADH, aspirina, etc.), dando HNO endógeno. Por último, y en concordancia con lo anterior, el desarrollo de dadores de HNO como profármacos, requiere como evidencia clave la detección del compuesto activo "HNO" *in vivo* en el sitio de acción. El electrodo desarrollado en la presente tesis, ofrece las mejores perspectivas para convertirse en el método de referencia para este tipo de estudios.

Los pasos siguientes serían miniaturizar el electrodo y bajar el límite de detección a la escala picomolar, con el fin de aplicar esta tecnología a los estudios en tejidos vivos en un esfuerzo por revelar la producción endógena de HNO. Algunos ejemplos son los anillos aórticos, células que podrían producir HNO (como liso vascular de las células del músculo) o los macrófagos, entre otros. Resultados preliminares muestran que el electrodo es capaz de detectar azanona en el interior del ventrículo izquierdo de una rata viva después de la inyección de los dadores en una arteria distante. Se puede preveer que el dispositivo desarrollado en el futuro podría ser de ayuda para responder algunas de las preguntas fundamentales relacionadas con la bioquímica de HNO, tales como: ¿se produce azanona endógenamente? Si es así, ¿cómo / dónde se produce? ¿Podría ser un producto de interconversión con NO o es al revés? O las dos cosas? Son algunas de las vías de señalización biológicas hoy atribuibles al NO debidas al HNO?

El hermano un tanto ignorado del NO está creciendo y preparándose para dar ``el gran salto``.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS

(1) Brown, H. W.; Pimentel, G. C. *J. Chem. Phys.* 1958, *29*, 883.

(2) Maier, G.; Reisenauer, H. P.; De Marco, M. *Angew. Chemie Int. Ed.* 1999, *38*, 108.

(3) Luna, A.; Merch, M.; Srn, B.; Roos, O. *Chem. Phys.* 1995, *196*, 437–445.

(4) Guadagnini, R.; Schatz, G. C.; Walch, S. P. *J. Chem. Phys.* 1995, *102*, 774.

(5) Farmer, P.; Kumar, M.; Almaraz, E. *Comments Inorg. Chem.* 2010, *31*, 130–143.

(6) Johns, J. W. C.; McKellar, A. R. W. *J. Chem. Phys.* 1977, *66*, 1217.

(7) Connelly, N. G.; Damhus, T. In *Nomenclature Of Inorganic Chemistry: IUPAC Recommendations 2005 (Red Book)*; Royal Society Of Chemistry, 2005; p. 98.

(8) Parsonage, D.; Greenfield, A. J.; Ferguson, S. J. *BBA-Bioenergetics* 1985, *807*, 81.

(9) Barone, V. *Chem. Phys. Lett.* 1996, *262*, 201–206.

(10) Gutmann, V.; Tannenberger, H. *Monatsh. Chem.* 1956, *87*, 421–424.

(11) Orgel, L. E. *J. Chem. Soc.* 1953, 1276.

(12) Walsh, A. D. *J. Chem. Soc.* 1953, 2288.

(13) Shafirovich, V.; Lymar, S. V. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, *99*, 7340–7345.

(14) Bartberger, M. D.; Liu, W.; Ford, E.; Miranda, K. M.; Switzer, C.; Fukuto, J. M.; Farmer, P. J.; Wink, D. a; Houk, K. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, *99*, 10958.

(15) Tronc, M.; Huetz, A.; Landau, M.; Pichou, F.; Reinhardt, J. *J. Phys. B At. Mol. Phys.* 1975, *8*, 1160–1169.

(16) Teillet-Billy, D.; Fiquet-Fayard, F. *I. Phys. E At. Mol. Phys.* 1977, *10*, 111 – 117.

(17) Szmytkowski, C.; Maciag, K. *J. Phys. B At. Mol. Phys.* 1991, 4273.

(18) Tennyson, J.; Noble, C. *J. Phys. B At. Mol. Phys.* 1986, *19*, 4025.

(19) Montenegro, A. C.; Amorebieta, V. T.; Slep, L. D.; Martín, D. F.; Roncaroli, F.; Murgida, D. H.; Bari, S. E.; Olabe, J. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, *48*, 4213–4216.

(20) Kumar, M. R.; Fukuto, J. M.; Miranda, K. M.; Farmer, P. J. *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 6283–6292.

(21) Cheng, L.; Richter-Addo, G. B. Kadish, K. M.; Smith, K.; Guilard, R., Eds.; Academic Press: San Diego, 2000; pp. 219–291.

(22) Boron, C. I. *Tesis Licenciatura en Biología, FCEN, UBA*, 2009.

(23) Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrns, R. E.; Chaudhuri, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987, *84*, 9265–9269.

(24) Hosoki, R.; Matsuki, N.; Kimura, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, *237*, 527–531.

(25) Metz, G.; Sjostrand, T. *Acta Physiol. Scand.* 1954, *31*, 384–392.

(26) Wang, R. *Faseb J.* 2002, *16*, 1792–1798.

(27) Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Snyder, S. H. *Sci. Signal.* 2009, *2*, 2.

(28) Li, L.; Moore, P. K. *Biochem. Soc. Trans.* 2007, *35*, 1138–1141.

(29) Pae, H. O.; Lee, Y. C.; Jo, E. K.; Chung, H. T. *Arch Pharm Res* 2009, *32*, 1155.

(30) McCleverty, J. A. *Chem. Rev.* 2004, *104*, 403–418.

(31) Ford, P. C. P. C.; Lorkovic, I. M. I. M. *Chem. Rev.* 2002, *102*, 993–1018.

(32) Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. *Science* 1992, *258*, 1898–1902.

(33) Fukuto, J.; Gulati, P.; Nagasawa, H. T. *Biochem. Pharm* 1994, *47*, 922–924.

(34) Väänänen, A. J.; Salmenperä, P.; Hukkanen, M.; Rauhala, P.; Kankuri, E. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, *41*, 120–131.

(35) Stuehr, D. J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, *37*, 339–359.

