



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**Interconversión •NO/HNO en sistemas inorgánicos
por acción de compuestos azufrados
biológicamente relevantes**

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

Lic. Paola Elizabeth Vargas

Director de Tesis: Dr. Fabio Doctorovich

Director Adjunto de Tesis: Dr. Sebastián Suarez

Consejera de Estudios: Dra. María Ana Castro

Lugar de trabajo: Departamento de Química Inorgánica, Analítica y
Química Física- Instituto de Química, Física de Materiales, Medio Ambiente
y Energía- Universidad de Buenos Aires

Fecha de presentación: Buenos Aires, 15 de julio del 2025

Resumen

La azanona (nitroxilo, HNO) es el congénere reducido en un electrón del óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) y comparte con él muchos aspectos tal como su reactividad hacia tioles, O_2 , hemoproteínas, metales de transición, entre otros. Sin embargo, las vías bioquímicas en las que estas especies están involucradas son muy diferentes. El HNO presenta propiedades únicas, como efectos inotrópicos y lusitrópicos positivos, junto con resistencia a la eliminación por especies reactivas del oxígeno (ROS), en particular el superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Debido al gran potencial de aplicación en el área médica, en las dos últimas décadas, se ha intensificado la investigación sobre el HNO, centrándose en su reactividad y en la perspectiva de su producción endógena. En este contexto, el hilo conductor de esta tesis es la formación de HNO a partir de la reacción de $\bullet\text{NO}$ con especies azufradas en diferentes condiciones. En el capítulo 1 se expondrá una recopilación de información bibliográfica concerniente al $\bullet\text{NO}$ y al HNO así como su interconversión. En el capítulo 2 se presentarán las técnicas experimentales utilizadas para la determinación de intermediarios, productos y parámetros cinéticos. Asimismo, se detallarán los procedimientos implementados para establecer y conservar una atmósfera estrictamente anaeróbica durante el tiempo requerido, condición esencial para prevenir descomposiciones y modificaciones en las cinéticas o productos objeto de estudio. El capítulo 3 se centrará en el análisis cinético, computacional y de productos finales de la reacción en solución entre ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) y $\bullet\text{NO}$. Este compuesto reductor tiene un uso extendido en la industria y la investigación, especialmente cuando se busca inducir el estado reducido en determinadas enzimas. En estos estudios se ha detectado la presencia de interferencias atribuidas al $\bullet\text{NO}$ en el medio, lo que sugiere una posible reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$. Además, su potencial de reducción negativo indica la viabilidad de que actúe sobre $\bullet\text{NO}$, favoreciendo la generación de HNO. El capítulo 4 se centrará en el análisis de intermediarios (HNO) y productos finales de la reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso. Si bien esta reacción ya se había estudiado anteriormente en solución, en esta tesis se presenta un nuevo método en el que se excluye la utilización de líquidos. Esta ventaja permite obtener HNO en fase gaseosa, lo que muestra un enorme potencial de aplicación médica, ya que permitiría la administración por vía inhalatoria. Por otro lado, estudios recientes de nuestro grupo sobre la reacción en solución entre los gasotransmisores H_2S y $\bullet\text{NO}$, confirmaron al HNO como un intermediario. Esta reacción está fuertemente influenciada por el pH, debido a la participación de la especie HS^- ; sin embargo, se sabe poco sobre esta reactividad en fase gaseosa. Por lo tanto, en el capítulo 5 se estudiará la mezcla de estos dos gases mediante mediciones espectroscópicas y cálculos computacionales, evaluando principalmente la producción de N_2O , producto de la dimerización de HNO. Además, se estudiará si el mecanismo requiere la asistencia de otras especies tal como NH_3 y HCl .

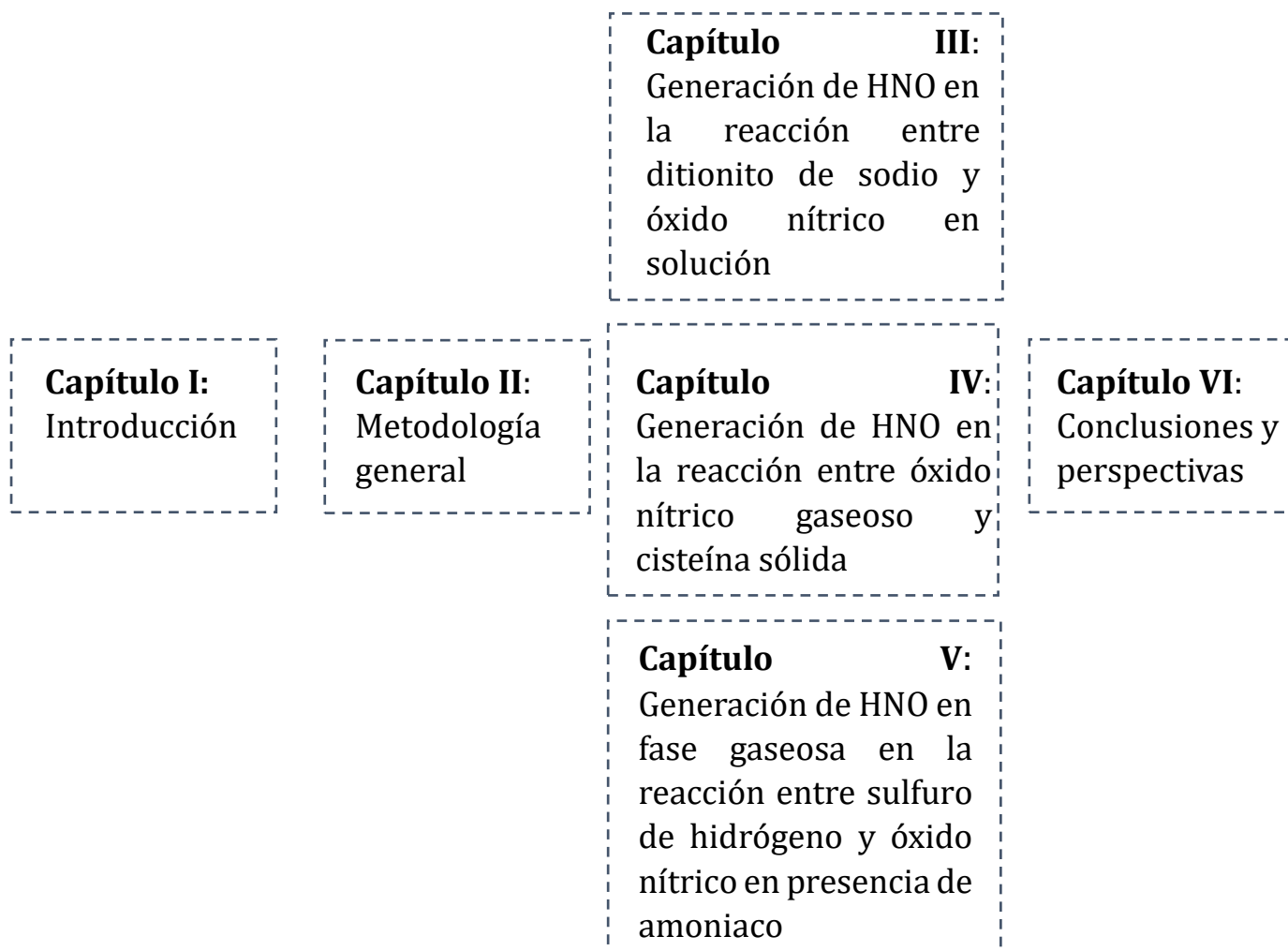
Abstract- •NO/HNO interconversion in inorganic systems by the action of biologically relevant sulfur compounds.

Azanone (nitroxyl, HNO) is the one-electron reduced congener of nitric oxide (•NO) and shares with it many aspects such as its reactivity towards thiols, O₂, hemoproteins, transition metals, among others. However, the biochemical pathways in which these species are involved are very different. HNO exhibits unique properties, such as positive inotropic and lusitropic effects, together with resistance to scavenging by reactive oxygen species (ROS), in particular superoxide (O₂^{•-}). Due to the great potential of application in the medical area, in the last two decades, research on HNO has intensified, focusing on its reactivity and on the perspective of its endogenous production. In this context, the main thread of this thesis is the formation of HNO from the reaction of •NO with sulfur species under different conditions. In chapter 1, a compilation of bibliographic information concerning •NO and HNO as well as their interconversion will be presented. In chapter 2, the experimental techniques used for the determination of intermediates, products and kinetic parameters will be presented. Likewise, the procedures implemented to establish and maintain a strictly anaerobic atmosphere for the required time, an essential condition to prevent decompositions and modifications in the kinetics or products under study, will be detailed. Chapter 3 will focus on the kinetic, computational and final product analysis of the reaction in solution between sodium dithionite (Na₂S₂O₄) and •NO. This reducing compound has a widespread use in industry and research, especially when trying to induce the reduced state in certain enzymes. In these studies, the presence of interferences attributed to •NO in the medium has been detected, suggesting a possible reaction between dithionite and •NO. In addition, its negative reduction potential indicates the feasibility of it acting on •NO, favoring the generation of HNO. Chapter 4 will focus on the analysis of intermediates (HNO) and end products of the reaction between solid cysteine and gaseous •NO. Although this reaction has been previously studied in solution, in this thesis a new method is presented in which the use of liquids is excluded. This advantage allows obtaining HNO in gaseous phase, which shows an enormous potential for medical application, since it would allow administration by inhalation. On the other hand, recent studies of our group on the reaction in solution between the gasotransmitters H₂S and •NO, confirmed HNO as an intermediate. This reaction is strongly influenced by pH, due to the participation of the HS⁻ species, however, little is known about this reactivity in the gas phase. Therefore, in Chapter 5 the mixing of these two gases will be studied by spectroscopic measurements and computational calculations, evaluating mainly the production of N₂O, product of HNO dimerization. In addition, it will be studied whether the mechanism requires the assistance of other species such as NH₃ and HCl.

Objetivos generales

El objetivo general de esta tesis es determinar si es posible la generación de HNO a partir de la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y especies azufradas biológicamente relevantes en condiciones de solución, sólido-gas y gaseosas. Además, se buscó desentrañar los mecanismos que subyacen a la reactividad en las condiciones experimentales mencionadas.

Estructura general de la tesis



Índice

Capítulo 1. Introducción general	19
1.1 Gasotransmisores: moléculas pequeñas como agentes de señalización intercelulares	19
1.2 Historia del $\bullet\text{NO}$ y HNO	21
1.3 Química y reactividad de los sistemas $\text{HNO}/\bullet\text{NO}$	23
1.3.1 Estados de espín, acidez y reacciones redox	23
1.3.2 Dimerización y reactividad entre $\text{HNO}/\bullet\text{NO}$	26
1.3.3 Reacción con moléculas biológicamente relevantes	27
1.4 Detección	33
1.4.1 Métodos indirectos	33
1.4.2 Métodos directos	33
1.5 Efectos farmacológicos	39
1.6 Dadores	43
1.7 Generación endógena	45
1.7.1 Vías enzimáticas	47
1.7.2 Vías no enzimáticas	51
Capítulo 2. Metodología general	65
2.1 Métodos anaeróbicos	65
2.2 Síntesis de Sal de Angeli	67
2.2.1 Reacciones involucradas	67
2.2.2 Procedimiento experimental	68
2.3 Síntesis de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$)	70
2.3.1 $\bullet\text{NO}$ en fase gaseosa	70
2.3.2 $\bullet\text{NO}$ en solución	72
2.4 Síntesis de sulfuro de hidrógeno (H_2S)	73
2.5 Técnicas instrumentales	74
2.5.1 Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-visible)	74
2.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	75
2.5.3 Espectroscopia Infrarroja de Reflectancia Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	76
2.5.4 Métodos computacionales	77
Capítulo 3. Generación de HNO en la reacción entre ditionito de sodio y óxido nítrico en solución	81
3.1 Resumen del capítulo	81
3.2 Introducción	82

3.2.1	<i>El ditionito de sodio</i>	82
3.2.2	<i>Pureza del ditionito de sodio</i>	83
3.2.3	<i>Descomposición anaeróbica del ditionito de sodio</i>	83
3.2.4	<i>Monomerización y capacidad reductora del ditionito de sodio</i>	84
3.2.5	<i>Antecedentes de la reactividad entre ditionito de sodio y óxido nítrico</i>	85
3.3	Objetivos del capítulo	87
3.4	Resultados y discusión	87
3.4.1	<i>Potenciales reacciones paralelas del ditionito</i>	87
3.4.2	<i>Detección directa de HNO</i>	90
3.4.3	<i>Detección indirecta de HNO. Producto nitrogenado final N₂O</i>	94
3.4.4	<i>Productos azufrados finales</i>	95
3.4.5	<i>Cinética de la reacción por espectroscopia UV-visible</i>	99
3.4.6	<i>Mecanismo de reacción y cálculos computacionales</i>	103
3.5	Conclusiones	113
3.6	Sección experimental	114
3.6.1	<i>Recristalización de ditionito</i>	115
3.6.2	<i>Sistema para la detección de HNO gaseoso</i>	116
3.6.3	<i>Curva de calibración con sal de Angeli</i>	117
Capítulo 4. Generación de HNO en la reacción entre •NO gaseoso y cisteína sólida		
121		
4.1	Resumen del capítulo	121
4.2	Introducción	122
4.3	Objetivos del capítulo	124
4.4	Resultados y discusión	124
4.4.1	<i>Detección indirecta de HNO mediante cuantificación de N₂O por FTIR</i>	124
4.4.2	<i>Detección directa de HNO por atrapamiento con meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) soluble en agua (Mn (III) TEPyP)</i>	126
4.4.3	<i>Análisis de productos sólidos por FTIR</i>	128
4.4.4	<i>Nitrosocisteína como intermediario</i>	129
4.4.5	<i>Análisis del mecanismo de reacción entre cisteína (s) y NO (g)</i>	131
4.4.6	<i>Otros compuestos sólidos como candidatos a producir HNO a partir de la reacción con •NO</i>	132
4.5	Conclusiones	135
4.6	Sección experimental: sistema para la detección de HNO	136
Capítulo 5. Generación de HNO en fase gaseosa en la reacción entre sulfuro de hidrógeno y óxido nítrico en presencia de amoníaco		
141		
5.1	Resumen del capítulo	141

5.2	Introducción	141
5.3	Objetivos del capítulo	144
5.4	Resultados y discusión	145
4.4.1	Reacción entre $H_2S(g)$ y $\bullet NO(g)$ en presencia de aire y vapor de H_2O	145
5.4.2	Reacción entre $H_2S(g)$ y $\bullet NO(g)$ en presencia de vapores de NH_3 y HCl	147
5.4.3	Análisis computacional del mecanismo $H_2S(g)/\bullet NO(g)/NH_3(g)$	150
5.4.4	Mecanismo propuesto	154
5.5	Conclusiones	155
6	Conclusiones generales y perspectivas	157
7	Bibliografía	163
8.	Publicaciones realizadas a lo largo de la presente tesis	179
9.	Agradecimientos	181

Índice de esquemas y figuras

Esquema 1.1 Dos vías para producir HNO a través de la reducción de •NO.....	25
Esquema 1.2 Reacciones de tioles, H ₂ S y RSSH con HNO	30
Esquema 1.3 Estrategia reducción de Cu (II) de las sondas fluorescentes sensibles a HNO.	38
Esquema 1.4 Reacción de formación de •NO por acción de la NOS.....	46
Esquema 1.5 Reacción propuesta para la reducción de L-arginina por seis electrones para producir HNO.	47
Esquema 1.6 Mecanismo de reacción de la NOS en ausencia y presencia de tetrahidrobiopterina. La vía rosa indica una propuesta de generación de HNO a partir de la reducción de •NO por acción del NADPH, en ausencia del cofactor THB.....	48
Esquema 1.7 HNO se produce como intermediario en la reducción por seis electrones de nitrito a amoníaco, por acción de CcNir.	50
Esquema 1.8 Mecanismo de reacción de •NO con tioles para dar HNO.	54
Esquema 1.9 Mecanismo de reacción de •NO con alcoholes para dar HNO.	56
Figura 1.1 Gasotransmisores como mediadores de la comunicación celular	19
Figura 1.2 Vía de señalización del óxido nítrico en la musculatura lisa.....	20
Figura 1.3 Cronología de los hitos bioquímicos del •NO (arriba) y el HNO (abajo).	23
Figura 1.4 Geometría de las moléculas y frecuencias vibracionales de •NO y HNO.....	24
Figura 1.5 Resumen de la reactividad del HNO frente a varias moléculas biocompatibles. Las constantes de velocidad de reacción de segundo orden (M ⁻¹ s ⁻¹) se muestran entre paréntesis.....	28
Figura 1.6 Resumen de la reactividad del HNO.....	32
Figura 1.7 Resumen de los métodos de detección directos e indirectos de HNO.....	34
Figura 1.8 Espectrometría de masas con entrada de membrana. A) Esquema de una celda anaeróbica con entrada de membrana para mediciones de espectrometría de masas y absorción UV-visible, reproducida de la ref [151]. B) Espectro ejemplo de una señal MIMS observada tras la adición de 5 µM de 2BrPA (2-Bromo-ácido de piloty) a una solución 0,1 M de <i>buffer</i> purgado con argón a pH 7,4, reproducido de la ref [152]	35
Figura 1.9 Discriminación entre HNO y •NO por porfirinas de Mn (III). <i>Izquierda</i> : reacciones involucradas. <i>Derecha</i> : espectro UV-visible de las porfirinas de Mn en sus diferentes formas.....	36
Figura 1.10 Las sondas fluorescentes y el sensor electroquímico se han convertido en herramientas imprescindibles para desentrañar las complejas interacciones del HNO con notable sensibilidad. A) Las sondas fluorescentes son fundamentales para estudiar la dinámica del HNO en el entorno celular, mientras que el sensor electroquímico ha demostrado su utilidad para monitorizar de forma continua y en tiempo real las concentraciones de HNO a medida que atraviesa la membrana celular. B) Imágenes de fluorescencia del HNO en el pez cebra. Barras de escala = 100 µm. Reproducido de la ref. [158]. C) Configuración de tres microelectrodos y concentración nanomolar de HNO registrada <i>in vivo</i> en función del tiempo en zonas foliares con diferente contenido de clorofila. Adaptado de ref. [159].....	37
Figura 1.11 Reacciones implicadas en la detección amperométrica de HNO por Co(P).....	39
Figura 1.12 Efectos farmacológicos del HNO.....	41
Figura 1.13 Estructuras representativas de los dadores de HNO.....	44
Figura 1.14 Vías de generación endógena de HNO.	46

Figura 1.15 Mecanismo de producción de HNO por la oxidación de hidroxilamina mediada por mioglobina.....	49
Figura 1.16 Vías de formación de HNO a partir de •NO por reducción directa y por intermediación de otras especies.....	61
Figura 2.1 Foto de la línea de Schlenk utilizada en todos los experimentos anaeróbicos. ..	65
Figura 2.2 Tubo de Schlenk con viales adentro, que contienen los sólidos a disolver.....	66
Figura 2.3 Procedimiento para la síntesis de nitrato de metilo.	68
Figura 2.4 Procedimiento para la liberación de hidroxilamina de su clorhidrato.....	69
Figura 2.5 Espectro de absorción de Sal de Angeli en <i>buffer</i> fosfato 10 mM, pH= 7,4.	70
Figura 2.6 Sistema anaeróbico para la síntesis de •NO a partir de una mezcla de FeSO ₄ (8,5 g) + NaNO ₂ (8,5 g) y NaBr (4 g).....	71
Figura 2.7 Sistema anaeróbico para la síntesis de •NO en solución saturada a partir de una mezcla de FeSO ₄ (8,5 g) + NaNO ₂ (8,5 g) y NaBr (4 g).	72
Figura 2.8 Sistema anaeróbico para la síntesis de H ₂ S.	73
Figura 2.9 Cubeta de cuarzo con 1 cm de paso óptico adaptada para mediciones anaeróbicas.	74
Figura 2.10 Celda para espectroscopía FTIR de gases de 5 cm de paso óptico.	75
Figura 2.11 Armado de pastilla de NaBr para espectroscopía FTIR de sólidos.....	76
Figura 2.12 Espectrofotómetro ATR-FTIR con placa de cristal de diamante	76
Figura 3.1 Estructura 2D y 3D del anión ditionito.	82
Figura 3.2 <i>Arriba</i> : Descomposición anaeróbica de ditionito 172 µM, pH= 7,4 a temperatura ambiente. Las concentraciones se calcularon a partir del punto de máxima absorbancia a 315 nm y su coeficiente de extinción molar de 8000 M ⁻¹ cm ⁻¹ . <i>Abajo</i> : Regresión lineal de 1/[ditionito] en función del tiempo.	88
Figura 3.3 Estructura de la meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) (Mn(III)TEPyP).	91
Figura 3.4 Las reacciones entre las especies Mn(II)(P) y •NO generan el mismo producto que la reacción entre Mn(III)(P) y HNO.....	92
Figura 3.5 Espectroscopía UV-visible de la porfirina Mn(III)TEPyP a diferentes tiempos de burbujeo de los gases en el sistema.	93
Figura 3.6 Micromoles de N ₂ O en función del tiempo de reacción entre el ditionito (6 mM) y el •NO (390 µM).....	95
Figura 3.7 Comparación entre los espectros ATR-FTIR de sulfato de sodio, tiosulfato de sodio, sulfito de sodio, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, ditionito de sodio y la mezcla de reacción entre ditionito de sodio y •NO.....	96
Figura 3.8 Comparación entre los espectros ATR-FTIR de metabisulfito de sodio, ditionito de sodio y la mezcla de reacción.....	97
Figura 3.9 Comparación de los espectros ATR-FTIR de la reacción entre ditionito y •NO con el espectro de la reacción de ditionito por O ₂	98
Figura 3.10 Espectro de absorción de ditionito en <i>buffer</i> fosfato, pH= 7,4.	99
Figura 3.11 Cambio espectral ejemplo del descenso de la banda de absorción de 45 µM de ditionito cada 0,5 segundos ante el agregado de 100 µM de una solución saturada en •NO.	100
Figura 3.12 Ajuste lineal y exponencial de la curva concentración frente al tiempo de la reacción entre ditionito 73 µM y de •NO 100 µM.	100
Figura 3.13 Ejemplo de una de las curvas experimentales de consumo de ditionito 55,5 µM en función del tiempo a partir del agregado de 250 µM de •NO (izquierda). Se muestra una curva de velocidad de consumo en función de la concentración graficada como -d[ditionito]/dt (derecha).	101