(36) Lundberg, J. O.; Weitzberg, E. *Arch. Pharm. Res.* 2009, *32*, 1119–1126.

(37) Dejam, A.; Hunter, C. J.; Schechter, A. N.; Gladwin, M. T. *Blood Cells. Mol. Dis.* 2004, *32*, 423–429.

(38) Wink, D. A.; Mitchell, J. B. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, *25*, 434–456.

(39) Wink, D. A.; Grisham, M. B.; Mitchell, J. B.; Ford, P. C. *Methods Enzymol.* 1996, *268*, 12–31.

(40) Miranda, K. M. *Coord. Chem. Rev.* 2005, *249*, 433–455.

(41) Doctorovich, F.; Bikiel, D.; Pellegrino, J.; Suárez, S. A.; Larsen, A.; Martí, M. A. *Coord. Chem. Rev.* 2011, *255*, 2764–2784.

(42) Lancel, S.; Zhang, J.; Evangelista, A.; Trucillo, M. P.; Tong, X.; Siwik, D. A.; Cohen, R. A.; Colucci, W. S. *Circ. Res.* 2009, *104*, 720–723.

(43) Adak, S.; Wang, Q.; Stuehr, D. J. *J. Biol. Chem.* 2000, *275*, 33554–33561.

(44) Sidorkina, O.; Espey, M. G.; Miranda, K. M.; Wink, D. A.; Laval, J. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, *35*, 1431–1438.

(45) Ma, X. L.; Weyrich, A. S.; Lefer, D. J.; Lefer, A. M. *Circ. Res.* 1993, *72*, 403–412.

(46) DeMaster, E. C.; Shirota, F. N.; Nagasawa, H. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, *122*, 358–365.

(47) DeMaster, E.; Nagasawa, H.; Shirota, F. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1983, *18*, 273

(48) Reisz, J. A.; Bechtold, E.; King, S. B. *Dalton Trans.* 2010, *39*, 5203–5212.

(49) DeMaster, E. C.; Shirota, F. N.; Nagasawa, H. T. *Alcohol* 1985, *2*, 117–121.

(50) DeMaster, E. G.; Redfern, B.; Nagasawa, H. *Biochem. Pharmacol.* 1998, *55*, 2007.

(51) Liochev, S. I.; Fridovich, I. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, *34*, 1399–1404.

(52) Fukuto, J. M.; Hszieh, R.; Gulati, P.; Chiang, K. T.; Nagasaw, H. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, *187*, 1367–1373.

(53) Schmidt, H. H. H. W.; Hofmann, H.; Schindler, U.; Shutenko, Z. S.; Cunningham, D. D.; Feelisch, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996, *93*, 14492–14497.

(54) Feelisch, M.; Te Poel, M.; Zamora, R.; Deussen, A.; Moncada, S. *Nature* 1994, *368*, 62–65.

(55) Ishimura, Y.; Gao, Y. T.; Panda, S. P.; Roman, L. J.; Masters, B. S. S.; Weintraub, S. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, *338*, 543–549.

(56) Hobbs, A. J.; Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994, *91*, 10992–10996.

(57) Woodward, J. J.; Nejatyjahromy, Y.; Britt, R. D.; Marletta, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 5105–5113.

(58) Stoll, S.; NejatyJahromy, Y.; Woodward, J. J.; Ozarowski, A.; Marletta, M. A.; Britt, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 11812–11823.

(59) Miranda, K. M.; Nims, R. W.; Thomas, D. D.; Espey, M. G.; Citrin, D.; Bartberger, M. D.; Paolocci, N.; Fukuto, J. M.; Feelisch, M.; Wink, D. A. *J. Inorg. Biochem.* 2003, *93*, 52–60.

(60) Espey, M. G.; Miranda, K. M.; Thomas, D. D.; Wink, D. A. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, *33*, 827–834.

(61) Donzelli, S.; Graham, M.; Flores-Santana, W.; Switzer, C. H.; Yeh, G. C.; Huang, J.; Stuehr, D. J.; King, S. B.; Miranda, K. M.; Wink, D. A.; Espey, M. G. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, *45*, 578–584.

(62) Wink, D. A.; Cook, J. a; Kim, S. Y.; Vodovotz, Y.; Pacelli, R.; Krishna, M. C.; Russo, a; Mitchell, J. B.; Jourd'heuil, D.; Miles, a M.; Grisham, M. B. *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, 11147–11151.

(63) Miranda, K. M.; Dutton, A. S.; Ridnour, L. a; Foreman, C. a; Ford, E.; Paolocci, N.; Katori, T.; Tocchetti, C. G.; Mancardi, D.; Thomas, D. D.; Espey, M. G.; Houk, K. N.; Fukuto, J. M.; Wink, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 722–731.

(64) Niketic, V.; Stojanovic, S.; Nikolic, A.; Michelson, A. M. *Free Rad Biol. Med.* 1999, *27*, 992–996.

(65) S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Thomas, D. Mancardi, C.G. Tocchetti, L. a Ridnour, N. Paolocci, S.B. King, K.M. Miranda, G. Lazzarino, J.M. Fukuto, D. A. Wink, Free Radical Bio. Med., 2006, *40*, 1056-66.

(66) Arnelle, D. R.; Stamler, J. S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, *318*, 279–285.

(67) Kohout, F. C.; Lampe, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, *87*, 5795.

(68) Smith, P. A. S.; Hein, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, *82*, 5731–5740.

(69) Buchholz, J. R.; Powell, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, *85*, 509–511.

(70) Buchholz, J. R.; Powell, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* 1965, *87*, 2350–2353.

(71) Miranda, K. M.; Paolocci, N.; Katori, T.; Thomas, D. D.; Ford, E.; Bartberger, M. D.; Espey, M. G.; Kass, D. A.; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Wink, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, *100*, 9196–9201.

(72) Lymar, S. V; Shafirovich, V.; Poskrebyshev, G. A. *Inorg. Chem.* 2005, *44*, 5212.