Figura 3.14 Curva experimental ditionito 80 μM y $\bullet\text{NO}$ 150 μM .	102
Figura 3.15 Esquema propuesto para las reacciones involucradas en la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.	104
Figura 3.16 Geometrías optimizadas para el paso inicial del mecanismo propuesto. Se muestran las geometrías del complejo pre-activo (Reac), el estado de transición (ET) y los productos (Prod).	105
Figura 3.17 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol^{-1} , para la separación de fragmentos de $\text{SO}_2 + \text{SO}_2^{\bullet-}$.	106
Figura 3.18 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol^{-1} , para el paso inicial del mecanismo propuesto (izquierda) y para la dimerización del HNO (derecha).	106
Figura 3.19 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol^{-1} , para la reacción entre HN_2O_2^- y SO_2 para producir HSO_3^- y N_2O . Además, se muestran las geometrías optimizadas en los diferentes niveles.	108
Figura 3.20 Geometrías optimizadas y superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol^{-1} , para la reacción entre $\text{HN}_2\text{O}_2\bullet$ y ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) para producir $\text{SO}_2^{\bullet-}$, HSO_3^- y N_2O .	110
Figura 3.21 Perfil energético asociado a las distancias en el enlace S-N en la especie SO_2NO^- formado a partir de la interacción de los radicales $\text{SO}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$.	112
Figura 3.22 Resumen de los resultados de la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.	114
Figura 3.23 Sistema anaeróbico para la detección directa de HNO por atrapamiento con porfirinas de Mn III.	117
Figura 3.24 Procedimiento experimental para la construcción de la curva de calibración con sal de Angeli como dador de $\text{HNO}/\text{N}_2\text{O}$ (superior). Curva de calibración con ajuste lineal. Las barras de error indican corresponden al desvío estándar de la media (inferior).	118
Figura 4.1 Esquema de reacciones propuestas para la reacción en solución entre cisteína y $\bullet\text{NO}$. Referencia [58].	124
Figura 4.2 Espectro Infrarrojo entre 2212 y 2236 cm^{-1} a modo de comparación entre el experimento sin H_2O agregada, con H_2O agregada y el blanco de $\bullet\text{NO}$.	125
Figura 4.3 Producción de N_2O durante 1 hora de reacción bajo agitación magnética en presencia de H_2O , H_3PO_4 0.1 M, NaOH 0.1 M y buffer fosfato 10 mM pH 7.2.	125
Figura 4.4 Producción de N_2O en función del tiempo para la reacción entre cisteína (s) y $\bullet\text{NO}$ (g) en presencia de H_2O . Cada punto indica el promedio (micromoles) de N_2O producido.	126
Figura 4.5 Espectros UV-visible de la porfina TEPPyP en buffer fosfato pH 7.25 burbujado con el flujo de gas del sistema mostrado en la figura 4.11. La banda de máxima absorbancia en 434 nm corresponde al complejo nitrosilado Mn(II)-NO.	128
Figura 4.6 Espectroscopía FTIR en pastillas de KBr de cisteína sólida, tras la reacción con $\bullet\text{NO}$, en comparación con los espectros de la cisteína y la cistina. <i>Inserto</i> . Comparación del control (cisteína blanco 6 h) con el espectro de la cisteína sin reaccionar.	129
Figura 4.7 Foto de la coloración rojiza que toma la cisteína sólida húmeda luego de estar en contacto con $\bullet\text{NO}$ gaseoso A). Espectro del sólido rojizo, disuelto en H_2O por UV-visible B) y sin disolver por reflectancia difusa C).	130
Figura 4.8 Esquema de reacciones propuesto para la reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso.	131
Figura 4.9 Estructura del ácido ascórbico, cisteína, naringenina, naringina y naringenina metalada. Además, se muestra la estructura esperada del complejo metalado de naringina.	133

Figura 4.10 Evaluación de otros sólidos como candidatos para producir HNO gaseoso a partir de la reacción sólido-gas. Todos los experimentos se realizaron a una relación 10/1 (sólido/ $\bullet$ NO), a excepción del correspondiente al ácido ascórbico.....	134
Figura 4.11 Sistema para la detección de HNO gaseoso. El sistema consta de cuatro partes: (1) Generador de $\bullet$ NO, (2) Trampa de NaOH para eliminar los óxidos de nitrógeno contaminantes, (3) Jeringa con filtro de algodón armado con cisteína sólida en su interior, (4) Solución de porfirina Mn (III) TEPyP.....	136
Figura 4.12 Espectros de la porfirina TEPyP en sus variantes Mn (III), Mn (II) y Mn(II)-NO.	137
Figura 5.1 A) Energías optimizadas y B) Energía libre de Gibbs, en kcal mol ⁻¹ para la reacción de HS ⁻ con (NO) ₂ . Figura adaptada de la referencia [237].....	144
Figura 5.2 Comparación de los espectros FTIR a partir de la inyección de 1 ml de $\bullet$ NO en la celda para gases. La línea roja corresponde a una muestra de $\bullet$ NO puro y la línea azul a una muestra de $\bullet$ NO que se ha contaminado con aire del ambiente.	145
Figura 5.3 Absorbancia obtenida del espectro FTIR en la región espectral de 1630 cm ⁻¹ y 2236 cm ⁻¹ correspondiente a $\bullet$ NO ₂ y N ₂ O, respectivamente. Las flechas indican los agregados de H ₂ S, vapor de H ₂ O y aire al $\bullet$ NO gaseoso contenido en el interior de la celda.	146
Figura 5.4 Respuesta a la adición de NH ₃ y HCl a la mezcla de H ₂ S y $\bullet$ NO. Cambios espectrales en la región del N ₂ O (2150 y 2250 cm ⁻¹) por la adición de A) NH ₃ y B) HCl. C) Comparación del N ₂ O producido entre las condiciones de NH ₃ y HCl.	149
Figura 5.5. Superficie de energía potencial para la aproximación de A) NH ₃ y $\bullet$ NO (N-H), B) NH ₃ y $\bullet$ NO (N-N), y C) NH ₃ y H ₂ S.....	151
Figura 5.6 Perfil de energía electrónica en función de la coordenada de reacción en el nivel de teoría r ² SCAN(D4)/def2-TZVPP.	151
Figura 5.7 Representación esquemática del MECP. La línea roja representa el estado triplete y la línea azul el estado singlete.....	152
Figura 5.8 Perfil de energía electrónica de reacción para el segundo paso de la reacción de formación de HNO. <i>Inset</i> Punto de cruce de energía mínimo optimizado (MECP) en el nivel teórico r ² SCAN(D4)-Def2-TZVPP.....	153
Figura 5.9 A) Optimización de la geometría del punto de cruce de energía mínimo optimizado (MECP) en el nivel de teoría r ² SCAN(D4)-Def2-TZVPP, para obtener el producto de la reacción. B) Perfil de Energía Electrónica de Reacción para el segundo paso de la reacción de formación de HNO incluyendo el producto para la reacción.	154

Capítulo 1

Introducción General

Capítulo 1. Introducción general

1.1 Gasotransmisores: moléculas pequeñas como agentes de señalización intercelulares

La comunicación es esencial para el funcionamiento de todos los sistemas vivos. La forma en que las células se comunican consiste en enviar y recibir señales (moléculas) que son capaces de interactuar y activar receptores específicos, iniciando vías de señalización intracelular. De esta manera, se llevan a cabo las funciones celulares necesarias para el desarrollo armonioso desde tejidos hasta organismos enteros. Además, gobiernan el movimiento, el pensamiento y el comportamiento, a través de una gran cantidad de reacciones que incluyen la transferencia de electrones, la química ácido-base y las interacciones metal-ligando que son llevadas a cabo por estas especies en condiciones determinadas. Los agentes de señalización involucrados en la comunicación celular están constituidos por una amplia diversidad química, que van desde derivados de aminoácidos, péptidos, proteínas, moléculas orgánicas complejas como los esteroides, hasta moléculas gaseosas. De hecho, durante las últimas décadas, se profundizó sobre estas moléculas de señalización gaseosas llamadas gasotransmisores (Figura 1.1).

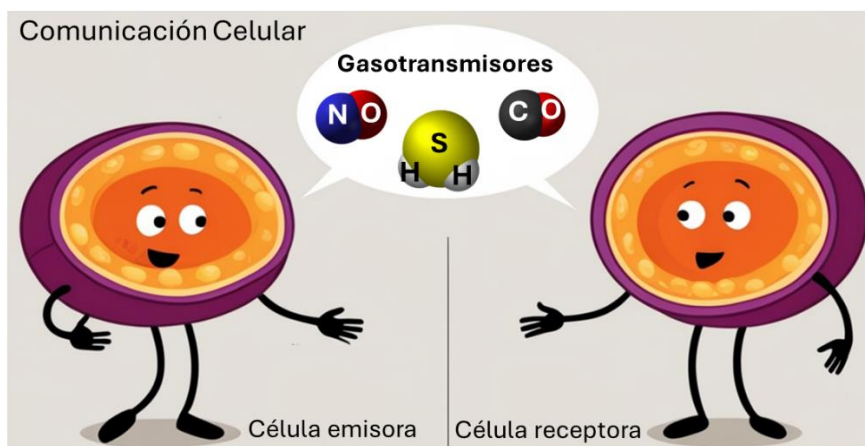


Figura 1.1 Gasotransmisores como mediadores de la comunicación celular

Los gasotransmisores son moléculas gaseosas pequeñas, ya sea sintetizadas endógenamente o de origen exógeno, que transmiten señales químicas que pueden inducir ciertos cambios fisiológicos o bioquímicos (Figura 1.2). El término se aplica, por ejemplo,

para agentes de señalización tales como O_2 , CO_2 , $\bullet NO$, CO , H_2S , SO_2 , N_2O , HCN , NH_3 , CH_4 , H_2 , C_2H_4 , y más recientemente incluido en el grupo, el nitroxilo (HNO)[1]. A pesar de que este término se utiliza rutinariamente para clasificar a un grupo de moléculas reguladoras, es un término controversial porque, aunque estas moléculas son gases a temperatura y presión estándar, dentro de las células o fluidos extracelulares actúan como solutos y pueden utilizar mecanismos de transporte para cruzar las membranas celulares [2]. Por lo tanto, estas especies pueden actuar tanto en el entorno extracelular como intracelular. El ejemplo más conocido es la unión de monóxido de carbono a la hemoglobina de la sangre, dificultando así el transporte y llegada de oxígeno a los tejidos.

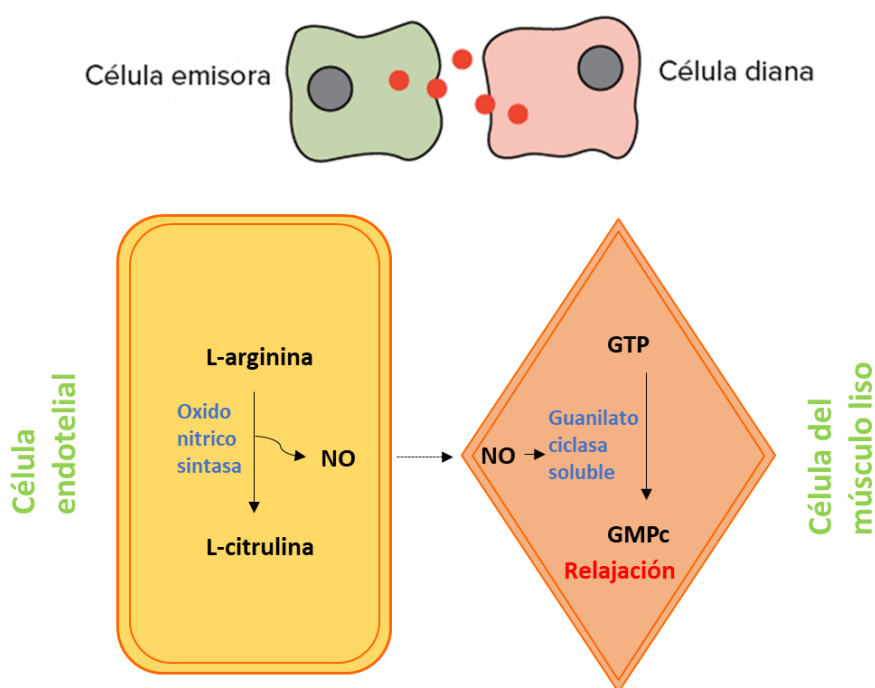


Figura 1.2 Vía de señalización del óxido nítrico en la musculatura lisa.

Estas especies, ahora conocidas colectivamente como gasotransmisores, una subfamilia de moléculas de señalización, fueron inicialmente conocidas como contaminantes atmosféricos y entidades tóxicas de larga duración y más tarde se estableció su producción endógena [3]. Desde ese momento se comenzó a estudiar su actividad como agentes de señalización extracelulares en diferentes organismos [4–8]. Se trata de especies muy reactivas y generalmente transitorias que se producen, difunden, se consumen o se transforman en entornos biológicos. Todas estas especies parecen interactuar con metales,

metaloproteínas y/o tioles de las proteínas en un mismo nivel [9]. Además, el entrecruzamiento de sus vías de señalización abre un enorme abanico de posibilidades de actividades biológicas.

1.2 Historia del •NO y HNO

El óxido nítrico (•NO) fue sintetizado por primera vez hace 400 años por el científico belga Jan Baptista van Helmont y caracterizado hace unos 250 años por Joseph Priestly [10] pero, al igual que otros gases implicados en los procesos de señalización, su importancia fisiológica sólo se reconoció muchos años después (Figura 1.3). En 1976, Ferid Murad y sus colegas demostraron que el •NO generado en laboratorio o disponible comercialmente podía activar la enzima guanilato ciclasa (GC) citosólica y elevar los niveles de guanosina monofosfato cíclico (GMP) en los tejidos [11]. Este fue el inicio del óxido nítrico en el campo de las ciencias biológicas. Posteriormente, se descubrió que varios nitrovasodilatadores (nitroprusiato, nitroglicerina, otros nitratos orgánicos y ésteres de nitrito) estimulaban la producción de GMP cíclico tisular [12]. En un estudio independiente, se observó que el •NO es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria humana [13]. Para 1980, las dos propiedades farmacológicas más conocidas del •NO eran la relajación vascular y no vascular del músculo liso y la inhibición de la agregación plaquetaria [14, 15]. Además, ese mismo año, cuando Robert Furchgott demostró por primera vez que el endotelio liberaba una sustancia que relajaba los vasos sanguíneos en respuesta a agonistas muscarínicos, el campo de la biología vascular experimentó un punto de inflexión [16]. Hacia 1986, Louis Ignarro informó de la producción endógena de •NO en las células endoteliales y descubrió su participación en la vasodilatación arterial [17], ya que reconoció que el •NO se enmascaraba en las arterias como el entonces denominado factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). En 1989, el grupo del Dr. Moncada dilucidó la biosíntesis y el mecanismo de acción del •NO, dejando claro que se trata de una molécula de señalización producida enzimáticamente [18]. Por estas investigaciones, el •NO fue elegido “Molécula del Año” en 1992 [19], y los doctores Ignarro, Furchgott y Murad compartieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1998 “por el descubrimiento relativo al óxido nítrico como molécula de señalización en el sistema cardiovascular” [20]. Tras el descubrimiento de su papel fisiológico, la reactividad química y bioquímica del •NO se estudió en detalle durante las décadas siguientes, y hoy en día se sigue revisando [21–27]. Por otra parte, el primer intento de síntesis del gas HNO (nitroxilo, azanona) por Harteck data de 1933 [28]. Sin embargo, en 1901 ya se habían preparado los primeros compuestos sólidos liberadores de

HNO (sal de Angeli, AS) [28]. La sal de Angeli es capaz de liberar HNO, junto con un equivalente de nitrito, de forma dependiente de protones con una constante de velocidad de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a temperatura ambiente [29, 30]. Se caracterizó completamente en 1958, 25 años más tarde que el intento de síntesis de HNO [31, 32]. Pero, fue recién en 2002, 100 años después del primer uso del HNO, que se caracterizaron correctamente sus parámetros químicos básicos como el pK_a y la constante de dimerización [33, 34]. Hasta ese momento, pK_a no era conocido debido a que la protonación/deprotonación implica un equilibrio de espín, dado que HNO es singlete y su anión NO^- es triplete. A mediados de la década de 1980, el nitroxilo surgió como posible compuesto biológicamente activo en relación con estudios sobre la cianamida (H_2NCN), un fármaco contra el alcoholismo [35, 36]. Desde entonces, se han publicado excelentes revisiones que vale la pena leer con tratamientos detallados de la biología, química y/o la fisiología del HNO [37–42]. Además, un reciente estudio innovador en *Arabidopsis thaliana* ha confirmado, por primera vez, la generación endógena de HNO en plantas. Luego, se identificó una ruta de interconversión no enzimática entre HNO y $\bullet\text{NO}$, regulada por sulfuro de hidrógeno, ácido ascórbico y ácido salicílico, lo que representa un mecanismo clave para el control de los niveles de HNO en plantas. Este hallazgo amplía el conocimiento sobre la señalización redox en organismos vegetales y abre nuevas perspectivas en la investigación de la fisiología del HNO [43].

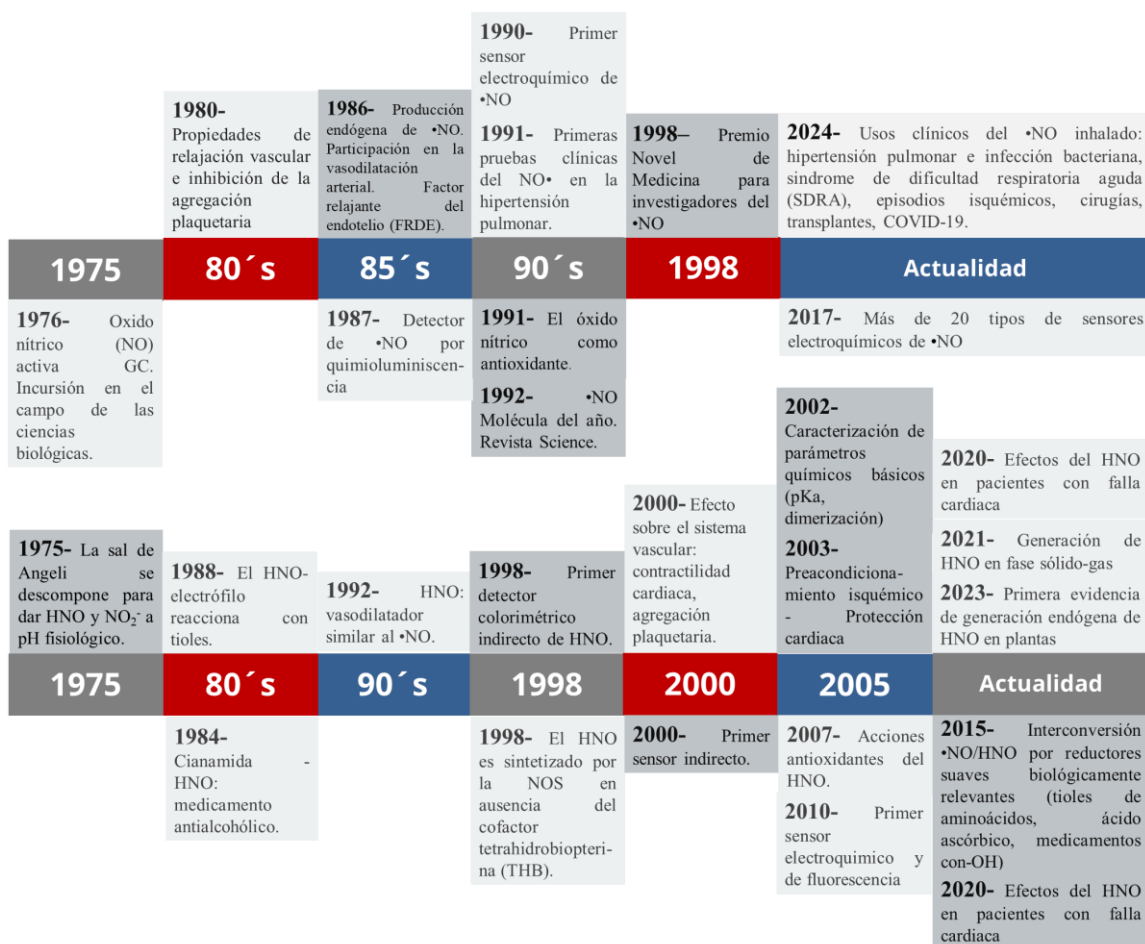


Figura 1.3 Cronología de los hitos bioquímicos del •NO (arriba) y el HNO (abajo).

1.3 Química y reactividad de los sistemas HNO/•NO

1.3.1 Estados de espín, acidez y reacciones redox

El •NO es un gas incoloro a temperatura ambiente (punto de ebullición -152 °C). Por su parte, el HNO es la forma reducida en un electrón del •NO. En la Figura 1.4 se muestran las geometrías de las moléculas de •NO y HNO y las frecuencias vibracionales de estiramiento y torsión.

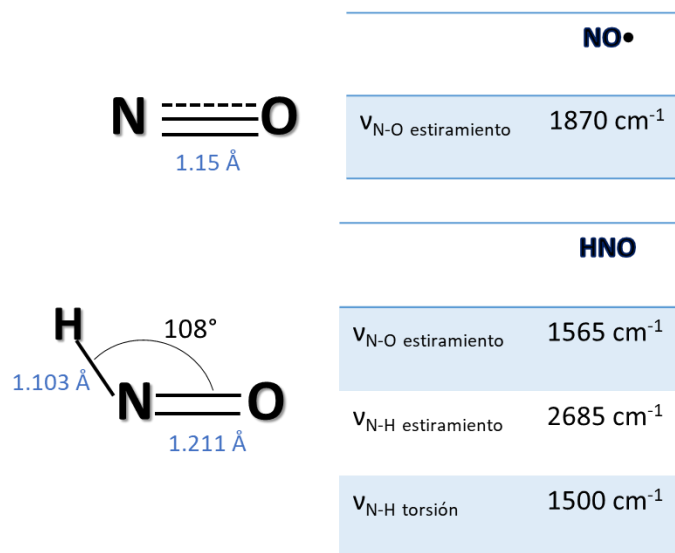
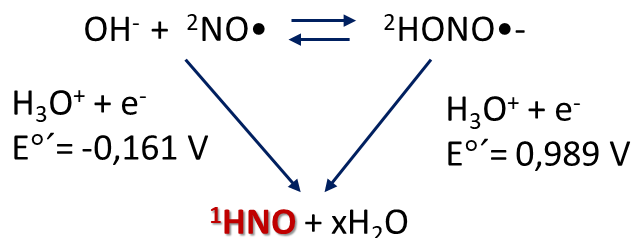


Figura 1.4 Geometría de las moléculas y frecuencias vibracionales de •NO y HNO.

Mientras que •NO es un radical libre con un estado basal doblete, el ¹HNO tiene un estado basal singlete [44, 45]. Además, el triplete ³NOH también es una molécula viable [32, 46], y la isomerización de HNO a NOH en el estado singlete podría tener lugar a partir de la asistencia por parte de residuos de aminoácidos y/o moléculas de agua [47, 48]. El nitroxilo es un ácido débil con un pK_a de 11,4 [33, 49]. Su anión ³NO⁻ tiene un estado basal triplete [50–52], igual que la molécula isoelectrónica de O₂. Por lo tanto, la pérdida de un protón no es un simple equilibrio ácido-base, sino más bien un equilibrio lento de espín prohibido ($k = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [33, 53]. Teniendo esto en cuenta, en medios biológicos (pH 7,4) es probable que el ¹HNO sea la única especie presente. Pero en caso de que se produzca ³NO⁻, este puede tener un tiempo de vida lo suficientemente largo como para ser químicamente relevante (milisegundos), incluso en condiciones ácidas, ya que la velocidad de protonación para este anión es lenta ($k = 100 \text{ s}^{-1}$) [33].

El potencial de reducción propuesto para el par •NO/³NO⁻ es de -0,8 V [54]. Sin embargo, a pH = 0, el ¹HNO es la principal especie con una E° (•NO, H⁺/¹HNO) $\approx$ - 0,11 V, que se convierte en - 0,55 V a pH 7 [54]. Este valor fue revisado recientemente por Rocha *et al.*, quienes calcularon el potencial de reducción a pH 7 en solución acuosa, utilizando cálculos de mecánica cuántica y simulaciones de mecánica estadística Monte Carlo [55]. Los autores propusieron dos vías para la producción de HNO a través de la reducción de •NO (Esquema 1.1). La primera vía es la reducción directa de •NO mediante transferencia de electrones acoplada a protones (PCET) para producir HNO, y la segunda vía es la reducción del anión radical HONO•-, implicado en el equilibrio con el •NO en solución acuosa. Han demostrado que ambas vías son procesos viables en condiciones fisiológicas, con potenciales de

reducción de $E^{\circ'} \approx -0,16$ V y $E^{\circ'} \approx 1,0$ V para la primera y segunda vías, respectivamente, a pH = 7. Todos los valores fueron reportados contra NHE [55].



Esquema 1.1 Dos vías para producir HNO a través de la reducción de $\bullet\text{NO}$.

Este potencial implica que el proceso de oxidación de un solo electrón para el HNO es factible en condiciones biológicas y puede ser promovido por reductores biológicos bien conocidos como el NADH, la vitamina C, la vitamina E, la cisteína y el glutatión, para los que el potencial de reducción es de alrededor de -0,3 a -0,5 V [56]. Además, el potencial de reducción reportado del $\bullet\text{NO}$ a través del anión radical $\text{HONO}\bullet^-$ puede explicar los recientes descubrimientos experimentales sobre la formación de HNO a través de la reducción del $\bullet\text{NO}$, promovida por ácido ascórbico (vitamina C) [57], tioles [58] y el H_2S [41, 59, 60] (véase la Sección 1.7.2). Además, Liochev y Fridovich discutieron la posibilidad de que se produjera $\bullet\text{NO}/\text{HNO}$ dentro de las células vivas [61]. El potencial redox puede ser mucho menos negativo porque la relación $[\bullet\text{NO}]:[\text{HNO}]$ puede ser alta y el logaritmo de esta relación influye en el potencial redox real, según la ecuación de Nernst. El potencial redox calculado $E'(\bullet\text{NO}, \text{H}^+/\text{HNO})$ a concentraciones milimolares y picomolares de $\bullet\text{NO}$ y HNO, respectivamente, es de aproximadamente 0 V a pH = 7,4.

Un estudio computacional muy reciente, sugiere la posibilidad de que se forme HNO a partir de la hidrogenación de $\bullet\text{NO}$ en superficies de hielo de agua. Sin embargo, la desorción de la superficie es poco probable [62]. Por otro lado, el HNO puede convertirse en $\bullet\text{NO}$ mediante abstractores de átomos de hidrógeno relativamente suaves, ya que la fuerza de enlace H-NO es de solo ~ 50 kcal mol⁻¹ [63], lo que lo convierte en un mejor donante de átomos de hidrógeno que muchos otros antioxidantes biológicos. De hecho, el HNO es un potente antioxidante debido a su capacidad para reaccionar con radicales oxidantes [64], generando $\bullet\text{NO}$, que también puede reaccionar con especies radicales reactivas y apagarlas (Ecuaciones 1.1 y 1.2) [38]. Además, el potencial de reducción de un electrón para el par $\text{HNO}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{NO}\bullet$ está dentro del rango fisiológico y es un posible destino para el HNO [65].



1.3.2 Dimerización y reactividad entre HNO/ $\bullet NO$

En solución acuosa, el HNO dimeriza con una constante de velocidad de segundo orden de aproximadamente $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para producir ácido hiponitroso ($H_2N_2O_2$) que finalmente se descompone en óxido nitroso (N_2O) y H_2O (Ecuación 1.3) [33, 34, 66, 67]. Recientemente, las reacciones iniciales de dimerización y el mecanismo de la subsiguiente producción de N_2O a partir de HNO fueron explicados mediante cálculos teóricos [68, 69].



Por otra parte, se reportó entre los años 1950 y 1980, que el $\bullet NO$, presenta una débil tendencia a dimerizarse a $(NO)_2$ en fase gaseosa (con una pequeña constante de equilibrio $K_{eq} \leq 10^{-4} \text{ M}^{-1}$) y, por tanto, se supone estable en solución [70–73]. Sin embargo, sorprendentemente, no existen estudios sobre la dimerización de $\bullet NO$ en medios acuosos. Recientemente, Gubbins *et al.* informaron de un estudio *ab initio* y de simulación molecular de la reacción del dímero de óxido nítrico en nanoporos de carbono (de aproximadamente 1 nm). Cuando está confinado, el óxido nítrico reacciona por completo para formar el dímero $(NO)_2$, a pesar de que casi no hay dímeros presentes en la fase gaseosa en equilibrio con la fase porosa. Además, el rendimiento del dímero no cambia al variar la temperatura en el intervalo estudiado en los experimentos. Sin embargo, reportes más antiguos confirmaron la detección del dímero $(NO)_2$ en condiciones particulares de presión elevada o bajas temperaturas [74, 75]. Más importante aún, Houk *et al.* presentaron pruebas teóricas del papel del dímero de $\bullet NO$ en las reacciones de $\bullet NO$ con nucleófilos, mostrando que la concentración de $(NO)_2$ aumenta en ambientes aromáticos [70]. Además, se espera que el $(NO)_2$ sea mucho más reactivo con nucleófilos y agentes reductores, ya que el $(NO)_2$ se reduce con mucha más facilidad ($E_{1/2} [(NO)_2/N_2O_2^-] = 0,38 \text{ V}$) [49, 55, 76].

Finalmente, el ^1HNO y el $\bullet NO$ reaccionan entre sí (Ecuación 1.4), con una constante de velocidad de segundo orden de $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [77]:



El radical $\text{N}_2\text{O}_2^\bullet$ resultante reacciona rápidamente con otra molécula de $\bullet\text{NO}$, produciendo el anión de capa cerrada N_3O_3^- , que decae a los productos finales $\text{N}_2\text{O} + \text{NO}_2^-$ con una constante de velocidad de aproximadamente 300 s^{-1} [77].

1.3.3 Reacción con moléculas biológicamente relevantes

En general, $\bullet\text{NO}$ y HNO comparten muchos aspectos de su reactividad, razón por la cual se dificulta su detección inequívoca. No obstante, en los últimos años esto se ha mejorado con sensores específicos para ambas especies (ver sección 1.4). A pesar de la reactividad solapada de ambos compuestos en medios biológicos con oxígeno, tioles, ácido ascórbico, metales de transición [78, 79], hemoproteínas [80, 81], entre otros, las vías bioquímicas resultan ser muy diferentes [38, 82]. Incluso siendo la diana biológica primaria del $\bullet\text{NO}$ el hemo ferroso de la sGC [83], se ha demostrado que las proteínas hemo reaccionan con el HNO [84, 85] y el $\bullet\text{NO}$ [86, 87] tanto en el estado Fe(III) como Fe(II) , dando lugar en este último caso a un aducto estable Fe(II) Hemo-HNO [88]. Además, se han realizado varios estudios sobre la reacción de porfirinas de Mn, Fe y Co con $\bullet\text{NO}$ [89] y HNO [90–92], que han mostrado características interesantes en cuanto al mecanismo subyacente, la velocidad y la selectividad.

Aquí, nos centraremos en la reactividad del HNO con moléculas biológicas pequeñas. Las pequeñas moléculas redox-activas como las especies reactivas de óxido de nitrógeno (RNOS) y oxígeno (ROS) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S) han surgido como importantes mediadores biológicos que están implicados en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos [93]. En particular, el $\bullet\text{NO}$ y el HNO reaccionan tanto de forma independiente como concertada con otras pequeñas moléculas inorgánicas para mediar en respuestas fisiológicas, por lo que es importante comprender el trasfondo de la reactividad.

La figura 1.5 resume la reactividad general del HNO e incluye los valores de las constantes de velocidad de reacción de segundo orden.

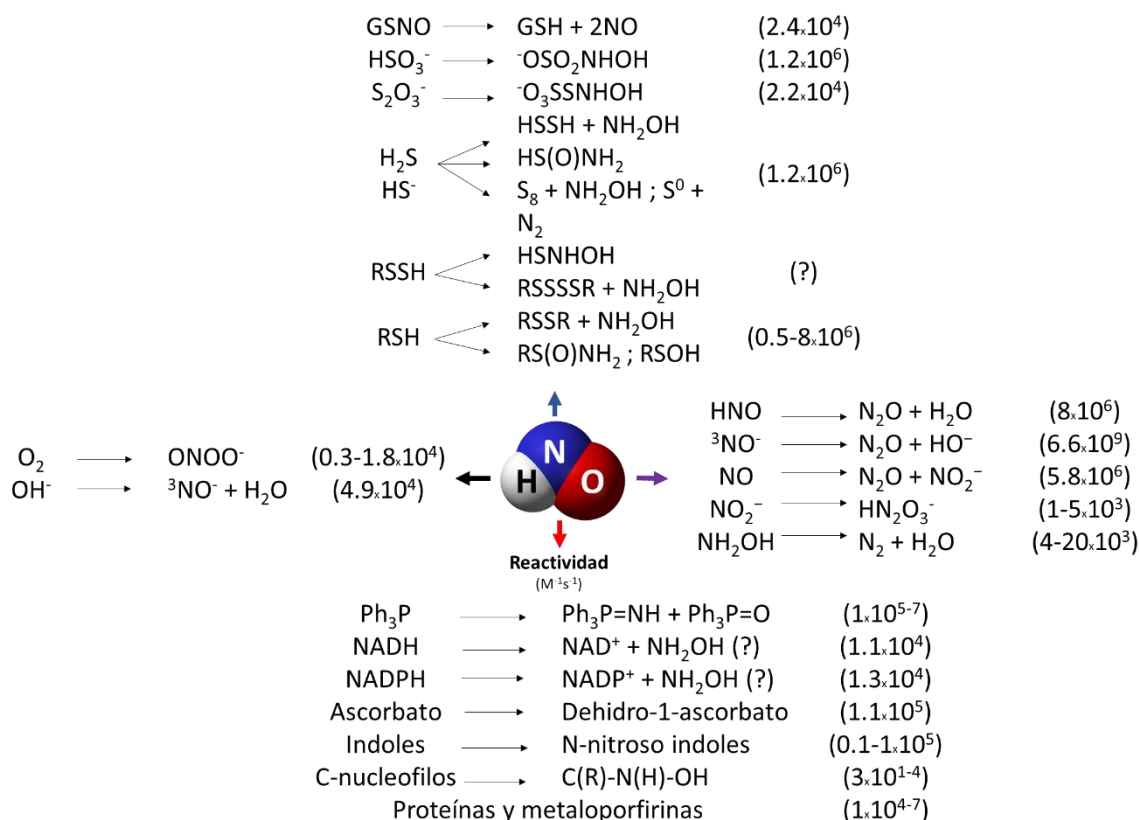


Figura 1.5 Resumen de la reactividad del HNO frente a varias moléculas biocompatibles. Las constantes de velocidad de reacción de segundo orden (M⁻¹ s⁻¹) se muestran entre paréntesis.

1.3.3.1 Oxígeno

La reacción del ¹HNO con el O₂, estudiada por primera vez en 1993 [94, 95], es lenta debido a sus diferentes estados de espín, $k \approx (3-8) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [33, 61, 96]. Sorprendentemente, los productos finales aún dan lugar a una intrincada discusión. Por un lado, se ha propuesto que la reacción procede a través de la Ecuación 1.5, dando •NO y una especie radical del tipo hidroperóxido [33, 95].



Por otro lado, actualmente se debate si se produce peroxinitrito (ONOO⁻) [97, 98] o no [99–102]. Una posible explicación es que podrían formarse diferentes isómeros protonados. Una investigación de mecánica cuántica/mecánica molecular (QM-MM) realizada por Estrin *et al.* sugiere que el HN(O)(O₂) es un intermediario en la autooxidación del HNO [103]. Se esperaría que esta especie fuera un agente de transferencia de átomos de oxígeno que culminara en una oxidación de dos electrones en lugar de una química radical. La cuestión

para esta hipótesis es la rapidez con la que el nitrógeno se desprotona para dar ONOO⁻. En este contexto, Sikora *et al.* informaron de la formación de peroxinitrito en el medio extracelular cuando las células fueron expuestas al dador de HNO en condiciones aeróbicas (ecuación 1.6) [98]. También se determinó una constante de velocidad de segundo orden para la reacción del HNO con el O₂, $k \approx 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [98]. Definitivamente, es necesario investigar más para conocer en detalle esta reacción.

Además, como se mencionó anteriormente, el nitroxilo es un ácido débil con un pK_a aceptado de 11,4. Por lo tanto, por encima de este pH, su anión con estado básico triplete ³NO⁻, sería la especie que reaccionaría con O₂, también triplete. En 2002, se informó que ³NO⁻ reacciona con O₂ con una constante de segundo orden ($3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para dar peroxinitrito (ecuación 1.7; [33, 104]), siendo isoelectrónico con la reacción de segundo orden ($k = 4\text{-}7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entre óxido nítrico y superóxido (ecuación 1.8) [37, 105, 106].



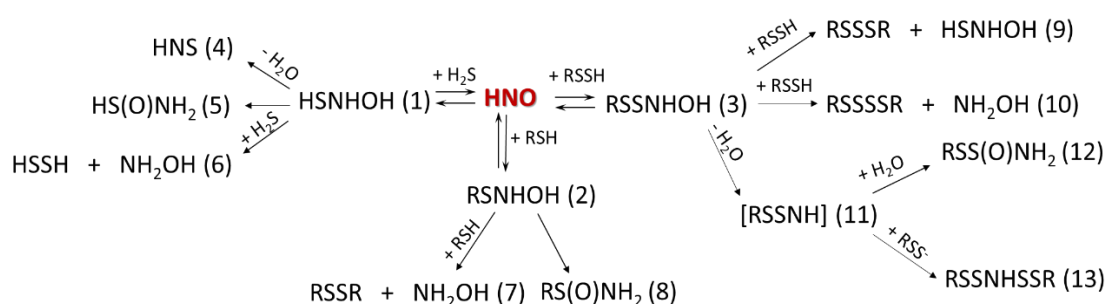
Por otra parte, el óxido nítrico reacciona con el O₂ siguiendo una cinética de tercer orden, con una constante de velocidad de $\sim 3 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El mecanismo de esta reacción se muestra de forma simplificada en las reacciones de las Ecuaciones 1.9-1.11 [107].



Además, Denicola *et al.* demostraron que la autooxidación del $\bullet\text{NO}$ tiene lugar 30 veces más rápido en el interior hidrofóbico de las membranas fosfolipídicas que en un volumen igual de agua [108]. Esta aceleración podría explicarse por la solubilidad tres veces mayor del óxido nítrico y el oxígeno en estas fases hidrofóbicas con respecto al agua [109], lo que da lugar a una mayor concentración local de reactivos.

1.3.3.2 Tioles, H_2S e hidropersulfuros (RSSH)

La alta reactividad de la azanona con los tioles se conoce desde hace más de tres décadas y está directamente relacionada con su actividad biológica, sobre la base de la modificación de tioles críticos [61, 110, 111]. La reacción de HNO con tioles puede tener al menos dos resultados posibles según las condiciones de reacción, ver el esquema 1.2. Los estudios pioneros de Doyle *et al.* demostraron que el HNO podía convertir el tiofenol en disulfuro de fenilo, probablemente a través de un intermediario inestable N-hidroxisulfenamida (2). Además, Wong *et al.* [112] sugirieron que a bajos niveles de tiol la N-hidroxisulfenamida podría isomerizarse a un producto estable sulfinamida ($RS(O)NH_2$) (8), que es diferente de las especies habituales resultantes de su reacción aeróbica con óxido nítrico (nitrosotioles, $RSNO$) [113, 114]. También se propuso una reactividad similar para otros tioles como el glutatión (GSH), [112] n-acetil-L-cisteína y ditiotreitól [113]. Además, en presencia de exceso de tioles, se produce otra reacción que da lugar al correspondiente disulfuro e hidroxilamina (7) [115]. En solución, se predijo una mayor competencia entre las dos vías [116]. Con tioles de pequeño peso molecular, Sikora *et al.* informaron recientemente que existe una correlación entre la constante de velocidad de segundo orden ($\sim 10^5$ - $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y los valores de pK_a de los grupos SH [98]. Cuanto mayor es el valor pK_a , menor es la constante de velocidad de reacción del HNO con el tiol [98]. Además, también reportaron sobre el efecto del pH en dicha reactividad.[117] Las constantes de velocidad de la reacción del HNO con los tiolatos correspondientes (RS^-) son altas y varían en el rango $k \sim 10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, mientras que las constantes de velocidad de la reacción del HNO con los tioles (RSH) son un orden de magnitud inferiores en $k \sim 10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. [117]



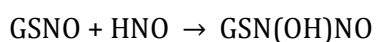
Esquema 1.2 Reacciones de tioles, H_2S y RSSH con HNO.

Aunque existen múltiples ejemplos de reactividad del HNO con tioles, se sabe poco sobre la reacción entre el HNO y el H_2S . En 2014, se reportaron los parámetros cinéticos y una

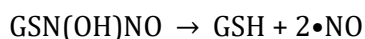
constante de velocidad de segundo orden de $\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [98]. Más recientemente, Toscano *et al.* propusieron un mecanismo con vías alternativas dependientes de las condiciones de reacción, similar a lo que ocurre en la reacción entre HNO y tioles (esquema 1.2) [118]. Este mecanismo incluye la intermediación de N-mercaptohidroxilamina (HSNHOH) (1). Y en función de las concentraciones relativas de H₂S, los productos podrían ser disulfuro de hidrógeno (H₂S₂) y NH₂OH (6) o sulfinamida (5). Además, el intermediario N-mercaptohidroxilamina también podría deshidratarse para producir hidruro de tionitrosilo (HNS) (4). Por otro lado, en este mismo estudio informaron la reacción entre hidropersulfuros (RSSH) y HNO, cuya eficiencia resultó más alta que la de su correspondiente tiol. Se espera que el mecanismo proceda a través del intermediario N-hidroxi-pertiosulfenamida (3) y los productos observados dependan de la concentración de la especie RSSH, similar a lo que ocurre con los tioles y H₂S. Este intermediario podría reaccionar con otra molécula de RSSH produciendo N-mercaptohidroxilamina y una especie S₃ (9). RSSH también puede reaccionar con el azufre externo del intermediario N-mercaptohidroxilamina para producir S₄ y NH₂OH (10). Alternativamente, el intermediario (3) podría reordenarse mediante deshidratación (11) y captación de H₂O para dar RS-S(O)-NH₂ (12), o luego de la deshidratación podría ser atrapado por la especie RSS- dando lugar a la formación de RSS-NH-SSR (13). Es decir, la modificación de RSSH inducida por HNO da lugar a la formación de varios dialquilpolisulfuros y algunas especies únicas como RSS-NH-S_nR. La reactividad del •NO con tioles y H₂S se estudiará y discutirá en la sección 1.7.2.

1.3.3.4 Nitrosotioles

En 1998, Nawasaga *et al.* proporcionaron los únicos datos reportados sobre la reacción entre el HNO y el S-nitrosoglutatión (GSNO), que produjo una rápida disminución de los niveles de GSNO [112]. Además, en estas condiciones se genera •NO y la tasa de producción de •NO depende de la cantidad de HNO añadida. En este contexto, el NO⁻ podría reaccionar como nucleófilo y atacar el átomo de nitrógeno del GSNO, lo que daría lugar a un intermediario que podría descomponerse para generar dos moléculas de •NO y el correspondiente tiol, GSH (ecuaciones 1.12 y 1.13). La liberación de •NO a partir del intermediario formado en la reacción 1.12 no es sorprendente, ya que este intermediario es estructuralmente similar a una clase bien conocida de dadores de •NO comúnmente denominados “NONO-atos” [119].



1.12



1.13

1.3.3.5 Reacciones diversas

Se ha establecido que el HNO es capaz de reducir rápidamente por un electrón una variedad de oxidantes biológicos, incluyendo hemoproteínas [84, 110, 120], metaloenzimas (como la superóxido dismutasa) [121–123], flavinas [95], y triptófano [124, 125]. Además, en los últimos 15 años, se estudió la reacción entre el HNO y varias especies fisiológicas tal como nitritos [61, 126], hidroxilamina, ascorbato, NADH y NADPH (Figura 1.6) [126, 127]. En todos los casos, se obtuvieron constantes de velocidad de segundo orden con valores entre 10^3 y $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [126, 127]. Además, HNO puede ser oxidado rápidamente por una variedad de porfirinas [90, 128–130].



Figura 1.6 Resumen de la reactividad del HNO.

El conocimiento de la reactividad del HNO se ha aprovechado para el desarrollo de métodos de detección. Por ejemplo, un sensor electroquímico de HNO en tiempo real basado en porfirinas de Co(II) fue desarrollado por nuestro grupo, cuyo límite de detección llega al nivel nanomolar [131, 132]. Por otro lado, las fosfinas se utilizan ampliamente para la construcción de sondas de detección, especialmente fluorescentes [133, 134]. Se profundizará sobre este tema en la siguiente sección.

La reactividad del $\bullet\text{NO}$ con agentes reductores moderados para dar HNO, biológicamente compatibles, se discutirá en la sección 1.7.2.

1.4 Detección

La discriminación inequívoca entre HNO y •NO continúa siendo el desafío central de los métodos de detección. Históricamente, los investigadores han desarrollado múltiples ensayos y sondas para cuantificar el •NO en soluciones biológicas, cada uno de los cuales tiene ventajas e inconvenientes [135–137]. Por otro lado, en las dos últimas décadas surgieron varios métodos de detección y cuantificación de HNO [1, 40, 138]. Las estrategias de detección pueden clasificarse como directas o indirectas, en función de si el analito a determinar es HNO o un producto de reacción.

1.4.1 Métodos indirectos

Inicialmente, la detección de HNO se basaba en evaluaciones indirectas de subproductos de reacción como el N₂O por CG-MS o FT-IR [37, 139].

Actualmente existen diversos métodos de detección indirecta, por ejemplo, mediante el uso de tioles como atrapanes. Los tioles reaccionan rápidamente con HNO, dando lugar a la formación de sulfinamidas RS(O)NH₂ [140]. Estas especies son estables, específicas y pueden ser detectadas por HPLC-UV, lo que permite la discriminación entre HNO y •NO [118, 141–143].

Además, HNO también puede ser monitoreado por EPR. Particularmente, las sondas paramagnéticas basadas en nitronil nitróxidos reaccionan de manera diferencial frente a HNO y •NO, lo que permite la discriminación entre estas especies [144, 145]. En particular, se ha propuesto su encapsulación en liposomas como medio para mejorar la detección indirecta de HNO [145]. Una ventaja importante de este último método es que puede ser adecuado para sistemas biológicos, ya que no se esperan interferencias y los reactivos están protegidos de la degradación por la matriz liposomal.

1.4.2 Métodos directos

Los métodos que permiten la detección de HNO de manera directa, están constituidos principalmente por espectrometría de masas [146], las sondas de fluorescencia [134, 140, 147], atrapamiento con porfirinas de Mn (III) [128, 130, 148] y el sensor electroquímico

[131, 132, 149]. En la figura 1.7 se resumen los métodos directos e indirectos de detección de HNO.