(73) Lymar, S. V; Shafirovich, V. *J. Phys. Chem. B* 2007, *111*, 6861–6867.

(74) Goldstein, S.; Czapski, G. *Free Radic. Biol. Med.* 1995, *19*, 505–510.

(75) Huie, R. E.; Padmaja, S. *Free Radic. Res. Commun.* 1993, *18*, 195–199.

(76) Goldstein, S.; Czapski, G. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, *118*, 3419–3425.

(77) Smallwood, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1929, *51*, 1985–1999.

(78) King, S.; Nagasawa, H. *Methods Enzymol.* 1999, *301*, 211.

(79) Bonner, F. T.; Dzelzkalns, L. S.; Bonucci, J. A. *Inorg. Chem.* 1978, *17*, 2487–2494.

(80) Smith, A. L.; Johnston, H. L. *J. Amer. Chem. Soc* 1952, 12–14.

(81) Bryukov, M. G.; Kachanov, A. A.; Timonnen, R.; Seetula, J.; Vandoren, J.; Sarkisov, O. M. *Chem. Phys. Lett.* 1993, *208*, 392–398.

(82) Doyle, M. P.; Mahapatro, S. N.; Broene, R. D.; Guy, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, *110*, 593–599.

(83) Wong, P.; Hyun, J.; Fukuto, J. *Biochemistry* 1998, *37*, 5362–5371.

(84) Donzelli, S.; Espey, M. G.; Thomas, D. D.; Mancardi, D.; Tocchetti, C. G.; Ridnour, L.; Paolocci, N.; King, S. B.; Miranda, K. M.; Lazzarino, G.; Fukuto, J. M.; Wink, D. a. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, *40*, 1056–1066.

(85) Miranda, K. M.; Nagasawa, H. T.; Toscano, J. P. *Curr. Top. Med. Chem.* 2005, *5*, 649–664.

(86) Veprek-Siska, J.; Pliska, V.; Smirous, F.; Visely, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1959, *24*, 687–693.

(87) Hughes, M. N.; Wimbledon, P. E. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 1976, *8*, 703–707.

(88) Bonner, F. T.; Ko, Y. H. *Inorg. Chem.* 1992, *31*, 2514–2519.

(89) Seel, F.; Bliefert, C. *Z. Anorg.Allg. Chem.* 1972, *394*, 187–196.

(90) Zeng, B.-B.; Huang, J.; Wright, M. W.; King, S. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, *14*, 5565–5568.

(91) Guthrie, D. a; Kim, N. Y.; Siegler, M. a; Moore, C. D.; Toscano, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, *134*, 1962–1965.

(92) Thomas, D.; Miranda, K.; Graham, M.; Espey, D. C.; Jourd'heuil, D.; Paolocci, N.; Hewett, S. J.; Colton, C. A.; Grisham, M. B.; Feelisch, M.; Wink, D. A. *Methods Enzymol.* 2002, *359*, 84–105.

(93) Salmon, D. J.; Holding, C. L. T. De; Thomas, L.; Peterson, K. V; Goodman, G. P.; Saavedra, J. E.; Srinivasan, A.; Davies, K. M.; Keefer, L. K.; Miranda, K. M.; Torres de Holding, C. L. *Inorg. Chem.* 2011, *50*, 3262–3270.

(94) Andrei, D.; Salmon, D. J.; Donzelli, S.; Wahab, A.; Klose, J. R.; Citro, M. L.; Saavedra, J. E.; Wink, D. A.; Miranda, K. M.; Keefer, L. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 16526–16532.

(95) Sha, X.; Isbell, T. S.; Patel, R. P.; Day, C. S.; King, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 9687–9692.

(96) Dumond, J. F.; Wright, M. W.; King, S. B. *J. Inorg. Biochem.* 2013, *118*, 140–147.

(97) Adachi, Y.; Nakagawa, H.; Matsuo, K.; Suzuki, T.; Miyata, N. *Chem. Commun. (Camb).* 2008, 5149–5151.

(98) Matsuo, K.; Nakagawa, H.; Adachi, Y.; Kameda, E.; Tsumoto, H.; Suzuki, T.; Miyata, N. *Chem. Commun. (Camb).* 2010, *46*, 3788–3790.

(99) Nakagawa, H. *J. Inorg. Biochem.* 2013, *118*, 187–190.

(100) Bartberger, M. D.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, *98*, 2194–2198.

(101) Ford, P. C. *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 6226–6239.

(102) Hoshino, M.; Laverman, L.; Ford, P. C. *Coord. Chem. Rev.* 1999, *187*, 75–102.

(103) Kadish, K. M. *The porphyrin handbook*; Academic Press, 2000.

(104) Richter-Addo, G. B.; Legzdins, P. *Metal nitrosyls*; Oxford Uni.; New York, 1992.

(105) Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1974, *96*, 5002–5004.

(106) Westcott, B. L.; Enemark, J. H. *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy*; John Wiley & Sons: New York, 1999.

(107) Enemark, J. H.; Feltham, R. D. *Coord. Chem. Rev.* 1974, *13*, 339–406.

(108) Wyllie, G. R. A.; Scheidt, W. R. *Chem. Rev.* 2002, *102*, 1067–1090.

(109) Pellegrino, J.; Bari, S. E.; Bikiel, D. E.; Doctorovich, F. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 989–995.

(110) Laverman, L. E.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc* 2001, *123*, 11614–11622.

(111) Wayland, B. B.; Olson, L. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1974, *96*, 6037–6041.

(112) Hoshino, M.; Maeda, M.; Konishi, R.; Seki, H.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, *118*, 5702–5707.

(113) Spasojevic, I.; Batini-Haberle, I.; Fridovich, I. *Nitric Oxide* 2000, *4*, 526–533.

(114) Zahran, Z. N.; Lee, J.; Alguindigue, S. S.; Khan, M. A.; Richter-Addo, G. B. *Dalton Trans.* 2004, 44–50.

(115) Scheidt, W. R.; Hoard, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1973, *95*, 8281–8288.

(116) Roncaroli, F.; Eldik, R. Van. *J. Am Chem Soc.* 2006, *128*, 8042–8053.

(117) Schopfer, M. P.; Wang, J.; Karlin, K. D. *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 6267–6282.

(118) Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, *1757*, 969.

(119) Praneeth, V. K. K; Näther, C.; Peters, G.; Lehnert, N. *Inorg. Chem.* 2006, *45*, 2795 .

(120) Collman, J. P.; Dey, A.; Yang, Y.; Decréau, R. A.; Ohta, T.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, *130*, 16498–16499.

(121) Collman, J. P.; Yang, Y.; Dey, A.; Decréau, R.; Ghosh, S.; Ohta, T.; Solomon, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008, *105*, 15660–15665.

(122) Bari, S. E.; Martí, M. A.; Amorebieta, V. T.; Estrin, D. A.; Doctorovich, F. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 15272–15273.

(123) Martí, M. A.; Bari, S. E.; Estrin, D. A.; Doctorovich, F. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 4680–4684.

(124) Suárez, S. A.; Martí, M. A.; De Biase, P. M.; Estrin, D. a.; Bari, S. E.; Doctorovich, F. *Polyhedron* 2007, *26*, 4673–4679.

(125) Whitten, D. G.; Baker, E. W.; Corwin, A. H. *J. Org. Chem.* 1963, *28*, 2363–2368.

(126) Suárez, S. A.; Fonticelli, M. H.; Rubert, A.; de la Llave, E.; Scherlis, D.; Salvarezza, R. C.; Martí, M. A; Doctorovich, F. *Inorg. Chem.* 2010, *49*, 6955–6966.

(127) Bazylinski, D. A.; Hollocher, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, *107*, 7982–7986.

(128) Dutton, A. S.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 3795–3800.

(129) Álvarez, L.; Suarez, S. A.; Bikiel, D. E.; Reboucas, J. S.; Batinić-Haberle, I.; Martí, M. A.; Doctorovich, F. *Inorg. Chem.* 2014, *53*, 7351–7360.

(130) Wilkins, P. C.; Jacobs, H. K.; Johnson, M. D.; Gopalan, A. S. *Inorg. Chem.* 2004, *43*, 7877.

(131) Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Tse, H.; Tovmasyan, A.; St. Clair D., K.; Vujaskovic, Z.; Dewhirst, M. D.; Piganelli, J. D. *Amino Acids* 2012, *42*, 95–113.

(132) Cline, M. R.; Tu, C.; Silverman, D. N.; Toscano, J. P. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, *50*, 1274–1279.

(133) Reisz, J. a; Zink, C. N.; King, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 11675–11685.

(134) Dobmeier, K. P.; Riccio, D. A.; Schoenfisch, M. H. *Anal. Chem.* 2008, *80*, 1247.

(135) Rosenthal, J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 5536–5537.

(136) Zhou, Y.; Liu, K.; Li, J.-Y.; Fang, Y.; Zhao, T.-C.; Yao, C. *Org. Lett.* 2011, *13*, 2357–2360.

(137) Shoeman, D. W.; Shirota, F. N.; DeMaster, E. G.; Nagasawa, H. T. *Alcohol* 2000, *20*, 55–59.

(138) Pino, R. Z.; Feelisch, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, *201*, 54–62.

(139) Donzelli, S.; Espey, M. G.; Flores-Santana, W.; Switzer, C. H.; Yeh, G. C.; Huang, J.; Stuehr, D. J.; King, S. B.; Miranda, K. M.; Wink, D. a. *Free Radic. Biol. Med.* 2008, *45*, 578–584.

(140) Boron, I.; Suárez, S. A.; Doctorovich, F.; Martí, M. A.; Bari, S. E. *J. Inorg. Biochem.* 2011, *105*, 1044–1049.

(141) Tennyson, A. G.; Do, L.; Smith, R. C.; Lippard, S. J. *Nitric Oxide* 2006, *26*, 1–21.

(142) Samuni, U.; Samuni, Y.; Goldstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 8428–8432.

(143) Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 8820–8828.

(144) Lim, M. D.; Lorkovic, I. M.; Ford, P. C. *Inorg. Chem.* 2002, *41*, 1026–1028.

(145) Lambert, R. M. *Chem. Commun.* 1966, 850.

(146) Samuni, U.; Samuni, Y.; Goldstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 8428–8432.

(147) Bobko, A.; Ivanov, A.; Khramtsov, V. *Free Radic. Res.* 2013, *47*, 74–81.

(148) Hughes, M.; Cammack, R. *Methods Enzymol.* 1999, *301*, 279–287.

(149) Piloty, O. *Ber. Dtsch. Ges.* 1896, *29*, 1559.

(150) Porcheddu, A.; De Luca, L.; Giacomelli, G. *Synlett* 2009, 2149–2153.

(151) Blackburn, G. M.; Mann, B. E.; Taylor, B. F.; Worrall, A. F. *Eur. J. Biochem.* 1985, *153*, 553–558.

(152) Toscano, J. P.; Brookfield, F. A.; Cohen, Andrew D. Courtney, Stephen Martin Frost, L. M.; Kalish, V. J., WO 2007/109175 A1

(153) Scholz, J. N.; Engel, P. S.; Glidewell, C.; Whitmire, K. H. *Tetrahedron* 1989, *45*, 7695–7708.

(154) Turjanski, A. G.; F. Leonik, D. A. Estrin, R. E. Rosenstein, F. Doctorovich, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, *122*, 10468-10469..

(155) De Biase, P. M.; Turjanski, A. G.; Estrin, D. a; Doctorovich, F. *J. Org. Chem.* 2005, *70*, 5790–5798.

(156) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications. 2nd Edition.*; Wiley & So.; New York, 2001.

(157) Glasstone, S. *An Introduction to Electrochemistry*; Read Books, 2007; p. 568.