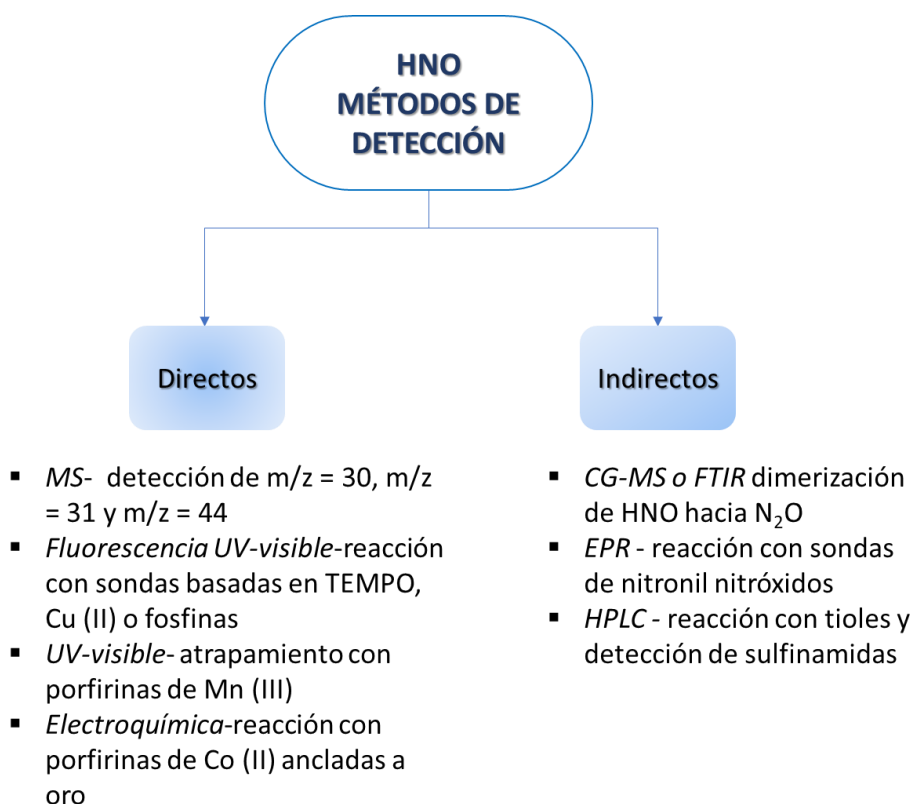


Figura 1.7 Resumen de los métodos de detección directos e indirectos de HNO.

La espectrometría de masas con entrada de membrana es una técnica que se utiliza desde 1963 para detectar gases disueltos en fases líquidas. La utilización de una membrana hidrófoba semipermeable impide que la fase líquida entre en el espectrómetro de masas [150, 151]. En 2011, Toscano *et al.* adaptaron esta técnica para la detección de HNO (Figura 1.8) [151, 152]. Se logró la detección de HNO generado a partir de dadores mediante la observación del ion fragmentado NO^+ y N_2O^+ , a partir del seguimiento a lo largo del tiempo de la intensidad de los picos a $m/z = 30$ y $m/z = 44$, respectivamente [153]. Sin embargo, no siempre fue posible observar inequívocamente la señal en $m/z = 31$. De hecho, el espectro de HNO muestra una señal más alta para $m/z = 30$ que para $m/z = 31$, debido a la fragmentación a fragmentación a NO^+ . Esta señal puede proceder de la generación de HNO o del ^{15}NO naturalmente abundante formado a partir de la fragmentación del N_2O . Se realizaron experimentos de control con N_2O , y se observó que la relación $m/z = 30$ a $m/z = 31$

era de 255:1. Por lo tanto, si la relación observada es menor, puede considerarse una prueba de la producción directa de HNO. Por otro lado, una relación m/z 44 a m/z 30 menor a 1.9, indicaría que el NO^+ generado proviene de la fragmentación de HNO y no de N_2O .

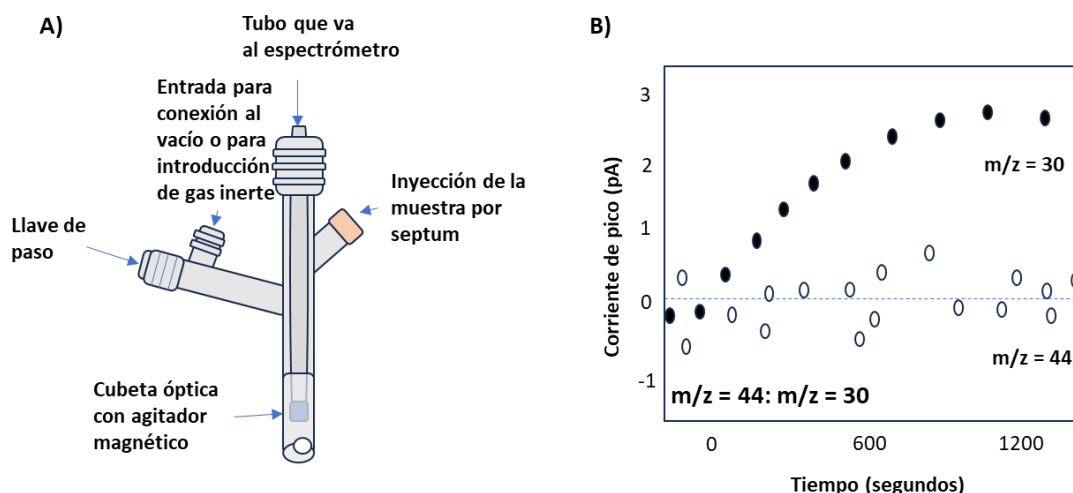


Figura 1.8 Espectrometría de masas con entrada de membrana. A) Esquema de una celda anaeróbica con entrada de membrana para mediciones de espectrometría de masas y absorción UV-visible, reproducida de la ref [151]. B) Espectro ejemplo de una señal MIMS observada tras la adición de 5 μM de 2BrPA (2-Bromo-ácido de piloty) a una solución 0,1 M de *buffer* purgado con argón a pH 7,4, reproducido de la ref [152]

Las porfirinas de Fe y Mn reaccionan con HNO. Sin embargo, mientras que las porfirinas de Fe reaccionan con HNO dando el mismo producto que para la nitrosilación reductiva con exceso de $\bullet\text{NO}$, las porfirinas de Mn no reaccionan con óxido nítrico o lo hacen muy lentamente. Por lo tanto, son capaces de discriminar HNO/ $\bullet\text{NO}$ de manera selectiva [128, 130, 148]. En concreto, el atrapamiento genera la conversión de la porfirina Mn (III) en Mn (II)NO (el complejo nitrosilado), lo que se evidencia por un desplazamiento UV-Vis de unos 30 nm en la banda de Soret (por su descubridor Jacques-Louis Soret), ver la figura 1.9.

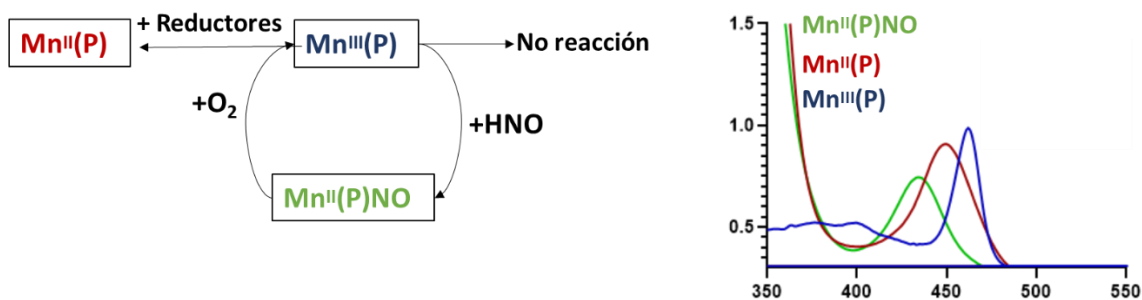


Figura 1.9 Discriminación entre HNO y •NO por porfirinas de Mn(III). *Izquierda*: reacciones involucradas. *Derecha*: espectro UV-visible de las porfirinas de Mn en sus diferentes formas.

Por otro lado, las sondas fluorescentes, así como el sensor electroquímico se desarrollaron en los últimos 15 años [154–157]. Estas técnicas posibilitaron el estudio de las reacciones del HNO en diversas condiciones fisiológicas (incluso en células vivas) y con alta sensibilidad (hasta el nivel nM). Ambas son técnicas complementarias (Figura 1.10), las sondas fluorescentes permiten la identificación inequívoca del HNO en el interior de las células, mientras que el sensor electroquímico puede utilizarse para obtener información sobre las concentraciones en tiempo real del HNO que ha atravesado la membrana celular.

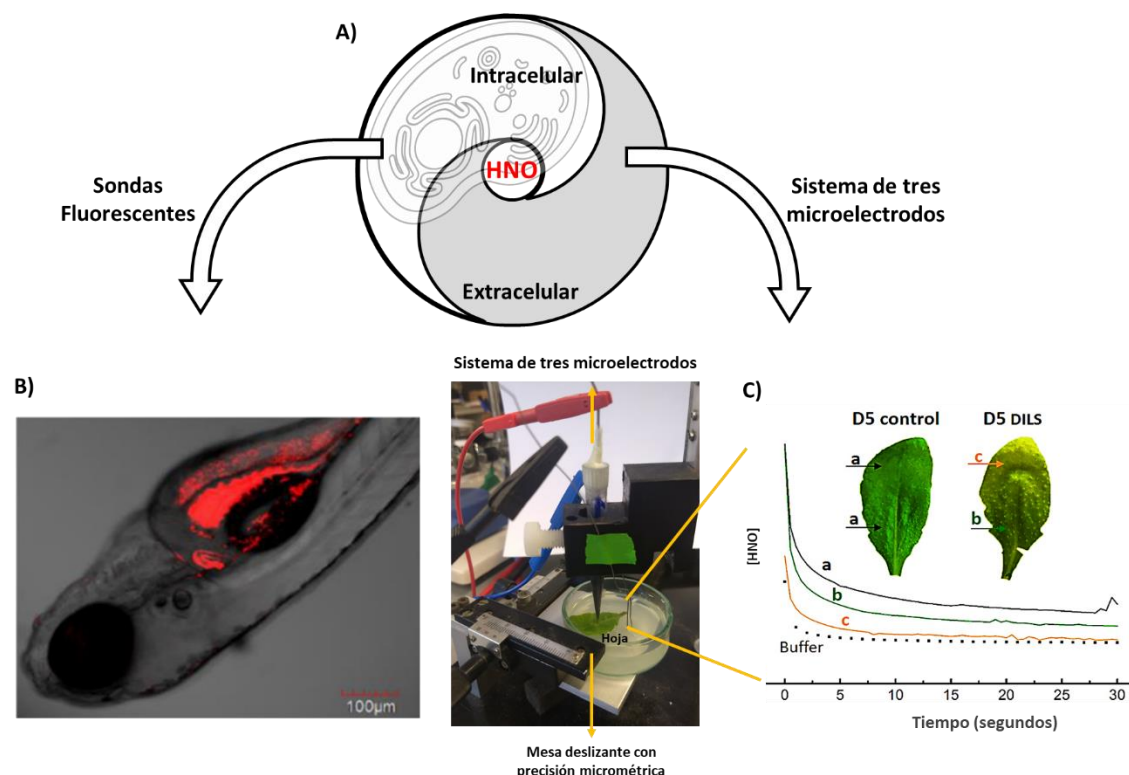
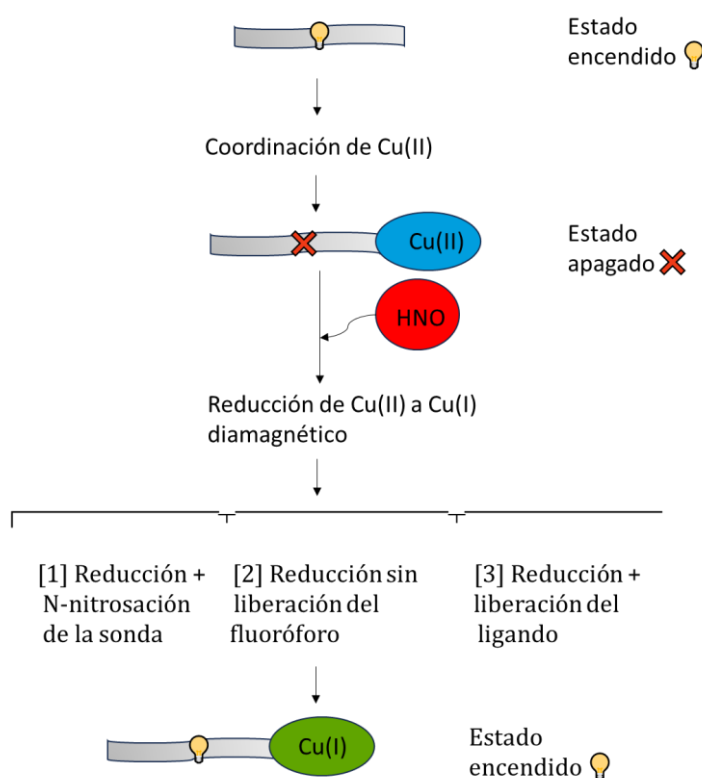


Figura 1.10 Las sondas fluorescentes y el sensor electroquímico se han convertido en herramientas imprescindibles para desentrañar las complejas interacciones del HNO con notable sensibilidad. A) Las sondas fluorescentes son fundamentales para estudiar la dinámica del HNO en el entorno celular, mientras que el sensor electroquímico ha demostrado su utilidad para monitorizar de forma continua y en tiempo real las concentraciones de HNO a medida que atraviesa la membrana celular. B) Imágenes de fluorescencia del HNO en el pez cebra. Barras de escala = 100 μm. Reproducido de la ref. [158]. C) Configuración de tres microelectrodos y concentración nanomolar de HNO registrada *in vivo* en función del tiempo en zonas foliares con diferente contenido de clorofila. Adaptado de ref. [159].

Las sondas fluorescentes pueden clasificarse en: sondas fluorescentes de HNO basadas en cobre [137], sondas fluorescentes de HNO basadas en TEMPO (TEMPO: 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil), [160] y sondas fluorescentes de HNO basadas en fosfinas [147]. La reacción de TEMPO con HNO genera los productos TEMPOL-H y •NO a través de una abstracción neta de hidrógeno del HNO al radical nitróxido [160, 161]. No obstante, esta clase de sondas no son deseables para bioaplicaciones debido a la complejidad de la química radical en los sistemas vivos. Por otro lado, la capacidad de las fosfinas para atrapar HNO se aprovechó para la construcción de sondas de detección altamente específicas. Además, los sistemas de detección basados en estas especies se emplearon tanto para el desarrollo de

métodos colorimétricos como fluorescentes, biológicamente compatibles a niveles nano y micromolares [133, 134, 138, 162, 163]. Por ejemplo, los derivados de fosfinas con carbamatos liberan p-nitrofenol tras reaccionar con HNO. Este producto de color amarillo brillante constituye la base de la detección colorimétrica [133].

Por otro lado, la mayoría de las sondas fluorescentes sensibles al HNO se basan en la misma estrategia de reducción del Cu: cuando el Cu(II) se coordina a las sondas, la emisión se apaga (estado apagado); entonces, en presencia de HNO, el Cu(II) paramagnético se reduce a Cu(I) diamagnético y se restablece la fluorescencia (estado encendido). La intensidad de la fluorescencia es, por lo tanto, proporcional a la concentración de HNO. En estas sondas, se sabe que la fluorescencia se restaura por tres posibles mecanismos: [140, 164, 165] i) fluorescencia desencadenada por reducción acompañada de N-nitrosación de la sonda [166, 167], ii) fluorescencia desencadenada por reducción debida a la reducción de Cu(II) sin liberación del fluoróforo [164], y iii) respuesta desencadenada por reducción debida a la reducción de Cu(II) a Cu(I) diamagnético por HNO, seguida de la liberación del ligando [168] (esquema 1.3).



Esquema 1.3 Estrategia reducción de Cu (II) de las sondas fluorescentes sensibles a HNO.

Finalmente, el desarrollo del sensor electroquímico se basa en una combinación innovadora de conocimientos de química de coordinación, especies reactivas de nitrógeno, electroquímica y electrónica [132]. El sensor se basa en una porfirina de cobalto que

permite la selectividad de HNO, e interactúa con el soporte del electrodo (en este caso oro). El sistema se encuentra a un potencial de 0,8 V frente a Ag/AgCl, donde [Co(P)] es estable con un estado de oxidación del cobalto +3 y observándose únicamente corriente basal. En presencia de HNO, se produce Co(III)(P)NO^- , que se oxida a Co(III)(P)NO en estas condiciones. El complejo resultante es inestable y libera $\bullet\text{NO}$, lo que permite la regeneración de la porfirina original y el inicio de un nuevo ciclo (Figura 1.11). La intensidad de corriente obtenida es proporcional a la cantidad de HNO presente[149]. De esta forma, el sensor electroquímico permite determinar la concentración de HNO con alta precisión (nanomolar) en un rango dinámico de 1 nM - 100 μM . Además, este sensor es selectivo frente a otras moléculas pequeñas como RNOS, ROS, $\bullet\text{NO}$, CO, O_2 , ni H_2S , y puede ser utilizado *in vitro* e *in vivo* (en sangre y/o tejidos) [131, 132].

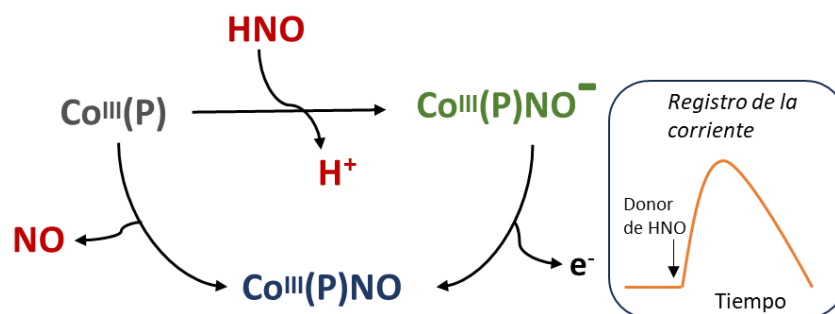


Figura 1.11 Reacciones implicadas en la detección amperométrica de HNO por Co(P).

En resumen, las sondas fluorescentes y el sensor electroquímico son técnicas complementarias, ya que su convergencia permite la realización de estudios detallados de su comportamiento en células vivas a través de la identificación, visualización y cuantificación.

1.5 Efectos farmacológicos

El HNO surgió inicialmente como componente biológicamente activo en estudios derivados de la cianamida (H_2NCN), un fármaco utilizado para tratar el alcoholismo. La cianamida debe ser oxidada por la catalasa/ H_2O_2 para dar lugar al HNO a través del intermediario N-hidroxicianamida. El HNO es un potente inhibidor pH dependiente de la Aldehído Deshidrogenasa, una enzima implicada en el metabolismo del etanol a acetato. A pH 7,5 e inferior, la inhibición ocurre de manera predominantemente irreversible a través de la formación de una sulfinamida. Por otro lado, a pH 8,5 y superior la inhibición es reversible

por formación de un puente disulfuro intra-subunidad. Ambas formas de la enzima inhibida se derivan a través de un intermediario común N-hidroxisulfenamida producido por la adición de HNO a tioles de cisteína del sitio activo [14, 35, 169]. Otros trabajos demostraron que el HNO liberado a través de la cianamida también producía vasorrelajación en la aorta torácica de conejo [14]. Esto se vio respaldado por la observación de que la N,O-dibenzoil-N-hidroxicianamida (DBHC), un derivado de la N-hidroxicianamida que libera HNO en ausencia de catalasa/H₂O₂, era un potente vasorrelajante, con una EC₅₀ de $4,2 \pm 1,3 \times 10^{-6}$ M [14].

El HNO también es un posible agente anticancerígeno ya que se demostró que inhibe irreversiblemente la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la enzima clave de las células tumorales para obtener energía. A partir de modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama, se comprobó que el HNO suprime la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humano, de una manera dosis-dependiente. Esta inhibición va acompañada de una disminución significativa de la densidad de vasos sanguíneos en los tumores tratados con HNO [170]. Además, las pruebas experimentales sugieren el potencial terapéutico del HNO en la farmacología de tumores, como el neuroblastoma, los tumores gastrointestinales y los cánceres de ovario, pulmón y mama [171, 172]. De hecho, se demostró que los compuestos dadores de HNO atenúan la proliferación tumoral y la angiogénesis [170, 173]. Además, otro artículo demostró la capacidad del HNO para suprimir el crecimiento de cánceres que sobreexpresan una proteína llamada MAT-8 [174]. Esta proteína protege a las células tumorales contra la apoptosis al modificar los niveles de calcio celular. El HNO induce la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína transmembrana de la proteína MAT-8, lo que alivia la inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ y desencadena el estrés del retículo endoplásmico, haciendo que la célula sea susceptible a la apoptosis y la destrucción [174].

Por otro lado, el HNO relaja la musculatura del tracto gastrointestinal hiperpolarizando los miocitos mediante la activación de la vía sGC/cGMP de forma similar al •NO. Esta acción ocurre, no sólo inhibiendo la Rho-quinasa y activando la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP, por sus siglas en inglés) como hacen tanto el •NO como el H₂S, sino también aumentando el Ca²⁺ citosólico para la activación de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de pequeña conductancia (SKCa) que contribuyen a la hiperpolarización [175]. Además, el HNO provoca la hiperpolarización de las neuronas mientéricas, cuya función principal es el control de la motilidad intestinal, un efecto también asociado a un aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺. La sal de Angeli produce un aumento significativo de la concentración citosólica de Ca²⁺ a la concentración 50 µM y una hiperpolarización de la

membrana desde un potencial de membrana en reposo de -56 a -63 mV. Aunque los canales de potasio dirigen principalmente los cambios de potencial de membrana en estas células, las corrientes de potasio rectificadoras hacia el exterior no se vieron afectadas significativamente por 50 μ M de sal de Angeli [176].

La disfunción endotelial es un importante factor de riesgo de varias de las complicaciones vasculares de la diabetes, incluido el ictus isquémico. Los efectos inotrópicos y lusitrópicos positivos del HNO se potencian en el miocardio gravemente diabético. En corazones aislados de este modelo preclínico de rata con diabetes mellitus de tipo 2, las respuestas inotrópicas, lusitrópicas y vasodilatadoras coronarias al dador de •NO DEA/NO estaban alteradas, mientras que las respuestas al dador de HNO sal de Angeli estaban preservadas o mejoradas [177]. La posibilidad de que se conserve la actividad del HNO en condiciones patológicas relacionadas con el estrés oxidativo indica que los donantes de HNO pueden representar un enfoque terapéutico viable para el tratamiento de la disfunción vascular [178].



Figura 1.12 Efectos farmacológicos del HNO.

El HNO desempeña otras funciones a nivel biológico derivadas de su reactividad hacia los grupos tiol de las proteínas [15, 179, 180]. Por ejemplo, HNO atenúa la actividad de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y la neurotoxicidad, ya que ofrece protección contra la excitotoxicidad basada en el glutamato [181].

Por otro lado, un estudio identificó la capacidad del HNO para inducir modificaciones en 21 proteínas de las plaquetas humanas, cuyas funciones van desde el metabolismo y la reorganización del citoesqueleto hasta la transducción de señales [182]. En consecuencia, la sal Angeli, dador de HNO, conduce a la inhibición de la agregación plaquetaria de forma dependiente del tiempo y de la dosis [182].

Además, se ha prestado mucha atención al papel del HNO en el sistema cardiovascular [179, 183, 184]. El HNO exhibe propiedades únicas, potencialmente cardioprotectoras, distintas de las del •NO. Por ejemplo, el HNO es resistente a la eliminación por especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), cuyos niveles suelen ser elevados en patologías cardiovasculares, mientras que el •NO es muy reactivo con el superóxido, formando un segundo ROS, el peroxinitrito [49]. En general, se demostró que el HNO tiene efectos beneficiosos tanto en corazones sanos [185] como en situación de insuficiencia cardíaca [186, 187]. Se ha demostrado que el HNO señala a través de vías dependientes de la GC soluble e independientes de esta enzima en la vasculatura y el miocardio [188]. En miocitos cardíacos aislados, el HNO aumenta la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) y la probabilidad de apertura de los receptores de rianodina a través de dichas modificaciones redox, acelerando la recaptación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (acelerando la relajación) y su liberación (potenciando el desarrollo de la fuerza sistólica) [185]. Esto ocurre por un mecanismo independiente de los receptores β -adrenérgicos, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Además, el HNO modifica las proteínas sarcoméricas para aumentar su sensibilidad al Ca^{2+} y, con ello, la generación de fuerza sistólica [187, 189].

El HNO provoca vasodilatación, al menos en parte, al inducir la formación de un enlace intradisulfuro entre C117 y C195 en el sitio de unión de alta afinidad del monofosfato de guanosina cíclico de la proteína cinasa I dependiente del monofosfato de guanosina cíclico (PKG1) [190]. Asimismo, el donante de HNO CXL-1020 disminuye la presión arterial al dirigirse a C195 en la proteína kinasa dependiente de guanosina cíclica-3',5'-monofosfato. El CXL-1020 no redujo la presión arterial en animales normotensos mientras que la administración a ratones hipertensos de tipo salvaje redujo su presión arterial en 10 ± 4 mm Hg ($P=0,0184$) [190].

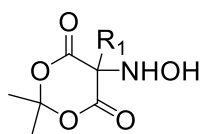
Otra aplicación terapéutica del HNO en el sistema cardiovascular es su uso como potente agente precondicionante, que ayuda a paliar las consecuencias negativas de un episodio isquémico y la consiguiente lesión por reperfusión. Esta lesión inicia con una privación de flujo sanguíneo, lo que puede llevar a necrosis e hipoxia del tejido cardíaco. Los estudios en animales muestran que se consiguió una disminución drástica del tamaño del infarto al

pretratar el tejido cardiaco con sal de Angeli; sin embargo, también se observó que el HNO aumenta el tamaño del infarto si se administra durante un episodio isquémico [184]. La figura 1.12 resume los efectos farmacológicos del HNO.

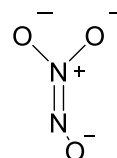
1.6 Dadores

Si bien el óxido nítrico puede ser almacenado, en ocasiones se requiere el uso de dadores. Por ejemplo, en tratamientos terapéuticos que requieren una administración continua y controlada de •NO [191, 192]. Entre los más utilizados se encuentran los NONO-atos (N-diazeniodiolatos), nitroprusiato de sodio y los nitrosotioles, cuya utilidad se ha probado, por ejemplo, en aplicaciones cardiovasculares [193].

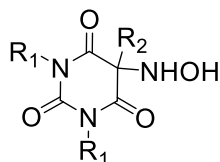
Por otro lado, el HNO es una molécula altamente reactiva, lo que deriva en una estabilidad muy baja. Debido a esta característica, en el estudio de la química y de los efectos biológicos del HNO, resulta imprescindible el uso de dadores. En los últimos años se han acumulado una gran variedad de dadores de HNO, muchos de los cuales poseen potenciales aplicaciones médicas [194, 195]. La liberación del HNO puede producirse por diferentes estímulos, dependiendo de la naturaleza química del dador. En la figura 1.13 se muestran las estructuras más representativas de cada uno de los tipos de dadores de HNO.



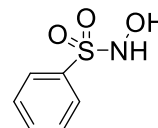
Ácido de Meldrum (hidroxilamino, HAMA)



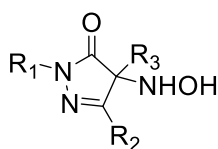
Sal de angeli



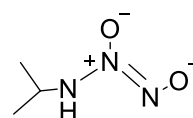
Ácido barbitúrico (hidroxilamino, HABA)



Ácido de piloty



Pirazolona (Hidroxilamino, HAPY)



Isopropilamina NONOato (IPA/NO)

Figura 1.13 Estructuras representativas de los de dadores de HNO.

La sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$), el dador utilizado en esta tesis, es quizás el más elegido. Esta sal se mantiene estable a bajas temperaturas y pH alcalino, lo que permite almacenarlo en solución. La liberación de HNO tiene lugar en solución a pH entre 6 y 8, mientras que a pH ácido puede descomponerse para dar $\bullet\text{NO}$ [196]. Es posible conocer su concentración exacta a través de su máximo de absorción en 248 nm a pH alcalino cuyo coeficiente de extinción molar es de $8.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [30].

El ácido de Piloty (N-hidroxibencenosulfonamida, PA, por sus siglas en inglés) es un compuesto capaz de liberar HNO en condiciones alcalinas. Sin embargo, en los años recientes se ha demostrado que es posible la liberación de HNO mediante la aplicación de otros estímulos. Por ejemplo, la donación fotoquímica de HNO se logró irradiando soluciones de este dador con luz visible en presencia de un complejo Ru-bpy como actuador [197]. Por otro lado, en estado sólido, PA puede liberar HNO mediante la administración de NH_3 gaseoso tal como lo expuesto en un trabajo reciente [198]. Además, los derivados PA pueden liberar HNO frente a estímulos muy variados, lo que condujo al desarrollo de fármacos. Sin ir más lejos, a partir de una modificación estructural de PA se desarrolló un

dador de HNO de primera generación para pacientes con insuficiencia cardiaca, el CXL-1020 [199].

Otros compuestos que liberan HNO de manera pH dependiente son los N-diazeniodiolatos (NONOatos a base de amina) (IPA, Figura 1.13). Su estructura es similar a la sal de Angeli, con uno de los oxígenos reemplazados por un residuo de amina orgánico. Es posible obtener tanto dadores de •NO como de HNO, dependiendo de la naturaleza del residuo amina [200–202].

Un grupo interesante de dadores con una cinética de liberación de HNO dependiente del pH son los derivados de hidroxilamina, en los que el grupo -NHOH está unido a un átomo de carbono de un grupo saliente. Los ejemplos más representativos de estos dadores son los derivados del ácido de Meldrum (HAMA) [203], ácido barbitúrico (HABA) [204] y pirazolona (HAPY) [205]. HAMA y HABA son los dadores más lentos y débiles. Por otro lado, los derivados de pirazolona HAPY, son mejores dadores debido a su estabilidad y reversibilidad, de hecho, muestran potencial como una clase muy prometedora de dadores farmacológicos de HNO [206, 207]. La modificación de los sustituyentes en las posiciones de R₁, R₂, R₃ da lugar a una familia de donantes HAPY-1-12 que liberan HNO en condiciones fisiológicas.

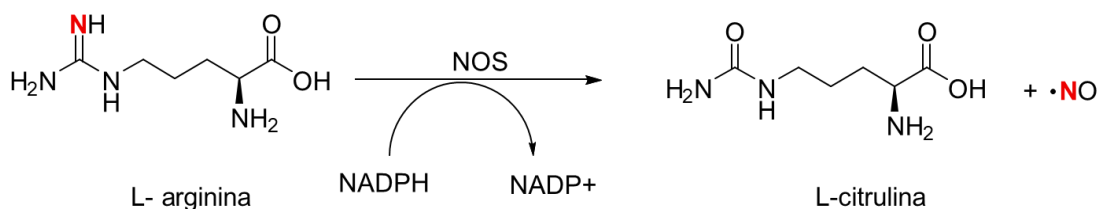
Los acil nitrosos, intermediarios inestables en la oxidación de los ácidos N-hidroxiamida o N-hidroxiurea, son compuestos dadores de HNO. Algunas modificaciones de estos compuestos condujeron al desarrollo de dadores fotoactivables por exposición a la luz UV [208, 209]. Por otro lado, los compuestos aciloxi nitrosos liberan HNO de una manera dependiente del pH. En primer lugar, sufren una escisión que da lugar a un alcohol nitroso intermediario. Este intermediario es muy inestable y se descompone rápidamente a HNO y cetona [210].

Además, existen otros dadores que pueden liberar HNO por estimulación mediante irradiación con luz Xe. Por ejemplo, N-alcoxisulfonamidas cuya donación de HNO se da por desencapsulamiento y no depende del pH. [211]

1.7 Generación endógena

Como ya se ha mencionado, el óxido nítrico desempeña un papel importante en muchos procesos biológicos, concretamente en lo que respecta a la función cardiovascular regulada por el flujo sanguíneo. La producción de óxido nítrico en medios biológicos se debe principalmente a la actividad de las Óxido Nítrico Sintetas (NOS). En los mamíferos existen

tres isoformas primarias de enzimas NOS: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) y NOS inducible (iNOS). Estas enzimas utilizan L-arginina (L-arg), NADPH y O₂ para producir •NO y citrulina (Esquema 1.4). En condiciones de hipoxia, el •NO puede generarse por reducción de nitrito mediada por metaloenzimas Cu/Fe [212, 213].



Esquema 1.4 Reacción de formación de •NO por acción de la NOS.

Por otro lado, los estudios disponibles sugieren que la producción endógena de HNO puede producirse a través de vías tanto enzimáticas como no enzimáticas. Mientras que las vías enzimáticas se han estudiado más ampliamente, las vías no enzimáticas han ganado importancia (figura 1.14).

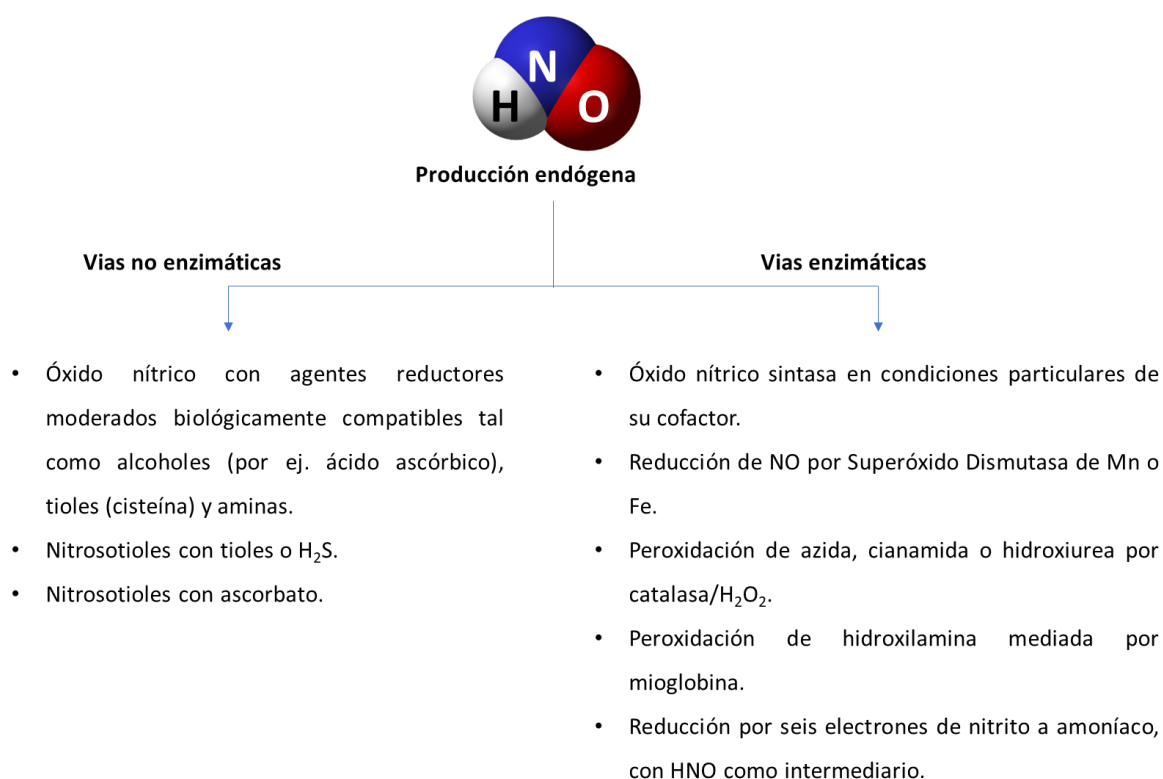
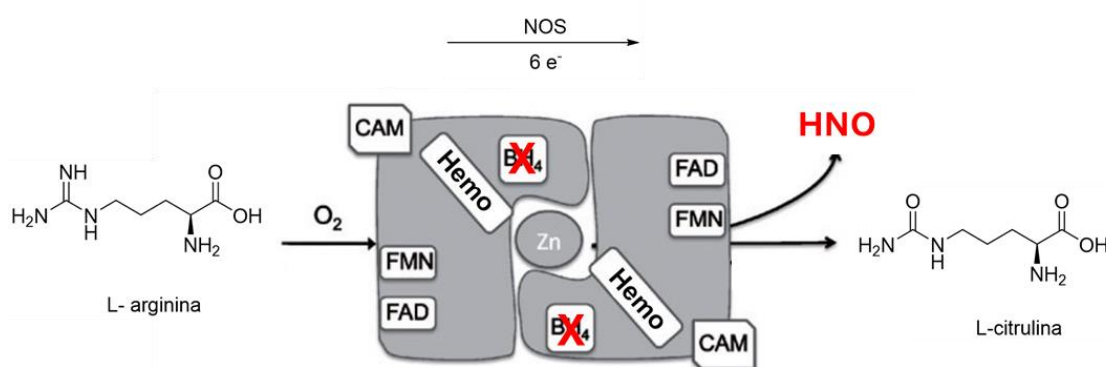


Figura 1.14 Vías de generación endógena de HNO.

1.7.1 Vías enzimáticas

Existen varios reportes sobre la producción de HNO por catálisis enzimática empleando especies nitrogenadas como sustrato. Estas evidencias sugieren fuertemente la posibilidad de que HNO se genere de manera endógena.

- i) En primer lugar, se propuso la generación de HNO por la **actividad enzimática de la Oxido Nítrico Sintasa** (NOS, hemoproteína tipo citocromo P-450) en condiciones particulares de su cofactor [214–216]. En la reacción propuesta (esquema 1.5), el sustrato arginina es reducido por seis electrones para producir HNO:

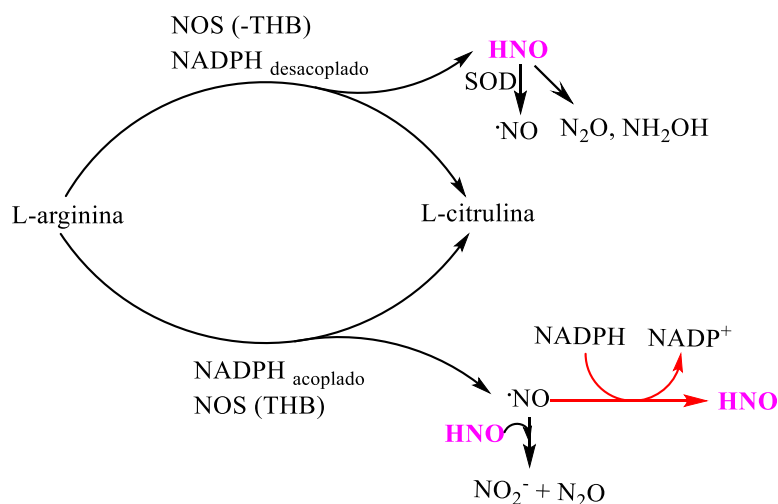


Esquema 1.5 Reacción propuesta para la reducción de L-arginina por seis electrones para producir HNO.

Si bien HNO no se detectó directamente, la formación de un complejo ferroso hemo-NO intermediario así como la producción de N₂O e hidroxilamina, indicarían que HNO puede ser un intermediario, en ausencia de THB [214, 215, 217]. Además, al añadir la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya reacción secundaria consiste en la conversión de NO⁻ en •NO, se observó un aumento significativo de la formación de •NO, sin alterar la producción de citrulina [218, 219] (esquema 1.6).

Dado que el desacoplamiento del NADPH a la catálisis de la NOS, en ausencia de THB, da lugar a diferentes intermediarios nitrogenados, y su consumo por mol de citrulina descende bruscamente, podríamos pensar en una vía paralela en la que participaría esta especie. Como es bien sabido, esta especie constituye el poder reductor en la biosíntesis de

otras moléculas. Su potencial de reducción $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ a pH fisiológico es de $-0,32\text{ V}$ ($\text{NADP}^+ + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$) por lo que es posible que se produzca la reducción de $\bullet\text{NO}$ a HNO ($E^\circ = -0,16\text{ V}$) y parte del HNO producido en este sistema se genere por esta vía (esquema 1.6, vía roja). En conjunto, estos datos sugieren que el HNO puede producirse a través de la reacción de oxidación de la L-arginina a citrulina, por acción de la NOS sin su cofactor THB.



Esquema 1.6 Mecanismo de reacción de la NOS en ausencia y presencia de tetrahidrobiopterina. La vía rosa indica una propuesta de generación de HNO a partir de la reducción de $\bullet\text{NO}$ por acción del NADPH, en ausencia del cofactor THB.

ii) El HNO endógeno también puede producirse a través de la **oxidación de la hidroxilamina u otros aminoalcoholes**, como la hidroxilurea o la N-hidroxil arginina (figura 1.15) [114, 220]. Este proceso depende de la actividad de varias hemoproteínas que estabilizan las especies oxo-ferriles, como las peroxidasas [61, 221, 222].

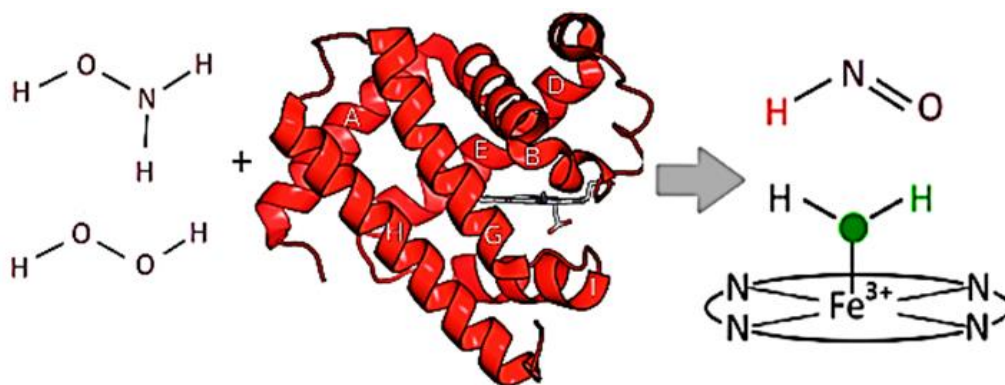


Figura 1.15 Mecanismo de producción de HNO por la oxidación de hidroxilamina mediada por mioglobina.

La producción de HNO por peroxidación de hidroxilamina en reacciones catalizadas por hemo fue inicialmente estudiada por Donzelli *et al.* Los autores concluyeron que, en primer lugar, H_2O_2 reacciona con el centro hemo, formando un intermediario de alta valencia ($\text{Fe(IV)(P}^+\bullet\text{)=O}$). Luego, este intermediario puede reaccionar con NH_2OH o glutatión reducido (GSH), dando lugar a la formación de HNO o glutatión oxidado (GSSG), respectivamente [114]. Por otro lado, en un trabajo más reciente de nuestro grupo, el HNO fue detectado en el sistema hidroxilamina/mioglobina/ H_2O_2 . Este trabajo, con un enfoque mecanístico, permitió concluir que, el estado ferrilo de la mioglobina es el intermediario más probablemente reactivo frente a la hidroxilamina, aportando importantes pruebas de la generación endógena de HNO. Además, la producción de HNO fue mayor en las hemoproteínas en las que el grupo hemo estaba coordinado a una histidina, como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la lactoperoxidasa, la mieloperoxidasa, la mioglobina y la hemoglobina, en lugar de estar coordinado a una tirosina, como en la catalasa, o a una cisteína, como en el citocromo p450 [220].

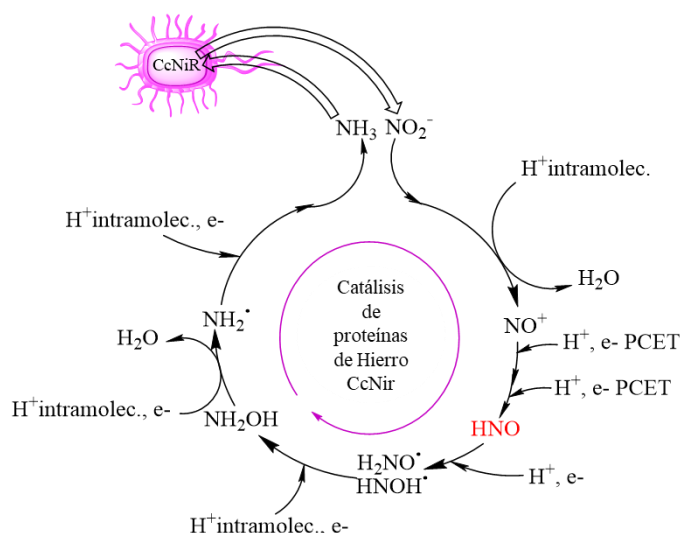
iii) La **enzima catalasa tiene la capacidad de oxidar varios sustratos que contienen N tal como hidroxidurea, azida y cianamida**, con la consecuente producción de HNO [223, 224].

Tras la activación de la enzima catalasa por peróxido de hidrógeno, la reacción con hidroxidurea, da lugar a la formación de un intermediario acil-nitroso. El HNO se forma entonces a partir de la hidrólisis del compuesto acil nitroso y reacciona con la enzima en estado férrico para formar el complejo hemo-NO. Esto permite la liberación de $\bullet\text{NO}$ sin la formación de N_2O [224]. Cuando el sustrato nitrogenado es la cianamida, la oxidación por la

enzima activada produce N-hidroxicianamida, cuya descomposición genera HNO y HCN [14, 35, 169]. Por otro lado, el compuesto azida de sodio también puede ser oxidado por catalasa/H₂O₂ de manera similar a cianamida. Tal como lo expuesto por King *et al.* la peroxidación da lugar a la formación de N-hidroxiázida y luego, por oxidación de la azida, se produce la liberación de HNO [223]. Posteriormente, la reacción entre el HNO y la catalasa da lugar al complejo catalasa-NO.

iv) Otra posible fuente endógena de azanona se deriva de **la reducción de •NO a HNO por la enzima superóxido dismutasa (SOD)** de Mn o Fe [225]. El clivaje en los residuos de histidina del sitio activo, luego de la exposición a •NO indica una inactivación irreversible en FeSOD y MnSOD. Por otra parte, se ha demostrado la generación de especies NO⁺ y NO⁻ mediante la reacción de •NO con las formas reducida y oxidada de la enzima, respectivamente, al detectar sus productos de reacción con otras especies. Asimismo, recientemente, Ivanovic' Burmazovic' *et al.* sintetizaron y emplearon complejos miméticos de SOD de Mn para la reacción con •NO, mostrando un aumento sustancial de la producción de HNO en entornos biológicos [226].

v) Otra propuesta para la producción enzimática de HNO consiste en la **reacción de reducción por seis electrones de nitrito a amoníaco, por la citocromo c nitrito reductasa (CcNir)** en bacterias [227–229]. Aunque el producto final es NH₃, varios complejos intermedios contienen •NO e hidroxilamina, entre otros (esquema 1.7).



Esquema 1.7 HNO se produce como intermediario en la reducción por seis electrones de nitrito a amoníaco, por acción de CcNir.

Se propone que la reducción del nitrito comienza con una escisión heterolítica del enlace $\bullet\text{NO}$, que se ve facilitada por una pronunciada interacción de retrodonación del nitrito coordinado, del nitrógeno al sitio de unión del hierro reducido (Fe(II)), pero no al oxidado (Fe(III)). Este paso es facilitado por la transferencia de un protón desde las cadenas laterales His 277 o Arg 114 y conduce a la formación de una molécula de agua y una especie $\{\text{FeNO}\}^6$. Posteriormente, debido a dos rápidas reducciones de electrones, se forma una especie $\{\text{FeNO}\}^8$ y, mediante una protonación, un aducto $\text{Fe(II)}\text{-HNO}$ [228].