(158) Suga, S.; Sekiyama, A. *Photoelectron Spectroscopy*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014; Vol. 176.

(159) Watts, J. F.; Wolstenholme, J. *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2003.

(160) Bowker, M.; Davies, P. R. 2010; p. 258.

(161) Chen, C. *Introduction to scanning tunneling microscopy*, Oxford Press, 1993.

(162) Oura, K.; Saranin, A.; Zotof, A. *Surface science: an introduction*, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH Co., 2003.

(163) Bonnell, D. (Ed.). *Scanning probe microscopy and spectroscopy: theory, techniques, and applications*, Wiley, 2001.

(164) Pong, W.-T.; Bendall, J.; Durkan, C. *Surf. Sci.* 2007, *601*, 498–509.

(165) Martin, H.; Vericat, C.; Andreasen, G.; Hernandez Creus, A.; Vela, M. E.; Salvarezza, R. C. *Langmuir* 2001, *17*, 2334–2339.

(166) Bunge, E.; Nichols, R. J.; Roelfs, B.; Meyer, H.; Baumgartel, H. *Langmuir* 1996, *12*, 3060–3066.

(167) Http://www.quantum-espresso.org. .

(168) Vanderbilt, D. *Phys. Rev. B* 1990, *41*, 7892.

(169) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. *Phys. Rev. Lett.* 1996, *77*, 3865–3868.

(170) Monkhorst, H.; Pack, J. *Phys. Rev. B* 1976, *13*, 5188.

(171) Richter-Addo, G. B.; Hodge, S. J.; Yi, G. B.; Khan, M. A.; Ma, T.; Van Caemelbecke, E.; Guo, N.; Kadish, K. M. *Inorg. Chem* 1996, *35*, 6530–6538.

(172) Kelly, S.; Lancon, D.; Kadish, K. M. *Inorg. Chem.* 1984, *23*, 1451–1458.

(173) Yoshimoto, S.; Suto, K.; Tada, A.; Kobayashi, N.; Itaya, K. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 8020–8027.

(174) Berner, S.; Lidbaum, H.; Ledung, G. *Appl. Surf.* 2007, *253*, 7540–7548.

(175) Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G. A.; Gago, J. A. M.; Torrelles, X.; Salvarezza, R. C. *J. Phys. Condens. Matter* 2006, *18*, R867–R900.

(176) Yang, Y. W.; Fan, L. J. *Langmuir* 2002, *18*, 1157–1164.

(177) Heister, K.; Zharnikov, M.; Grunze, M.; Johansson, L. S.; Ulman, A. *Langmuir* 2000, *17*, 8–11.

(178) Zhong, C.-J.; Brush, R. C.; Anderegg, J.; Porter, M. D. *Langmuir* 1998, *15*, 518.

(179) Ishida, T.; Choi, N.; Mizutani, W.; Tokumoto, H.; Kojima, I.; Azehara, H.; Hokari, H.; Akiba, U.; Fujihira, M. *Langmuir* 1999, *15*, 6799–6806.

(180) Berner, S.; Biela, S.; Ledung, G.; Gogoll, A.; Backvall, J.; Puglia, C.; Oscarsson, S. J. *Catal.* 2006, *244*, 86–91.

(181) Turner, M.; Vaughan, O. P. H.; Kyriakou, G.; Watson, D. J.; Scherer, L. J.; Davidson, G. J. E.; Sanders, J. K. M.; Lambert, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 1910.

(182) Wirde, M.; Gelius, U.; Nyholm, L. *Langmuir* 1999, *15*, 6370–6378.

(183) Yoshimoto, S. E. T.; Suto, K.; Honda, Y.; Itaya, K. *Chem. Phys.* 2005, *319*, 147.

(184) Hipps, K. W.; Lu, X.; Wang, X. D.; Mazur, U. J. *Phys. Chem* 1996, *100*, 11207.

(185) Yang, F.; Wilde, C. P.; Morin, M. *Langmuir* 1996, *12*, 6570–6577.

(186) Walczak, M. M.; Popenoe, D. D.; Deinhammer, R. S.; Lamp, B. D.; Chung, C.; Porter, M. D. *Langmuir* 1991, *7*, 2687–2693.

(187) Angerstein-Kozlowska, H.; Conway, B. E.; Hamelin, A.; Stoicoviciu, L. *J. Elec. Chem.* 1987, *228*, 429.

(188) Flechtner, K.; Kretschmann, A.; Steinrück, H.; Gottfried, J. M. *J. Catal.* 3–5.

(189) Hieringer, W.; Flechtner, K.; Kretschmann, A.; Seufert, K.; Auwärter, W.; Barth, J. V; Görling, A.; Steinrück, H.-P.; Gottfried, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 6206–6222.

(190) Bonner, F. T.; Hughes, M. N.; Poole, R. K.; Scott, R. I. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* 1991, *1056*, 133–138.

(191) Rosenthal, J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, *132*, 5536–5537.

(192) French, D. C.; Crumrine, D. S. *J. Org. Chem.* 1990, *55*, 5494–5496.

(193) Angeli, A. *Chem. Zentralbl.* 1902, *73*, 691.

(194) Exner, O. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1964, *29*, 1337.

(195) Armstrong, D. A.; Huie, R. E.; Lymar, S.; Koppenol, W. H.; Merényi, G.; Neta, P.; Stanbury, D. M.; Steenken, S.; Wardman, P. *Bioinorg. React. Mech.* 2013, *9*, 59–61.

(196) Bruce King, S. *Free Radic. Biol. Med.* 2013, *55*, 1–7.

(197) Filipovic, M. R. M.; Miljkovic, J. L. J.; Nauser, T.; Royzen, M.; Klos, K.; Shubina, T.; Koppenol, W. H.; Lippard, S. J.; Ivanović-Burmazović, I.; Ivanovic, I. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, *134*, 12016–12027.

(198) Filipovic, M. R.; Eberhardt, M.; Prokopovic, V.; Mijuskovic, A.; Orescanin-Dusic, Z.; Reeh, P.; Ivanovic-Burmazovic, I. *J. Med. Chem.* 2013, *56*, 1499–1508.