Es probable que la reducción de este intermediario se produzca por reacciones de transferencia de electrones acoplada a protones (PCET). La primera de ellas puede dar lugar a dos posibles radicales isoméricos intermedios $\text{H}_2\text{NO}\bullet$ o $\text{HNOH}\bullet$. Lo más probable es que reciban un protón intramolecular de un aminoácido de la propia enzima para dar lugar al intermediario hidroxilamina. En este punto se produce la segunda escisión heterolítica del ciclo del enlace N-O. La escisión se apoya en la donación de un protón intramolecular y da lugar a la formación del radical intermedio $\text{NH}_2\bullet$. De nuevo, la reducción del radical a NH_3 se apoya en la donación de un H^+ intramolecular. Finalmente, el NH_3 se libera del sitio activo de la enzima en el estado Fe(III) , permitiendo que el ciclo comience de nuevo [228].

1.7.2 Vías no enzimáticas

En los últimos 15 años se ha explorado la reducción química biológicamente compatible del $\bullet\text{NO}$ como ruta directa hacia la producción de HNO [57, 58, 230]. Las concentraciones finales de nitrito en solución y la cantidad de N_2O en el *headspace* (espacio de cabeza) del tubo de reacción se encuentran en una proporción aproximada de 1:1, como se espera de la reacción entre el HNO y el $\bullet\text{NO}$ (Ecuación 4). Además, los rendimientos de los productos orgánicos son superiores a los correspondientes rendimientos de N_2O [57, 58, 231], lo que indica que estos compuestos también se producen por otras rutas que no producen HNO . A continuación, se desarrollarán los mecanismos específicos para cada tipo de agente reductor moderado biocompatible estudiado hasta el momento.

1.7.2.1 Formación de HNO a partir de la reacción de $\bullet\text{NO}$ con tioles

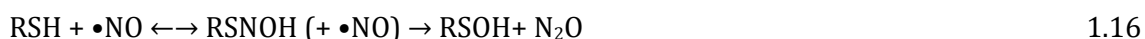
Los tioles son moléculas que contienen el grupo funcional SH . Su importancia en medios biológicos se debe principalmente a que forman parte de los aminoácidos cisteína de las proteínas y su reactividad puede modificar tanto la estructura como la función de las mismas. Por supuesto, existen otros tioles con actividad biológica, como el glutatión.

Estudios pioneros llevados a cabo por Pryor *et. al.* sugieren que la reacción se inicia con la formación de un intermediario radical, el tionitróxido $\text{RSNOH}\bullet$, seguida de protonación y acoplamiento radical (Ecuaciones 1.14 y 1.15) [232].



La dihidroxihidrazina ($\text{RSN}(\text{OH})\text{N}(\text{OH})\text{SR}$) producida en la Ecuación 1.15 es inestable, generándose el ácido hiponitroso (HONNOH) y el disulfuro (RSSR) [34, 233]. Luego, el ácido hiponitroso se descompone en H_2O y N_2O [232].

Además, Nagasawa *et al.* estudiaron en 1995 la reacción anaeróbica de una proteína que contiene tioles, la albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés), y otros tioles biológicos como el glutatión y el ditiotreitól (DTT) a pH 7,4 y 37 °C con un gran exceso (>10 veces) de $\bullet\text{NO}$. Se demostró que estas reacciones, que tuvieron lugar en minutos, produjeron N_2O y el disulfuro correspondiente, excepto en el caso de la HSA, para la que el producto de oxidación observado fue el ácido sulfénico correspondiente (Ecuación 1.16) [234].



Sin embargo, estos autores no consideraron el HNO como posible intermediario de reacción, lo que podría deberse a la falta de herramientas de detección precisas para el HNO en ese momento. Es por ello que en trabajos recientes se ha estudiado la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y tioles con el objetivo principal de evaluar si HNO es un intermediario de reacción. El análisis se centró en las reacciones de $\bullet\text{NO}$ con 1-hexanotiol (R_6SH), cisteína (Cys), bencenotiol (Ph-SH) y bencenoselenol (Ph-SeH), utilizando $\text{Mn(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxifenil)-porfirinato}$ (Mn(III)TCPP) como atrapante de HNO [130], el electrodo selectivo de HNO [131, 148, 235], y métodos *ab initio*. Los resultados revelaron que la reacción es de primer orden en ambos reactivos y que la velocidad de producción de HNO varía en el siguiente orden $\text{Ph-SeH} > \text{Ph-SH} \gg \text{R}_6\text{SH} > \text{Cys}$. Cys y $\text{R}_6\text{-SH}$, ambos tioles alifáticos, muestran una reactividad similar, con constantes de velocidad efectivas (k_{eff}) aproximadamente cuatro veces menores que las observadas para Ph-SH y Ph-SeH (tabla 1.1). Esto se debe a que los compuestos aromáticos permiten una mejor estabilización del espín no apareado.

Tabla 1.1 k_{eff} y la relación $\text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}$ obtenidas para las reacciones de $\bullet\text{NO}$ con tioles.

Compuesto	k_{eff}	$\text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}$	Referencias
Cisteína	$25 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.2	[58]
1-hexanotiol	$35 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	0.9	[58]
Bencenotiol	$110 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.0	[58]
Bencenoselenol	$125 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	0.9	[58]
Albúmina sérica bobina	$0.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	[236]

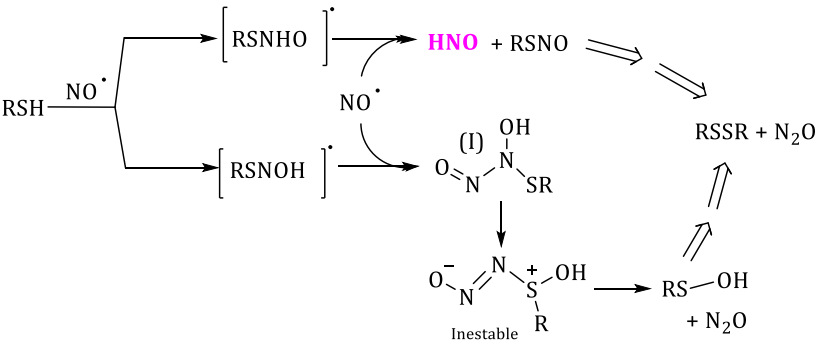
La k_{eff} calculada de esta manera incluye tanto a la velocidad de formación de HNO así como las vías de decaimiento del mismo. Luego, mediante un enfoque de modelado cinético, se revisaron estas constantes con el fin de obtener un valor más cercano al real, diferenciando el aporte de las vías de decaimiento de HNO . Así, la constante de velocidad de formación del aducto inicial entre cisteína y $\bullet\text{NO}$ tiene una constante de $180 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que la k_{eff} reportada anteriormente era de $25 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 1.2) [237]. En la tabla 1.2 se muestran las constantes efectivas (k_{eff}), las constantes de decaimiento ($k_{\text{RX}(\text{HNO}),\text{decaimiento}}$) y las constantes de formación del aducto o de reacción directa ($k_{\text{RXH},\text{NO},\text{aducto}}$ o $k_{\text{RXH},\text{NO},\text{directa}}$) para la reacción entre ácido ascórbico, cisteína y H_2S con $\bullet\text{NO}$. La reacción del ácido ascórbico con $\bullet\text{NO}$ se discutirá más detalladamente en la siguiente sección, junto con los otros alcoholes.

Tabla 1.2 Constantes de velocidad para la formación ($k_{RXH,NO,aducto}$) y descomposición ($k_{RX(HNO),decaimien}$) de aductos o para la reacción directa de ácido ascórbico, cisteína y H_2S con $\bullet NO$ ($k_{RXH,NO,directa}$), así como constantes de velocidad efectivas informadas anteriormente (k_{eff}).

Reacción	$k_{RXH,NO,aducto}$ o $k_{RXH,NO,directa}$	$k_{RX(HNO),decaimien}$ to	k_{eff}
$\bullet NO + AscH^- \rightarrow AscH(HNO)^{\bullet-}$ (1.17)	$28\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$		
$AscH(HNO)^{\bullet-} \rightarrow HNO + AscH^{\bullet-}$ (1.18)		1.8 s^{-1}	
$\bullet NO + AscH^- \rightarrow HNO + AscH^{\bullet-}$ (1.19)	$43\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$		$8\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
$\bullet NO + CysH \rightarrow Cys(HNO)^{\bullet}$ (1.20)	$180\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$		
$Cys(HNO)^{\bullet} \rightarrow HNO + Cys^{\bullet}$ (1.21)		0.5 s^{-1}	
$\bullet NO + CysH \rightarrow HNO + Cys^{\bullet}$ (1.22)	$8 \times 10^2\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$		$25\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
$\bullet NO + HS^- \rightarrow S(HNO)^{\bullet-}$ (1.23)	$8 \times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$		
$S(HNO)^{\bullet-} \rightarrow HNO + S^{\bullet-}$ (1.24)		0.16 s^{-1}	
$\bullet NO + HS^- \rightarrow HNO + "S^{\bullet-}"^{(a)}$			
$\bullet NO + HS^- + X/X^{\bullet} \rightarrow HNO + SY^{\bullet-}/SY^-$ (b) (1.25)			$6 \times 10^3\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$

(a) Reacción altamente desfavorable. (b) Esta reacción sería favorable si otros reactivos ($X/X^{\bullet}$) reaccionan de manera concertada o secuencial con un $S^{\bullet-}$ transitorio para producir un $SY^{\bullet-}$ o SY^- . $X/X^{\bullet}$ podría ser una especie derivada del azufre, $\bullet NO$, u otro radical con centro de azufre.

El esquema 1.8 muestra que el primer paso comprende un ataque nucleofílico acoplado a protones (PCNA) del tiol a $\bullet NO$ que da lugar a un radical tionitrito intermediario $RSN(H)O\bullet$.



Esquema 1.8 Mecanismo de reacción de $\bullet NO$ con tioles para dar HNO .

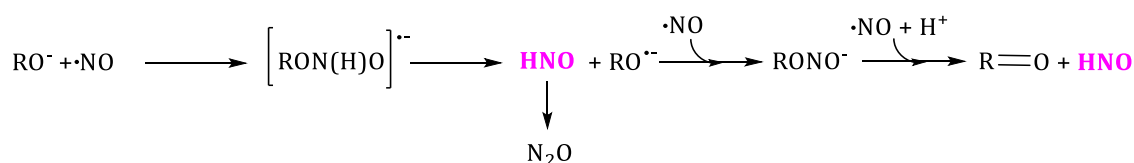
La descomposición directa de $RSN(H)O\bullet$ para producir HNO y un radical tiilo $RS\bullet$ es altamente desfavorable ($>30\text{ kcal/mol}$); por lo tanto, se espera que el tionitrito reaccione rápidamente con una segunda molécula de $\bullet NO$, produciendo intermediarios di- NO -tiol

(especie (I) en el Esquema 1.8) o HNO y RSNO. La relevancia de este tipo de reacción radica en la elevada presencia de tioles en medios biológicos, como los residuos de cisteína de las proteínas o glutatión.

1.7.2.2 Formación de HNO a partir de la reacción de $\bullet\text{NO}$ con alcoholes aromáticos y pseudoaromáticos

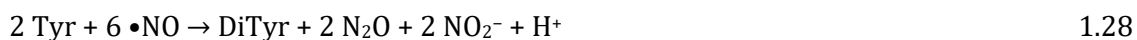
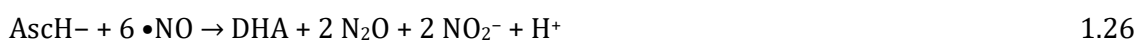
La reacción entre alcoholes y $\bullet\text{NO}$ se ha explorado desde 1986. Carlsson *et al.* investigaron la exposición anaeróbica de poliolefinas oxidadas a $\bullet\text{NO}$ mediante espectroscopia infrarroja. Observaron la desaparición de sus bandas características y la aparición de nuevas bandas, indicando una reacción entre ellos [238]. En 2002, Cadenas *et al.* sugirieron la formación del anión NO^- y el radical semiquinona DOPAC a partir de la reacción entre el ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) y el $\bullet\text{NO}$ [239]. Otro estudio demostró que el $\bullet\text{NO}$ contribuye a la oxidación mitocondrial del ubiquinol (UQ) mediante una reacción que produce $\text{UQ}\bullet$ y NO^- , así como especies reactivas de nitrógeno y oxígeno derivadas de la autooxidación del $\text{UQ}\bullet$ [240]. El HNO se midió indirectamente por su reacción con la metmioglobina y a partir de la detección de N_2O por cromatografía de gases [241].

Si bien, los estudios anteriores sugirieron la formación de HNO, ninguno lo ha demostrado directamente. Una reciente investigación del grupo de trabajo se centró en el estudio de la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y alcoholes aromáticos o pseudoaromáticos, incluyendo el anión ascorbato (AscH^-), fenol (PhOH), hidroquinona (HQ) y tirosina (Y), utilizando diversas metodologías [57], ver la tabla 1.3. Se observó que la reacción se producía cuando el $\bullet\text{NO}$ se combinaba con ascorbato y alcoholes aromáticos, mientras que no lo hizo con homólogos alifáticos como metanol, D-manitol o ácido málico. En este contexto, una reducción de esfera externa junto a la liberación/captura de protones es termodinámicamente desfavorable, debido a los potenciales de reducción de los alcoholes. Por lo tanto, la reacción puede describirse mejor como un ataque nucleofílico del anión (como el ascorbato) al $\bullet\text{NO}$, acoplado con la transferencia de un protón desde una fracción OH vecinal o disolvente. Este mecanismo puede explicarse entonces como una Proton-Coupled Nucleophilic Attack (PCNA, por sus siglas en inglés), que produce una especie intermedia $\text{RO-N(H)O}\bullet$, la cual se descompone para liberar HNO, de forma similar al mecanismo propuesto para la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y tioles (esquema 1.9).



Esquema 1.9 Mecanismo de reacción de $\cdot\text{NO}$ con alcoholes para dar HNO.

Como ya se ha mencionado, los productos finales son NO_2^- , N_2O y el correspondiente compuesto orgánico oxidado (dehidroascorbato (DHA), benzoquinona (BQ) y ditirosina (DiTyr), ecuaciones 1.26-1.28):



A la inversa, los radicales alcoxilo podrían reaccionar con otro radical correspondiente, como la tirosina, para formar ditirosina. Alternativamente, podrían reaccionar con una segunda molécula de $\cdot\text{NO}$ para formar un compuesto O-nitroso, similar al proceso observado con dioles como el ascorbato o la hidroquinona. Mediante cálculos DFT se observó que la producción de HNO se ve favorecida tanto por la alta afinidad N-protón como por la estabilidad del radical alcoxi. La primera favorece la unión del protón al $\cdot\text{NO}$ mientras que la segunda promueve la transferencia de electrones. Por lo tanto, aquellos alcoholes que se sabe que forman radicales estables podrán reducir $\cdot\text{NO}$ más fácilmente. Esta es la razón por la que los alcoholes aromáticos o pseudoaromáticos reaccionan para reducir el $\cdot\text{NO}$ a HNO, y los alcoholes alifáticos como el metanol no lo hacen.

Luego, se investigó la capacidad para generar HNO a partir de $\cdot\text{NO}$ de medicamentos y vitaminas que contienen grupos fenólicos, como el alfa-tocoferol (vitamina E), el ácido acetilsalicílico (aspirina) o el paracetamol (acetaminofeno) [230]. Los resultados indicaron que los tres compuestos tenían esta capacidad. La aspirina, un éster acetilado aromático, no reacciona inicialmente con el $\cdot\text{NO}$ debido a su grupo hidroxilo (-OH) protegido. Sin embargo, en el estómago se convierte en ácido salicílico, que reacciona con el $\cdot\text{NO}$. Del mismo modo, el piroxicam también produce HNO al reaccionar con el $\cdot\text{NO}$.

Tabla 1.3 k_{eff} y la relación $\text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}$ obtenidas para las reacciones de $\bullet\text{NO}$ con alcoholes

Compuesto	k_{eff}	$\text{NO}_2^-/\text{N}_2\text{O}$	Referencias
Anión ascorbato	$8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.2	[57]
Fenol	$3.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	[230]
Hidroquinona	$6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.2	[57]
Tirosina	$1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.2	[57]
Acetaminofeno	$1.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	[230]
Acido salicílico	$0.34 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	-	[230]
Piroxicam	$0.26 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$		[230]

Finalmente, se utilizó un enfoque de modelado cinético para obtener los valores de las constantes de velocidad de formación de HNO , se evaluó la constante correspondiente a la reacción directa de AscH^- con $\bullet\text{NO}$ (Ecuación 1.29) [237]



La constante de velocidad se midió simulando la velocidad de generación y decaimiento de la señal del radical ascorbilo, seguida de EPR resuelta en el tiempo. La constante de velocidad directa para la reacción entre el anión ascorbato y el $\bullet\text{NO}$ fue 5 veces superior a la k_{eff} comunicada anteriormente ($k_{\text{AscH}^-, \text{NO}, \text{directo}} = 43 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{eff}} = 8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [41, 237]. Este valor se aproxima más al valor real, ya que no está influido por las reacciones que consumen HNO (Tabla 1.2).

1.7.2.3 Formación de HNO a partir de la reacción de $\bullet\text{NO}$ con aminas

La reacción entre aminas y $\bullet\text{NO}$ se ha estudiado desde principios de los años sesenta. Drago y Paulik sugirieron que la reacción entre dietilamina y $\bullet\text{NO}$ se produce por donación de pares de electrones desde la amina al dímero de $\bullet\text{NO}$, $(\text{NO})_2$ [242]. Esta reacción requiere bajas temperaturas para promover la formación del dímero [242, 243]. Por otro lado, la reacción de la melatonina con $\bullet\text{NO}$ en acetonitrilo produce nitrosomelatonina [244]. Ohsawa *et al.* sugirieron la formación de HNO como uno de los posibles intermediarios de la reacción entre aminas primarias, secundarias y terciarias con $\bullet\text{NO}$ en disolventes orgánicos, como el dicloroetano. Aunque esta reacción se produce lentamente en

condiciones anóxicas, puede ser catalizada por O_2 , mediante la formación del altamente reactivo N_2O_3 . Es bien sabido que el $\bullet NO$ reacciona con el O_2 para dar $\bullet NO_2$, y luego el $\bullet NO_2$ se transforma en N_2O_3 en exceso de $\bullet NO$ [245, 246]. Sin embargo, todas estas reacciones muestran que tienen lugar en condiciones químicas específicas, como disolventes orgánicos (como el acetonitrilo o el dicloroetano), la presencia o ausencia de oxígeno y, en algunos casos, requiriendo temperaturas altas o bajas y presiones elevadas.

Recientemente, se ha confirmado que las alquilaminas reaccionan con el $\bullet NO$ en una solución acuosa a temperatura ambiente y en condiciones de presión atmosférica liberando HNO [231]. Mediante un análisis mecanístico *ab initio*, se observó que la reacción entre la dietilamina (DEA) y la isopropilamina (IPA), y el $\bullet NO$ es muy endergónica, sin embargo, la reacción procede lentamente. Esto puede deberse al pH al que tiene lugar la reacción, donde no sólo es importante la estabilización del intermediario, sino que la concentración efectiva de amina es baja [231]. Los valores k_{eff} totales obtenidos son entre 20 y 250 veces menores que los obtenidos para otros agentes reductores moderados (a pH 7,4), como los alcoholes aromáticos o los tioles. Además, como se estima que el HNO es cercano al 10% y tiene una constante de velocidad de generación lenta, no se espera que esta reacción tenga implicancias biológicas.

1.7.2.3 Formación de HNO a partir de la reacción de $\bullet NO$ con H_2S

El H_2S es una pequeña molécula gasotransmisora que ha demostrado tener efectos cardioprotectores por sí misma [247, 248]. Sin embargo, varios estudios han sugerido la existencia de entrecruzamiento de las vías de señalización entre el H_2S y el $\bullet NO$ [249–251]. Estudios recientes confirmaron la formación de HNO por esta vía, como una evidencia más de la generación endógena de HNO [41]. Se desarrollará este tema con más detalle en la sección 5.2.

1.7.2.4 Formación de HNO a partir de la reacción de nitrosotioles (RSNOs) con otros tioles (RSH)

Los efectos biológicos de los S-nitrosotioles se han atribuido a la escisión homolítica del enlace S-N con la liberación de $\bullet NO$. El RSNO es el portador, o la forma de almacenamiento, del $\bullet NO$ *in vivo*, por lo que sirve como reservorio de la bioactividad del $\bullet NO$ [252, 253]. Sin embargo, los estudios de la reactividad de los S-nitrosotioles en condiciones fisiológicas demuestran su capacidad para actuar como donantes, no sólo de $\bullet NO$, sino también de NO^+

y NO⁻ [254, 255]. Un S-nitrosotiol puede reaccionar con un tiol para dar un equivalente de HNO y el disulfuro correspondiente (Ecuación 1.30) [256, 257].



Y, como ya es ampliamente conocido, el HNO generado sigue la ruta de dimerización para dar N₂O y H₂O [33]. Además, la reacción del HNO con el S-nitrosotiol y el tiol restante da lugar a la generación de otras especies, como •NO, sulfinamida e hidroxilamina [112].

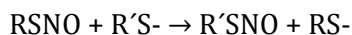
Un aspecto importante a tener en cuenta es el mecanismo por el que se forman los nitrosotioles [258]. Las pruebas sugieren que la formación de nitrosotioles se produce a través de la autooxidación de •NO a N₂O₃, seguida de la recombinación entre esta especie y un anión tiolato que da lugar a la formación de RSNO y nitrito (ecuación 1.31). Esta reacción de autooxidación del •NO depende del oxígeno y, por lo tanto, es relativamente lenta en los sistemas biológicos [107].



Además, si tiene lugar la autooxidación del •NO, las especies nitrosantes pueden ser sus intermediarios ONOONO (o ONONO₂ o O₂NNO₂) o •NO₂ [258]. Por otra parte, el •NO puede dar directamente un nitrosotiol por reacción directa con el radical tiilo RS•. El radical tiilo puede formarse por diversos mecanismos *in vivo*, incluidos los activados por •NO/Fe³⁺ en hemoproteínas férricas [259], y convertirse así en diana para la incorporación directa de •NO, que también es un radical (Ecuación 1.32).



Otro mecanismo es la adición directa de •NO a un tiol para formar un radical tionitroxilo (RSNOH•) seguido de una oxidación de un electrón para formar un nitrosotiol [258]. El Cu²⁺ y el Fe³⁺ pueden catalizar la formación de nitrosotiol mediante la oxidación transitoria de •NO a NO⁺ seguida de una reacción con un tiol [260]. Además, puede producirse una reacción reversible entre un nitrosotiol y un tiol en la que se transfiere un grupo nitroso entre una molécula y la otra. Este proceso ocurre por ataque nucleofílico del anión tiolato sobre el nitrógeno del S-nitrosotiol (ecuación 1.33) [261].



1.33

Esta reacción, provocada por $\bullet\text{NO}$, es relativamente lenta, pero se ha invocado como una forma de transferir « $\bullet\text{NO}$ » de una especie a otra dentro de las células. Además, representa un mecanismo potencial para la modificación postraducciona de residuos de cisteína y la regulación de la actividad enzimática [254, 261–264]. El desequilibrio de RSNO está estrechamente relacionado con procesos fisiopatológicos [265, 266].