(199) Miljkovic, J. L.; Kenkel, I.; Ivanović-Burmazović, I.; Filipovic, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013, *52*, 12061–12064.

(200) Clyne, M. A. A.; Thrush, B. A. *Trans. Faraday Soc.* 1961, *57*, 1305–1314.

(201) Cashion, J. K.; Polanyi, J. C. *J. Chem. Phys.* 1959, *30*, 317.

(202) Strausz, O. P.; Gunning, H. E. *Trans. Faraday Soc.* 1964, *60*, 347.

(203) Sirsalmath, K.; Suárez, S. A.; Bikiel, D. E.; Doctorovich, F. *J. Inorg. Biochem.* 2013, *118*, 134–139.

(204) Heinecke, J. L.; Khin, C.; Pereira, J. C. M.; Suárez, S. A.; Iretskii, A. V; Doctorovich, F.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, *135*, 4007–4017.

(205) Suárez, S.; Bikiel, D.; Wetzler, D.; Martí, M. A.; Doctorovich, F. *Anal. Chem.* 2013, *85*, 10262−10269.

(206) Benon, H. J.; Bielski, A.; Allen, O.; Schwarz, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1981, *103*, 3516–3518.

(207) Kytzia, A.; Korth, H.; Sustmann, R.; Groot, H. De; Kirsch, M. *Chem. Eur. J.* 2006, 8786–8797.

(208) Kirsch, M.; Büscher, A.-M.; Aker, S.; Schulz, R.; de Groot, H. *Org. Biomol. Chem.* 2009, *7*, 1954–1962.

(209) Zee, J. van der; Broek, P. J. A. van den. *Free Radic. Biol. Med.* 1998, *25*, 282–286.

(210) Heinecke, J.; Ford, P. C. *Coord. Chem. Rev.* 2010, *254*, 235–247.

(211) Yenes, S.; Messeguer, A. *Tetrahedron* 1999, *55*, 14111–14122.

(212) Eberhardt, M.; Dux, M.; Namer, B.; Miljkovic, J.; Cordasic, N.; Will, C.; Kichko, T. I.; Roche, J. de la; Fischer, M.; Bikiel, D.; Suárez, S. A.; Dorsch, K.; Leffler, A.; Babes, A.; Lampert, A.; Lennerz, J. K.; Jacobi, J.; Martí, M. A.; Doctorovich, F.; Högestätt, E. D.; Zygmunt, P. M.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Messlinger, K.; Reeh, P.; Filipovic, M. R. *Nat. Comm.* 2014, *5*, Article number: 4381.

(213) Fukuto, J. M.; Cisneros, C. J.; Kinkade, R. L. *J. Inorg. Biochem.* 2013, *118*, 201.

(214) Miranda, K. M.; Paolocci, N.; Katori, T.; Thomas, D. D.; Ford, E.; Bartberger, M. D.; Espey, M. G.; Kass, D. a; Feelisch, M.; Fukuto, J. M.; Wink, D. a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, *100*, 9196–9201.

(215) Paolocci, N.; Saavedra, W. F.; Miranda, K. M.; Martignani, C.; Isoda, T.; Hare, J. M.; Espey, M. G.; Fukuto, J. M.; Feelisch, M.; Wink, D. A.; Kass, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, *98*, 10463–10468.

(216) Rousseau, D. L.; Li, D.; Couture, M.; Yeh, S.-R. *J. Inorg. Biochem.* 2005, *99*, 306.

(217) Sabat, J.; Egawa, T.; Lu, C.; Stuehr, D. J.; Gerfen, G. J.; Rousseau, D. L.; Yeh, S.-R. *J. Biol. Chem.* 2013, *288*, 6095–6106.

(218) Li, D.; Kabir, M.; Stuehr, D. J.; Rousseau, D. L.; Yeh, S.-R. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 6943–6951.

(219) Suarez, S. A.; Neuman, N.; Muñoz, M.; Alvarez, L.; Brondino, C.; Bikiel, D. E.; Martí, M. A.; Doctorovich, F. enviado a *J. Am. Chem. Soc*, Noviembre 2014.

(220) Liu, X.; Miller, M. J.; Joshi, M. S.; Thomas, D. D.; Lancaster, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, *95*, 2175–2179.

(221) Kamga, C.; Krishnamurthy, S.; Shiva, S. *Nitric Oxide* 2012, *26*, 251–258.

(222) Gupta, K. J.; Igamberdiev, A. U.; Manjunatha, G.; Segu, S.; Moran, J. F.; Neelawarne, B.; Bauwe, H.; Kaiser, W. M. *Plant Sci.* 2011, *181*, 520–526.

(223) Shiva, S.; Huang, Z.; Grubina, R.; Sun, J.; Ringwood, L. A.; MacArthur, P. H.; Xu, X.; Murphy, E.; Darley-Usmar, V. M.; Gladwin, M. T. *Circ. Res.* 2007, *100*, 654–661.

(224) Chouchani, E. T.; Methner, C.; Nadtochiy, S. M.; Logan, A.; Pell, V. R.; Ding, S.; James, A. M.; Cochemé, H. M.; Reinhold, J.; Lilley, K. S.; Partridge, L.; Fearnley, I. M.; Robinson, A. J.; Hartley, R. C.; Smith, R. A. J.; Krieg, T.; Brookes, P. S.; Murphy, M. P. *Nat. Med.* 2013, *19*, 753–759.

(225) Switzer, C. H.; Miller, T. W.; Farmer, P. J.; Fukuto, J. M. *J. Inorg. Biochem.* 2013, *118*, 128–133.