Cabe señalar que no existen pruebas que indiquen la formación de nitrosotioles a partir de la reacción directa entre tioles y $\bullet\text{NO}$ en condiciones fisiológicas. Sino que su formación debe estar mediada por otro proceso redox. Sin embargo, el análisis mediante métodos *ab initio* demostró que la reacción entre el $\bullet\text{NO}$ y el tiol produce un aducto radical libre $\text{RSNOH}\bullet$. A continuación, este aducto reacciona con una segunda molécula de $\bullet\text{NO}$, lo que da lugar a la producción de HNO y nitrosotiol. El intermediario nitrosotiol reacciona además con RSH para generar una segunda molécula de HNO y RSSR, lo que concuerda con reportes anteriores [55]. Por otra parte, la reacción de nitrosoglutatión/ H_2S ha ganado amplia referencia como fuente biológicamente relevante de HNO [255, 267]. La mezcla de estas dos especies produce potentes efectos vasorrelajantes, más rápidos y pronunciados que los efectos del nitrosoglutatión por sí mismo. Además, la sensibilidad del efecto a los tioles apoya la idea de que el HNO es un producto de la reacción [255]. Sin embargo, resultados recientes argumentan en contra de la generación de HNO libre como vía principal en esta reacción y en su lugar implican que algunos intermediarios aún no caracterizados generan los gases nitrogenados [249, 268].

1.7.2.5 Formación de HNO a partir de la reacción de nitrosotioles (RSNOs) con ascorbato

Kirsch *et al.* demostraron que la azanona podía formarse en la reacción entre nitrosotioles y ascorbato con altos rendimientos a valores de pH fisiológicos [269]. Los espectros de RMN ^{15}N de una mezcla de reacción enriquecida con nitrosoglutatión (GS^{15}NO) permitieron detectar señales de $^{15}\text{NO}_2^-$ y $^{15}\text{N}_2\text{O}$, una clara evidencia del intermediario HNO. Además, fueron capaces de detectar HNO a concentraciones mucho más bajas mediante el método de detección colorimétrica por reacción con porfirinas de Mn (III). Además de los tioles, el ascorbato puede ser un nucleófilo diano para los S-nitrosotioles generando O-nitrosoascorbato (ecuación 1.34). Entonces, a pH fisiológico, una de las posibles vías

competitivas de descomposición del O-nitrosoascorbato produce ácido dehidroascórbico (DHA) y HNO (ecuación 1.35) [270].



Aunque no se trata de una vía de reacción única, ya que pueden formarse otros productos intermediarios al mismo tiempo, el rendimiento del HNO es del 60%. Así, la generación de HNO por esta vía es altamente competitiva con reacciones que ocurren en paralelo, lo que demuestra su enorme relevancia biológica.

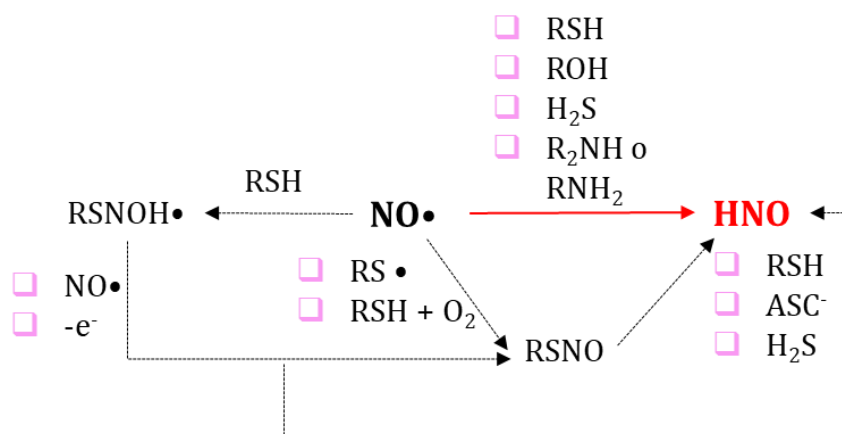


Figura 1.16 Vías de formación de HNO a partir de •NO por reducción directa y por intermediación de otras especies.

En resumen, la reducción directa de •NO a HNO puede producirse al reaccionar con tioles, alcoholes, H₂S y aminas (Figura 1.16). Por otro lado, es posible obtener HNO pasando a través de los RSNOs, que a su vez se pueden formar a partir de la reacción del •NO con otras especies. Los RSNOs pueden reaccionar con tioles, alcoholes, ascorbato o H₂S para formar HNO. La relevancia de estos entrecruzamientos radica en la posibilidad de que todos ellos estén ocurriendo biológicamente y ofrecen una perspectiva de la posible formación endógena no enzimática de HNO.

Capítulo 2

Metodología General

Capítulo 2. Metodología general

2.1 Métodos anaeróbicos

Todas las reacciones estudiadas en este trabajo de tesis son extremadamente sensibles al O_2 , por lo cual, a lo largo de su desarrollo se emplearon diferentes métodos para conservar la anaerobiosis. Sin embargo, muchas de las estrategias empleadas son comunes para todos los experimentos.

Un elemento crucial para la correcta ejecución de estos estudios anaeróbicos es la línea de Schlenk. Se trabajó entonces con una línea de vidrio conectada por un lado mediante una manguera a una bomba de vacío EDWARDS, y a un tubo de argón de alta pureza (Alphagaz-1, 99.999%), por otro (Figura 2.1).

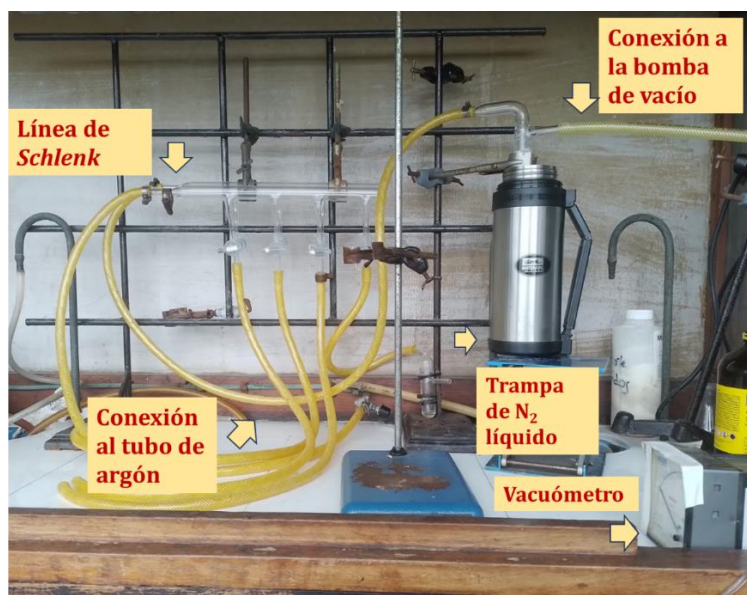


Figura 2.1 Foto de la línea de Schlenk utilizada en todos los experimentos anaeróbicos.

La línea se encuentra segmentada, lo que posibilita aplicar tanto vacío como flujo de argón por una misma manguera. Esta característica permitió conectar, tubos, balones u otros elementos de vidrio y aplicarles ciclos de vacío/rellenado con argón, eliminando así el aire que es reemplazado por el gas inerte. Además, en todas las ocasiones se colocó una trampa con N_2 líquido para evitar que el aire o solventes ingresen a la bomba de vacío. Asimismo, se conectó un vacuómetro PIRANI con el fin de conocer el nivel de vacío alcanzado por el sistema en cada experimento. Se consideró un sistema anaeróbico óptimo aquel cuyo nivel de vacío se encontraba por debajo de 10^{-2} mbar.

La manipulación de los solventes se hizo dentro de balones de Schlenk. A estos se les aplicó, inicialmente, un flujo de argón durante 30 minutos y luego se utilizó la técnica de *Freeze-Pump-Thaw*. De esta manera se considera que el solvente se encuentra libre de oxígeno y apto para ser utilizado.

Por otro lado, para el trasvase de soluciones o gases en anaerobiosis se requirió del uso de jeringas apropiadas. Las mismas fueron del tipo *gastight* o similar, mientras que las agujas fueron descartables y, en los casos requeridos especialmente, se utilizaron agujas de metal. Para volúmenes pequeños se utilizaron jeringas Hamilton de 25, 50 y 250 μl .

Además, la preparación de las soluciones fue un paso clave para la conservación de la anaerobiosis. Este paso debió ser estrictamente anaeróbico, ya que existe una alta probabilidad de que haya contaminación con O_2 al agregar el solvente al sólido. Para ello se colocaron los sólidos en viales y estos, a su vez, adentro de tubos de Schlenk. Los viales se encontraban tapados con septum y una aguja incrustada que permitía el intercambio de vacío o gas con la atmósfera del tubo (Figura 2.2).



Figura 2.2 Tubo de Schlenk con viales adentro, que contienen los sólidos a disolver.

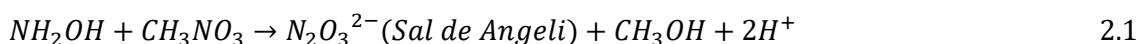
Se les aplicó 5 ciclos de vacío/rellenado con gas inerte. Y luego, con el tubo en sobrepresión de argón, se quitó el tapón de vidrio y se inyectó el solvente previamente desgasado. Siempre que se requirió extraer soluciones preparadas de estos sistemas, se destapó el tubo con sobrepresión de argón. Así, se eliminó la posibilidad de que el O_2 ingrese durante el proceso.

2.2 Síntesis de Sal de Angeli

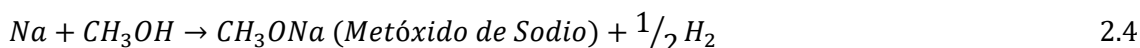
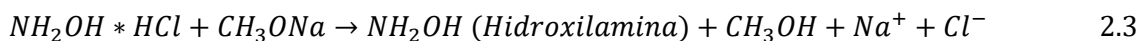
La síntesis de este dador de HNO se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en bibliografía [196]. A continuación, se detallan las reacciones involucradas y los procedimientos empleados para este fin.

2.2.1 Reacciones involucradas

La Sal de Angeli ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) se produce mediante la nitración de hidroxilamina (NH_2OH) por acción de nitrato de metilo (CH_3NO_3) según se describe en la ecuación 2.1:



Previamente a la síntesis, se deben preparar ambos reactivos. Por un lado, el nitrato de metilo se obtuvo nitrando metanol por acción de HNO_3 en presencia de H_2SO_4 (ecuación 2.2). Por otro lado, se debe liberar la hidroxilamina de su clorhidrato haciéndola reaccionar con (CH_3ONa) el mismo día de la síntesis de la sal de Angeli. Esto se debe a que la hidroxilamina es mucho más inestable cuando se encuentra en forma libre, lo que podría dar lugar a reacciones indeseadas derivadas de su oxidación o descomposición térmica (ecuación 2.3). Por su parte, el metóxido de sodio utilizado en este paso se preparó mediante la reacción de Na° en metanol seco (ecuación 2.4).



2.2.2 Procedimiento experimental

2.2.2.1 Síntesis de nitrato de metilo

En una ampolla de decantación se colocaron 120 ml de HNO_3 y 120 ml de H_2SO_4 (solución A). Esta solución se agregó gota a gota sobre una solución conformada por 60 ml de CH_3OH y 20 ml de H_2SO_4 (solución B), que se encuentra previamente enfriada en baño de hielo y sobre un agitador magnético (Figura 2.3).

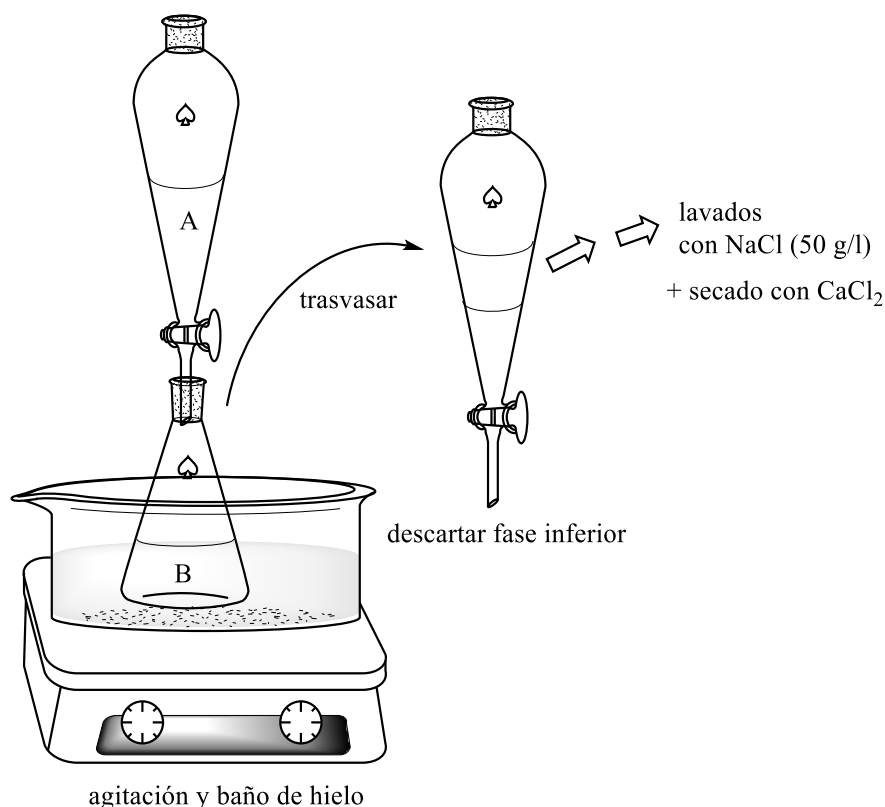


Figura 2.3 Procedimiento para la síntesis de nitrato de metilo.

La temperatura no debe superar los 40°C para evitar la formación de $\bullet\text{NO}_2$. Una vez adicionado todo el volumen, se agitó durante 15 minutos obteniendo una mezcla heterogénea de dos fases. Transcurrido ese tiempo, se trasvasó esta mezcla a una ampolla de decantación y se descartó la fase inferior. Luego se realizaron 3 lavados con 50 ml de una solución de NaCl (50 g/l), se secó con agregado de CaCl_2 y filtración.

2.2.2.2 Síntesis de metóxido de sodio

Esta síntesis se lleva a cabo mediante la adición de sodio metálico (Na°) a metanol destilado y seco. Previamente se elimina la capa externa que suele estar oxidada, se estira en láminas

delgadas y se corta en pequeños trozos. Se introducen trozos hasta saturar la solución y, por último, se seca en rotavapor hasta obtener un sólido blanco totalmente seco.

2.2.2.3 Liberación de la hidroxilamina de su clorhidrato

Este es el paso de eliminación del clorhidrato de la hidroxilamina. Para ello, se deben disolver por separado y por medio agitación magnética, 4,5 g (0,08 moles) de metóxido de sodio y 2 g (0,03 moles) de hidroxilamina en 5 ml de metanol seco. Una vez que ambos estén completamente disueltos, se incorpora la solución de hidroxilamina a la solución de metóxido de sodio. A continuación, se centrifuga y se elimina el precipitado, proceso que puede repetirse varias veces para eliminar la mayor cantidad posible de NaCl (figura 2.4).

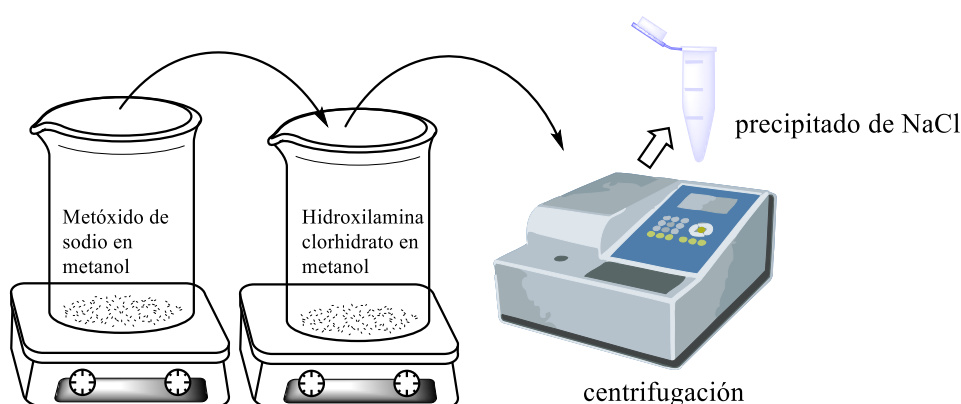


Figura 2.4 Procedimiento para la liberación de hidroxilamina de su clorhidrato.

2.2.2.4 Síntesis de la Sal de Angeli

Este es el paso de la síntesis de Sal de Angeli propiamente dicha que consiste en añadir gota a gota 10 ml de la solución de hidroxilamina libre a 10 ml de la solución de nitrato de metilo. Durante este añadido, la solución de nitrato de metilo debe estar ubicada en un recipiente con hielo y en atmósfera de nitrógeno para evitar la humedad del ambiente. Después de mantener la sal sintetizada una noche en el congelador, se centrifuga y se desecha el sobrenadante. La pureza de la Sal de Angeli se puede calcular por su pico de máxima de absorción (figura 2.5), según el coeficiente de extinción molar reportado en la bibliografía ($\epsilon = 8300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [271]. La ubicación del pico de máxima absorción es dependiente del pH, siendo 235 nm el observado en las soluciones de nuestros experimentos (*buffer* fosfato 10 mM, pH 7,4).

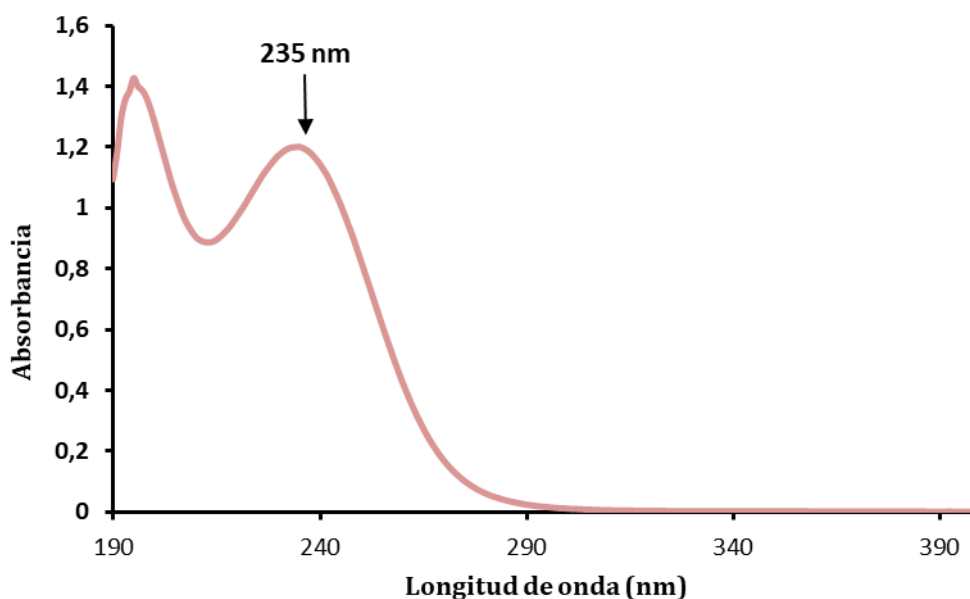


Figura 2.5 Espectro de absorción de Sal de Angeli en *buffer* fosfato 10 mM, pH= 7,4.

2.3 Síntesis de óxido nítrico (•NO)

El •NO se generó mediante la reducción de NO_2^- por acción de Fe^{2+} ($\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{•NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$). La misma consistió en agregar gota a gota entre 5 y 10 ml de H_2O destilada a una mezcla triturada en mortero de FeSO_4 (8,5 g), NaNO_2 (8,5 g) y NaBr (4 g). En un experimento típico, con estas cantidades se obtiene 1 litro de •NO gaseoso con una pureza aproximada del ~99 % [272]. Estos reactivos deben secarse al vacío antes de su uso, sobre todo el FeSO_4 cuya presentación comercial es de la forma heptahidratada. La eliminación de las moléculas de H_2O de este reactivo se evidencian por el cambio de color del sólido, pasando de celeste a blanco. Este paso es muy importante porque garantiza una síntesis controlada del •NO, ya que las trazas de H_2O podrían iniciar la reacción antes de lo deseado.

Para el armado del generador primero se debe decidir la forma de presentación en la que se requiere el •NO. En esta tesis se utilizó de dos maneras diferentes, en fase gaseosa y en solución saturada.

2.3.1 •NO en fase gaseosa

El sistema consistió en dos balones de 3 bocas conectados a través de una manguera (figura 2.6). El primer balón contenía los sólidos mencionados arriba totalmente secos y

mortereados. El segundo balón contenía NaOH seco y mortereado, cuya finalidad es absorber otras moléculas nitrogenadas generadas durante el procedimiento, tal como $\bullet\text{NO}_2$.

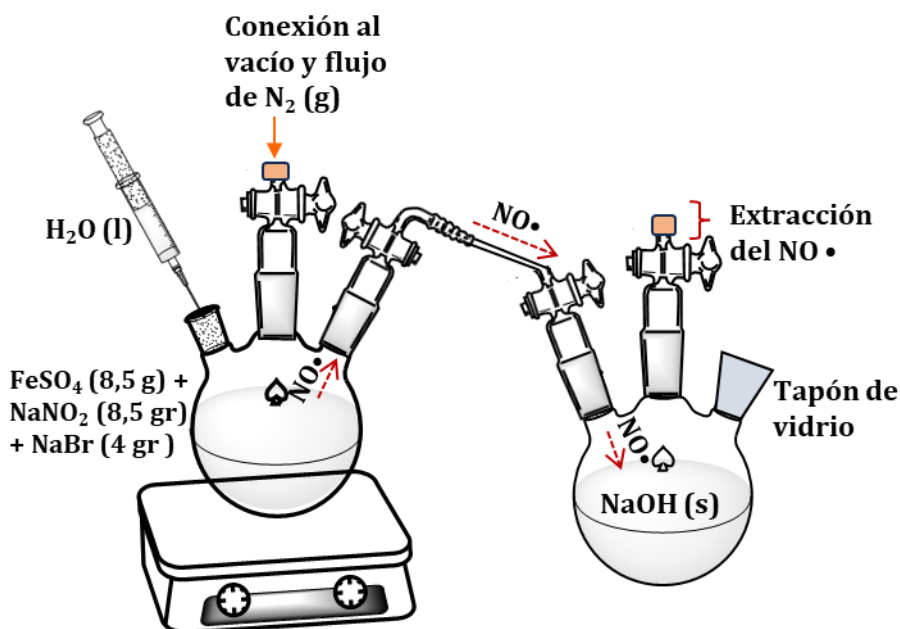


Figura 2.6 Sistema anaeróbico para la síntesis de $\bullet\text{NO}$ a partir de una mezcla de FeSO_4 (8,5 g) + NaNO_2 (8,5 g) y NaBr (4 g).

Antes de comenzar la síntesis del $\bullet\text{NO}$, se hizo vacío a todo el sistema durante 1 hora. Luego, se realizaron ciclos de vacío/rellenado con argón. De esta manera se eliminó el O_2 proveniente del aire. Con el sistema en vacío, se inició la síntesis por inyección de H_2O al balón que contiene los sólidos secos. Para ello, se agregó H_2O de a 1 ml dejando reaccionar unos minutos y verificando si el sistema levantaba la presión. Esto es muy simple de comprobar ya que se produce la elevación del tapón de vidrio ya que no contiene ningún elemento de sostén que lo mantenga unido al balón. Esta subida de presión puede demorar hasta 1 hora. Una vez que ocurrió, se liberó la presión generada en el sistema mediante la conexión a un burbujeador cada 5 minutos, durante 1 hora. Para finalizar, se cerró el robinete, con lo cual, el $\bullet\text{NO}$ generado quedó almacenado dentro del balón con NaOH mortereado y desde allí se fue extrayendo con jeringa de vidrio *gastight*. La extracción del $\bullet\text{NO}$ se realizó por el segmento señalado en la figura 2.6 con extremo cuidado para evitar la contaminación con O_2 . Se hicieron ciclos de vacío/rellenado con argón en el segmento entre el robinete y el tapón de goma (septum) y luego se extrajo con una jeringa con aguja de metal de 21 cm.