10. Publicaciones realizadas durante la Tesis

1. *Nitric oxide is reduced to HNO (azanone) by ascorbic acid, tyrosine, and other alcohols. A new route for azanone formation in biological media.* **Sebastián A. Suarez,** Nicolás I. Neuman, Martina Muñoz, Lucia Alvarez, Damián E. Bikiel, Carlos Brondino, Ivana Ivanović-Burmazović, Jan Lj. Miljkovic, Milos R. Filipovic, Marcelo A. Martí and Fabio Doctorovich, *Journal of the American Chemical Society*, enviado Noviembre 2014.
2. *Gold and silver adsorbed cobalt porphyrins used for catalytic water splitting.* Miguel A. Morales Vásquez, **Sebastián A. Suárez** and Fabio Doctorovich, *Materials Chemistry and Physics*, enviado, Octubre 2014.
3. *Reactions of HNO with Metal Porphyrins: Underscoring the Biological Relevance of HNO.* Fabio Doctorovich, Damian Bikiel, Juan Pellegrino, **Sebastián A. Suárez** y Marcelo A. Martí, *Accounts of Chemical Research*, 47 (10), 2907-2916, Agosto 2014.
4. *Redox potential determines the mechanism of azanone donor reactions with Mn and Fe Porphyrins: defining the best HNO traps*. Lucía Álvarez, **Sebastián A. Suarez**, Damian E. Bikiel, Ines Batinić-Haberle, Julio S Reboucas, Marcelo A. Martí y Fabio Doctorovich, *Inorganic Chemistry*, 53 (14), pp 7351–7360, Julio 2014.
5. *H_2S and no generate nitroxyl and activate hno-trpa1-cgrp pathway for neurovascular control.* Mirjam Eberhardt, Maria Dux, Barbara Namer, Jan Miljkovic, Nada Cordasic, Christine Will, Tatjana I. Kichko, Jeanne de la Roche, Michael Fischer, Damian Bikiel, **Sebastián A. Suárez**, Karola Dorsch, Andreas Leffler, Alexandru Babes, Angelika Lampert, Jochen K. Lennerz, Johannes Jacobi, Marcelo A. Martí, Fabio Doctorovich, Edward D. Högestätt, Peter M. Zygmunt, Ivana Ivanovic-Burmazovic, Karl Messlinger, Peter Reeh, Milos R Filipovic, *Nature Communications*, 5, Article number: 4381, Junio 2014.
6. *N- Nitrosomelatonin enhances photic synchronization of mammalian circadian rhythms.* Fernando M. Baidanoff, Santiago A. Plano, Fabio Doctorovich, **Sebastián A. Suárez**, Diego A. Golombek y Juan J. Chiesa, Journal of Neurochemistry, 129, 60 – 71, Noviembre 2013.
7. *Time Resolved Electrochemical Quantification of Azanone (HNO) at Low Nanomolar Level.* **Sebastian A Suarez**, Damian E Bikiel, Diana Wetzler, Marcelo Marti y Fabio Doctorovich, Analitycal Chemistry, 85, 10262 – 10269, agosto 2013.

8. *Nitrite reduction mediated by heme models. Routes to NO and HNO?.* Julie L. Heinecke, Chosu Khin, Jose Clayston Melo Pereira, **Sebastián A. Suárez**, Alexei V. Iretskii, Fabio Doctorovich y Peter C. Ford, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, *135* (10), pp 4007–4017, Marzo 2013.
9. *The pH of HNO donation is modulated by ring substituents in Piloty's acid derivatives: azanone donors at biological pH*. Kiran Sirsalmath, **Sebastián Suárez**, Damian Bikiel, y Fabio Doctorovich, Journal of Inorganic Biochemistry, 118, 134-139, Enero 2013
10. *Nitroxyl (azanone) trapping by metalloporphyrins*. Fabio Doctorovich, Damian Bikiel, Juan Pellegrino, **Sebastián A. Suárez**, Anna Larsen y Marcelo A. Martí, Coordination Chemistry Reviews, 255, 2764 – 2784, Dic 2011
11. *A Protective Protein Matrix Improves the Discrimination of Nitroxyl from Nitric Oxide by MnIII Protoporphyrinate IX in Aerobic Media.* Ignacio Boron, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich, Marcelo A. Martí y Sara E. Bari, Journal of Inorganic Biochemistry, 105, 1044–1049, Mayo 2011
12. *Stabilization and detection of nitroxyl by iron and cobalt porphyrins in solution and on surfaces*. Fabio Doctorovich, Damian Bikiel, Juan Pellegrino, **Sebastián A. Suárez** y Marcelo A. Martí, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 14 (12), p. 1012-1018, Diciembre 2010.
13. *A Surface Effect Allows HNO/NO Discrimination by a Cobalt Porphyrin Bound to Gold.* **Sebastián A. Suárez**, Mariano Fonticelli, Aldo Rupert, Ezequiel de la Llave, Damian Scherlis, Roberto Salvarezza, Marcelo A. Martí y Fabio Doctorovich. Inorganic Chemistry, 45 (15), p. 6955-6966, Julio 2010.

Capítulos de Libro

1. *How to find an HNO needle in a (bio)-chemical Haystack.* Fabio Doctorovich, Damian E. Bikiel, Juan Pellegrino, **Sebastián A. Suárez** y Marcelo A. Martí. Progress in Inorganic Chemistry, 58, 145 – 183, Abril 2014
2. *Azanone (HNO) interaction with (heme)-proteins and metalloporphyrins.* Doctorovich F., Bikiel D. E., Pellegrino J., **Sebastián A. Suárez**. y Martí M. A. Advances in Inorganic Chemistry Vol 64: Thematic issue devoted to Inorganic/Bioinorganic Reaction Mechanisms, p. 97 – 139, 2012.

Publicaciones en el área de cristalografía realizadas durante la tesis

1. *Two drimane lactones, valdiviolide and 11-epivaldiviolide, in the form of a 1:1 cocrystal obtained from Drimys winteri extracts*. Paz Robles, C., Mercado, D., **Suarez, S.** y Baggio, R. (2014). Crystallographica Section C: Structural Chemistry, C70, 1112 - 1115, Octubre 2014.
2. *Hobartine: an indole Alkaloid from Aristotelia chilensis.* Cristian Paz Robles, Natalia Badilla Vidal, **Sebastian Suarez** y Ricardo Baggio. Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, C70, 1075-1078, Octubre 2014.
3. *Dendocarbin A a sesquiterpene lactone from Drimys winteri.* Cristian Paz Robles, Dario Mercado, **Sebastian Suarez** y Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, C70, 1007-1010, Octubre 2014.
4. *The topotactic dehydration of monoclinic [Co(pht)(bpy)(H_2O)$_2$](H_2O) into orthorhombic [Co(pht)(bpy)(H_2O)$_2$]n (pht: phthalato; bpy: 4,4'-bipyridine).* Miguel Angel Harvey, **Sebastian Suarez**, Fabio D. Cukiernik y Ricardo Baggio. Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, C70, 978 – 982, Septiembre 2014.
5. *Structure of the {[Co(pht)(bpy)(H_2O)].3(H_2O)}$_n$ complex (pht=phthalato; bpy= 4,4'-bipyridine) and the role of the hydration water clusters in structure stability.* Miguel Ángel Harvey, **Sebastián Suarez**, Fabio Doctorovich, Fabio D. Cukiernik y Ricardo Baggio. Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C70, 440-444, Marzo 2014.
6. *Three transition metal complexes with the macrocyclic ligand meso-5,7,7,12,14,14-hexamethyl-1,4,8,11 -tetraazatetradecane, $C_{18}H_{40}N_4$, (L), viz.: Cu(L)(ClO_4)$_2$ (I), Zn(L)(NO_3)$_2$ (II) and Cu(L)Cl(H_2O).Cl (III).* Sabina Yasmin, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich, Tapashi G. Roy and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C69, 862-867, Julio 2013.
7. *Two isomorphous transition metal complexes displaying a coordinated tetra-thio-nate unit: (bis-(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)-tetra-thio-nate- Tr, dimethyl-formamide solvate [Tr = Cadmium(II), Zinc(II)].* Miguel A. Harvey, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C69, 745-749, Julio 2013.
8. *Two solvatomorphic forms of a copper complex formulated as Cu(L)(ClO_4)$_2$.2(H_2O) (I) and Cu(L)(ClO_4)$_2$ (II), where L is 3,10-meso-3,5,7,7,10,12,14,14-Octamethyl - 1,4,8,11*

-tetraazatetradecane, $C_{18}H_{40}N_4$. Chandra Nath Babul, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich, Tapashi G. Roy and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C69, 689-695, Julio 2013.

9. *A recurrent motive in the supramolecular assembly of coordination compounds with 2,6-bis(benzimidazol-2-yl) piridine (Bzimpy) and two identical H-bond acceptor co-ligands: $[Cd(Ac)_2(Bzimpy)]$, $[Zn(Ac)_2(Bzimpy)]\cdot H_2O$ (Ac: acetato) and related compounds*. Miguel A. Harvey, Sergio Baggio, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich, Journal of Chemical Crystallography, 43, 275-281, Mayo 2013.
10. *Tetra-aqua-(4,4'-bimethyl-2,2'-bipyridine)-nickel(ii) sulfate hydrate: a simple structure with an extremely complex H-bonding scheme.* **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich, Miguel A. Harvey and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C69, 351 - 355, Abril 2013.
11. *Tris(1,10-phenathroline-N,N') -nickel(ii) peroxodisulfate(vi) bi(N,Ndimethylformamide) solvate hydrate.* Miguel A. Harvey, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich y Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E69, m63-m64, Feb 2013.
12. *A new polymorph of Bis[2,6-bis(1H-benzimidazol-2-yl-κN3)- pyridinato-κN]zinc(II).* Miguel A. Harvey, **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Comunications, C69, 47-51, Enero 2013.
13. *Di(acetate-O,O')-(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) zinc(II).* Miguel A. Harvey, **Sebastián A. Suárez**, Andres Ibañez, Fabio Doctorovich and Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E68, o1377-1378, Octubre 2012.
14. *3-Methyl-5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thione, the role of weak non-bonding interactions in the structure packing*. **Sebastián A. Suárez**, Saroj K. S. Hazari, Biplab Ganguly, Fabio Doctorovich, Tapashi G. Roy y Ricardo Baggio, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E68, o3045-o3046, Septiembre 2012.
15. *Bis(4-methylphenylsulfonyl)amino 4-methylbenzenesulfonate: a new member of the $(RSO_2)ON(SO_2R)_2$ family*. **Sebastián Suárez**, Fabio Doctorovich y Ricardo Baggio, Acta Cryst. SectionC: Crystal Structure Communications, C68, o417-o420, Sept 2012.
16. *Benzyl-3-(E) Furan-2-ylmehtylene-2-methylditiocarbazate.* Benu K. Dey, **Sebastián A. Suárez**, Biplab Ganguly, Fabio Doctorovich y Tapashi G. Roy, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E68, o2752, Agosto 2012.

17. *Ammonium 4-methoxybenzenesulfonate*. **Sebastián A. Suárez**, Fabio Doctorovich y Ricardo Baggio, Acta Cryst. Section E: Structure Reports, E68, o2228-29, Junio 2012
18. *Methyl 3-(2-hydroxybenzylidene)-2-methyldithiocarbazate.* S. K. S. Hazari, **Sebastián A. Suárez**, Biplab Ganguly, Fabio Doctorovich y Tapashi G. Roy, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E68, *o1533*, Abril 2012
19. *N-butyl pyridinium undecachloro–carbadodecaborate structure and its comparison with similar compounds*. **Sebastián A. Suárez**, Ana Foi, Shawn Eady, Anna Larsen y Fabio Doctorovich, Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications, C67, o417-o420, Agosto 2011.
20. *Chlorobis(1-naphthyl)phosphine.* Ana Foi, **Sebastián A. Suárez** y Fabio Doctorovich, Acta Crystallographica Section E: Structure Reports, E67, o2524, Agosto 2011.