La pureza del $\bullet\text{NO}$ fue verificada mediante el análisis de su espectro FTIR luego de cada síntesis, con el fin de corroborar la ausencia de otras especies gaseosas. Particularmente, las trazas de $\bullet\text{NO}_2$ pueden afectar de manera significativa a la reactividad del $\bullet\text{NO}$ frente a otras moléculas, como el H_2S . De esta manera, se pudo conocer que luego de 3 horas, el espectro ya no presentaba las bandas características del $\bullet\text{NO}_2$, es decir que la mayor parte de este gas había sido absorbido por el NaOH . La reacción de absorción de $\bullet\text{NO}_2$ y N_2O_3 (producto de la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y $\bullet\text{NO}_2$), está dada por las ecuaciones 2.5 y 2.6[273]. Con esto en mente, luego de cada síntesis de $\bullet\text{NO}$ nuevo, se esperaron 24 horas para su uso.



2.3.2 $\bullet\text{NO}$ en solución

A diferencia del sistema mencionado anteriormente, aquí el balón que contiene a los sólidos secos se encuentra conectado a un burbujeador con una solución 0,5 M de NaOH . Este, a su vez se conecta por el otro extremo, a través de una aguja, a un vial de recolección que contiene H_2O de calidad milliQ (Figura 2.7).

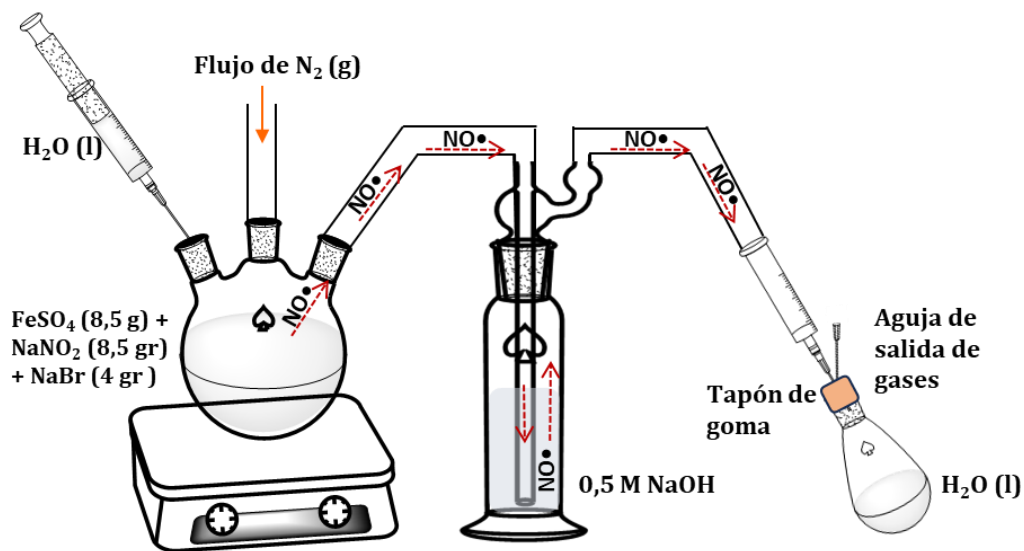


Figura 2.7 Sistema anaeróbico para la síntesis de $\bullet\text{NO}$ en solución saturada a partir de una mezcla de FeSO_4 (8,5 g) + NaNO_2 (8,5 g) y NaBr (4 g).

Antes de comenzar, se eliminó todo el aire del sistema por aplicación de un flujo de N_2 de alta pureza, durante 20 minutos. Luego de este tiempo, se inició la síntesis con el agregado de H_2O desgasada a los sólidos secos, similar a la síntesis de $\bullet\text{NO}$ en fase gaseosa. El burbujeo

de $\bullet\text{NO}$ en el vial de recolección se mantuvo durante 45 minutos, tiempo suficiente para lograr la saturación (1,94 mM) [274].

2.4 Síntesis de sulfuro de hidrógeno (H_2S)

El H_2S se generó por descomposición anaeróbica de Na_2S en ácido fosfórico (H_3PO_4) 1:5 ($\text{Na}_2\text{S} + 2\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{NaH}_2\text{PO}_4$). Para ello, se construyó el sistema de la Figura 2.8, similar a la generación de $\bullet\text{NO}$. El primer balón, en el cual se lleva a cabo la síntesis contiene Na_2S . El segundo balón, en el cual se recolecta y almacena el H_2S , contiene pentóxido de fósforo como absorbente de la humedad. El exceso de H_2S generado con este sistema fue neutralizado por burbujeo en permanganato de potasio (KMnO_4), evitando así que el gas escape y pueda formar otros gases tóxicos tal como SO_2 . Tanto el KMnO_4 como el Na_2S se encuentran conservados dentro de la caja de guantes (o caja seca), lo que los mantiene aislados del O_2 y la humedad.

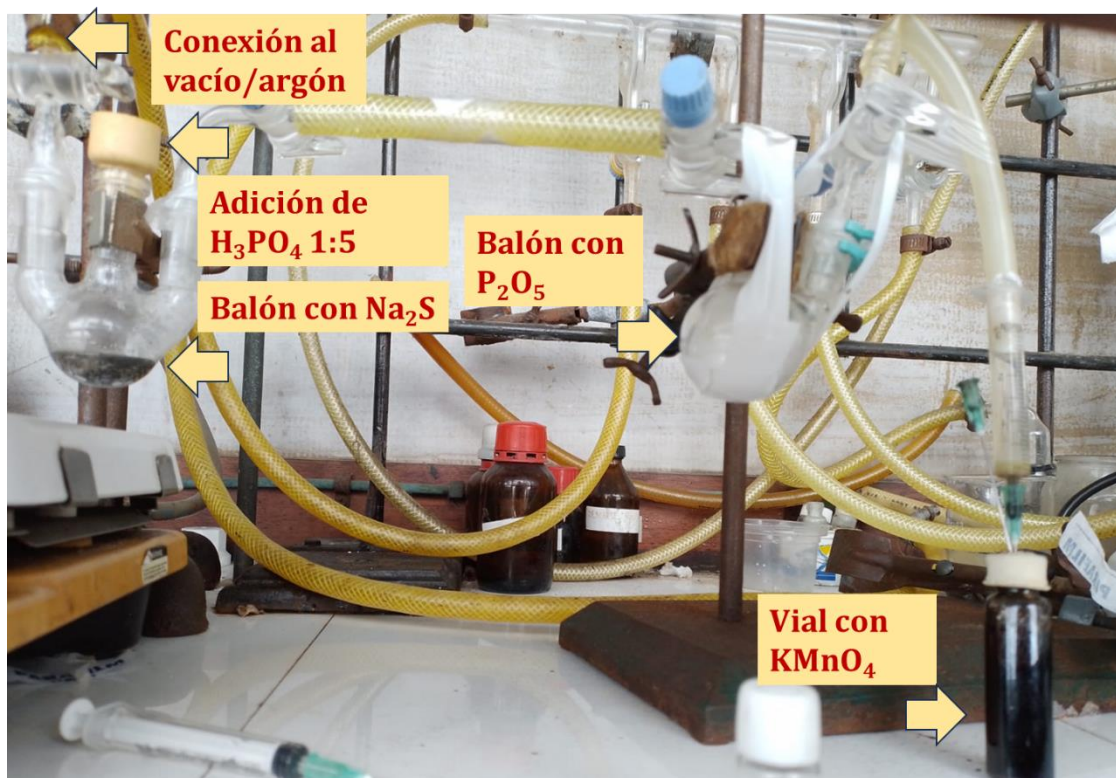


Figura 2.8 Sistema anaeróbico para la síntesis de H_2S .

Antes de comenzar, se realizó el desgasado del sistema por 5 ciclos de vacío/rellenado con argón. De esta manera, se eliminó la mayor parte del aire presente en el mismo. Con el sistema en atmósfera de argón, se inició la síntesis mediante el agregado de H_3PO_4 1:5 al

balón que contiene Na_2S , que debe estar previamente desgasado por aplicación de flujo de argón. Este paso se realizó lentamente (de a gotas) para evitar que la reacción se desencadene de manera violenta. Además, el sistema se mantuvo cerrado para aumentar la presión de gas en el sistema y cada 5 minutos, se liberó la presión generada por apertura del robinete y burbujeo en KMnO_4 . De esta manera todo el argón se fue reemplazando por el H_2S generado. La extracción de gas del balón de almacenamiento se hizo de manera similar a la extracción de $\bullet\text{NO}$.

2.5 Técnicas instrumentales

A continuación, se detallan las técnicas experimentales utilizadas en esta tesis, así como los elementos que tuvieron que ser adaptados para las mediciones en atmósfera inerte.

2.5.1 Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-visible)

Los espectros ultravioleta-visible se registraron con un espectrofotómetro perteneciente al grupo de investigación, HP/Agilent 8453, que se encuentra equipado con una lámpara de deuterio y una de tungsteno. Las mediciones se hicieron en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico adaptada para mantener la anaerobiosis (Figura 2.9).

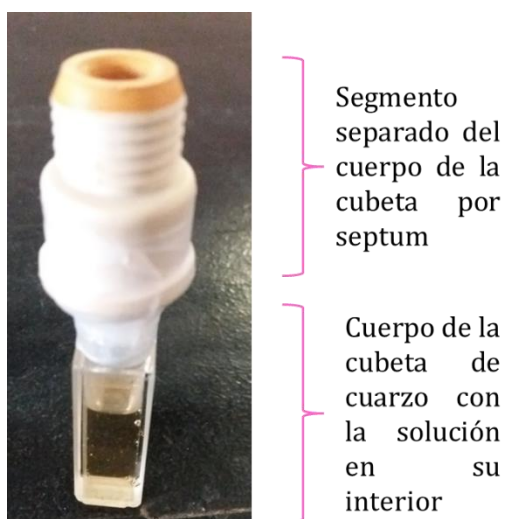


Figura 2.9 Cubeta de cuarzo con 1 cm de paso óptico adaptada para mediciones anaeróbicas.

La atmósfera inerte se consiguió aplicando un flujo de argón de alta pureza al interior de la cubeta, que estaba perfectamente sellada con septum. Además, se le colocó otro septum como segmento para el aislamiento del interior de la cubeta con el ambiente externo. A este segmento se le aplicó también el flujo de gas inerte y en experimentos largos se fue aplicando argón cada 5 minutos.

2.5.2 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR se registraron con un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet iS5 perteneciente al laboratorio de docencia del Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física (DQIAyQF), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Todas las muestras se escanearon y recogieron con una resolución espectral de 1 cm^{-1} en el intervalo espectral de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} ; se recogieron 32 escaneos. Todos los espectros IR en fase gaseosa se registraron utilizando una celda de gases de 8 cm de longitud de paso con ventanas de NaCl (Figura 2.10).

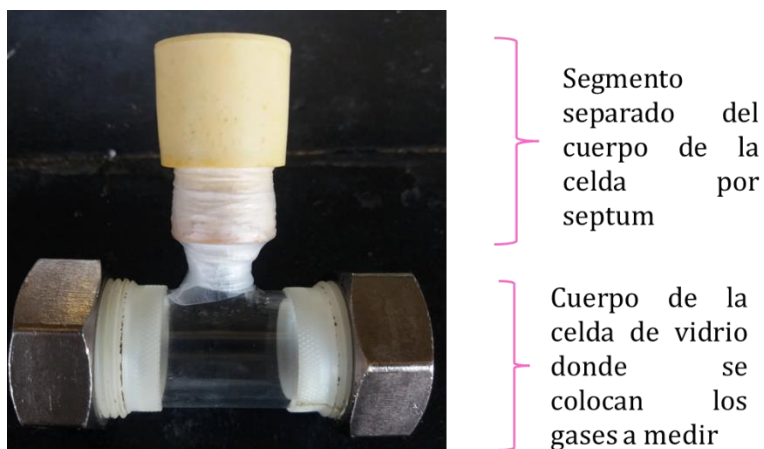


Figura 2.10 Celda para espectroscopía FTIR de gases de 5 cm de paso óptico.

De manera similar a la cubeta empleada en los espectros UV-visible, la celda para gases se encontraba adaptada con un segmento que separaba el interior del ambiente externo. Por medio de este segmento se logró evitar el ingreso del oxígeno al interior de la celda. El desgasado de la misma se hizo mediante aplicación de flujo de argón durante 30 minutos al interior y 5 minutos al segmento separado.

Por otro lado, los espectros de FTIR de sólidos se registraron a partir de pastillas de KBr. Los sólidos se mezclaron con KBr seco y luego se molieron en mortero de ágata (Figura 2.11). Esta mezcla se comprimió en el pastillero con ayuda de una prensa y una llave francesa.



Figura 2.11 Armado de pastilla de KBr para espectroscopía FTIR de sólidos.

2.5.3 Espectroscopia Infrarroja de Reflectancia Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

La espectroscopía ATR-FTIR para la detección de productos azufrados finales se realizó con un espectrofotómetro Thermo Nicolet 8700 FTIR, perteneciente al DQIAyQF, que se encuentra equipado con un detector Smart Orbit y una placa de cristal de diamante (Figura 2.12).

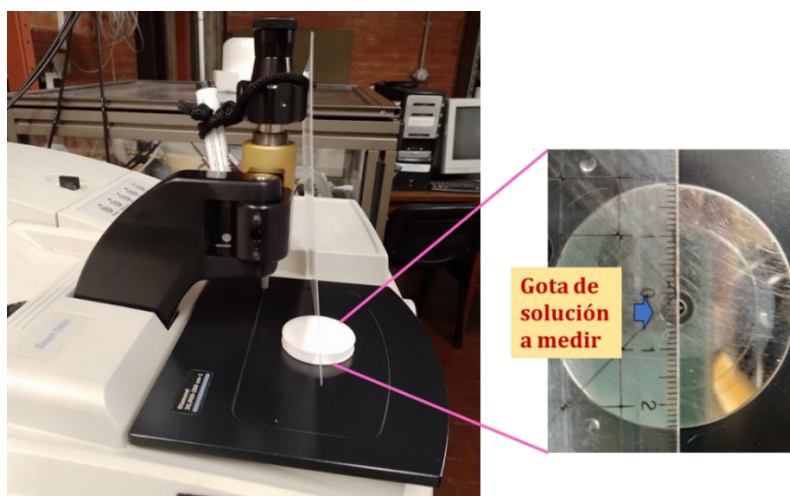


Figura 2.12 Espectrofotómetro ATR-FTIR con placa de cristal de diamante

Los espectros se recogieron en condiciones aeróbicas con una resolución espectral de 4 cm^{-1} en un rango espectral de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} ; se recogieron 64 escaneos. Para cada solución de muestra, se recogió un espectro de fondo y, a continuación, se añadieron $50\text{ }\mu\text{l}$ de la muestra al cristal.

2.5.4 Métodos computacionales

Todas las geometrías se optimizaron sin restricciones mediante el formalismo de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) utilizando el meta-GGA r2SCAN44 y el conjunto de bases def2-TZVPP de Ahlrichs [275]. También se emplearon las interacciones de dispersión de Londres utilizando la corrección D4 de Grimme [276]. Los efectos de los disolventes se simularon utilizando el Modelo de Solvatación Universal (SMD) de Truhlar [277]. También se realizaron cálculos de frecuencia según el modelo del oscilador armónico para garantizar que las geometrías optimizadas son verdaderos mínimos o estados de transición. Un mínimo verdadero no tiene frecuencias imaginarias, y una única frecuencia imaginaria caracteriza un estado de transición. Todos los cálculos de química cuántica se realizaron con la versión ORCA 5.0.3 [278], en colaboración con el Dr. Mateus Venâncio de Universidade Federal da Bahia, Brasil.

Capítulo 3

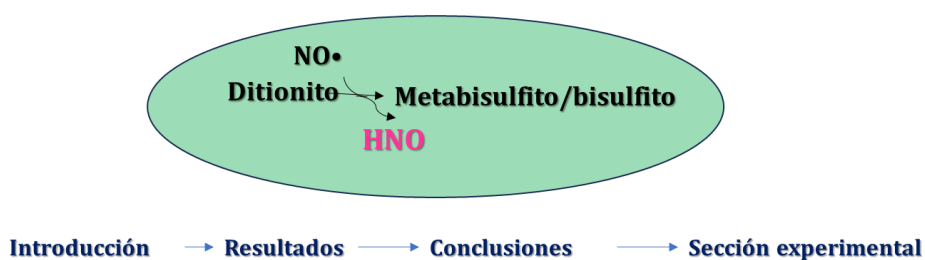
Generación de HNO en la
reacción entre ditionito de
sodio y óxido nítrico en
solución

Capítulo 3. Generación de HNO en la reacción entre ditionito de sodio y óxido nítrico en solución

3.1 Resumen del capítulo

El ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones industriales y científicas. Debido a su potencial de reducción negativo, también es uno de los agentes reductores más importantes utilizados en la investigación bioquímica, sobre todo cuando se desea obtener el estado reducido de enzimas o complejos enzimáticos, especialmente los coordinados a metales de transición. Sin embargo, tras un siglo de amplias investigaciones, existe una gran incertidumbre sobre su modo de acción debido, en parte, a las dificultades para preparar soluciones estandarizadas. La reacción entre ditionito y óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) ha cobrado relevancia porque, en ocasiones en las que se requiere llevar a cabo la reducción enzimática, el $\bullet\text{NO}$ se encuentra presente en la mezcla de reacción y se han percibido efectos que indicarían una reacción paralela entre ellos.

Este capítulo se centra en el estudio de la reacción anaeróbica entre ditionito de sodio y el $\bullet\text{NO}$. En la primera sección, se introdujeron los aspectos más relevantes del ditionito, tales como sus características en solución, su reactividad y su estabilidad. A continuación, se detallarán los resultados obtenidos sobre los productos finales nitrogenados y azufrados, parámetros cinéticos, etc.



Entre los resultados más relevantes tenemos que el gasotransmisor óxido nítrico se convierte en su congénere reducido nitroxilo (HNO), que luego por reacción de dimerización da lugar a los productos N_2O y H_2O . Teniendo en cuenta que el ditionito existe en estado sólido como $(\text{S}_2\text{O}_4)^{2-}$ (dímero) y que, cuando se disuelve, experimenta una homólisis reversible que conduce a la formación de dos monómeros radicales idénticos ($\text{SO}_2\bullet^-$), se investigó la posibilidad de que ambas especies pudieran reaccionar con el $\bullet\text{NO}$.

Además, se analizó la cinética de esta reacción mediante el ajuste de los datos experimentales a una ecuación matemática. Interesantemente, el comportamiento cinético identificó tanto reacciones que consumen ditionito como que lo regeneran. Además, el mecanismo propuesto se sustentó mediante herramientas computacionales en las que las energías involucradas en cada etapa indicaron que las reacciones eran favorables. También se examinaron otras reacciones paralelas que pudiesen llegar a interferir en la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$, como la descomposición aeróbica y anaeróbica del ditionito. Por último, se exponen las principales conclusiones y los métodos experimentales empleados.

Palabras clave: ditionito de sodio, óxido nítrico, azanona, nitroxilo, reacción anaeróbica, descomposición

3.2 Introducción

3.2.1 El ditionito de sodio

El anión ditionito, también llamado hidrosulfito o hipodisulfito (Figura 3.1) se comercializa como sal de sodio, de potasio, o de calcio siendo el de sodio el más comúnmente utilizado. Por otro lado, los valores reportados de sus pK_a indican que en solución a pH neutro se encuentra completamente desprotonado ($pK_{a1}= 0,35$ y $pK_{a2}= 2,45$) [279]. Su aspecto es de un polvo cristalino blanco.

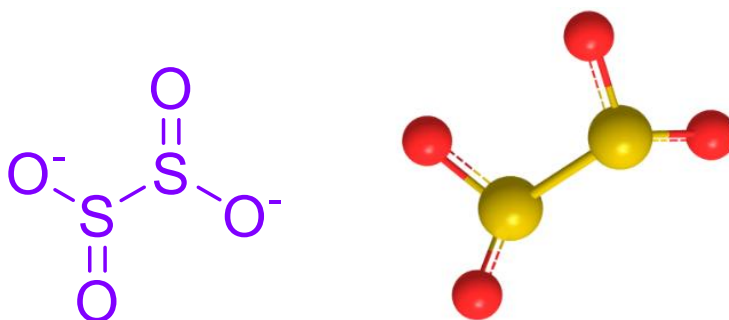


Figura 3.1 Estructura 2D y 3D del anión ditionito.

El ditionito de sodio posee una amplia gama de aplicaciones industriales y científicas, especialmente en la industria textil para la reducción de colorantes de tina [280, 281], en la industria papelera [282] y en síntesis orgánica [283–285]. También, se utiliza en la industria alimenticia como agente antioxidante y de conservación [286–288]. Debido a la alta toxicidad reportada, la exposición prolongada del ser humano a este compuesto puede

desencadenar problemas de salud en diferentes niveles [289, 290], por lo tanto, debe ser monitoreada. De hecho, varios estudios lo utilizan para obtener modelos *in vitro* de daño celular generado a partir de hipoxia/re-oxigenación inducida por ditionito [290].

Además, su potencial de reducción negativo lo posiciona como uno de los agentes reductores más importantes en la investigación bioquímica, sobre todo cuando se desea obtener el estado reducido de enzimas o complejos enzimáticos, especialmente los coordinados a centros de metales de transición [291–293].

3.2.2 Pureza del ditionito de sodio

El ditionito de sodio (CAS N° 7775-14-6), en su estado sólido se descompone, probablemente por adsorción y reacción con el H₂O de la atmósfera, y toma un color más oscuro y un olor sulfuroso que puede ser similar al de los huevos podridos. Estudios confirman que a medida que aumenta la edad de la muestra, mayor es la descomposición del mismo siendo los principales productos detectados sulfito, tiosulfato y sulfato [294]. La pureza del ditionito debe analizarse porque estos contaminantes azufrados no pasan desapercibidos y pueden interferir en las reacciones. Un ejemplo de mucha relevancia en este trabajo de tesis es la potencial reacción entre sulfito y óxido nítrico [295].

La presentación comercial de ditionito de sodio posee una pureza del 82% y en ocasiones, puede encontrarse una presentación del 90%, siendo las principales impurezas el sulfito de sodio, tiosulfato de sodio y dióxido de azufre. En el caso de requerir una mayor pureza, es posible aplicar una técnica de recristalización anaeróbica [296]. Con el objetivo de minimizar la cantidad de contaminantes presentes en un stock de ditionito de sodio (82%≥), se aplicó la técnica de recristalización, con la que se logró llegar a una pureza mayor a 90% tras dos recristalizaciones sucesivas. Se abordará con más detalle esta técnica en la sección experimental.

3.2.3 Descomposición anaeróbica del ditionito de sodio

Es bien sabido que la inestabilidad del ditionito aumenta al pasar de estado sólido a solución acuosa y al mover el pH de básico a ácido. En soluciones anaeróbicas, el ditionito se desproporciona a bisulfito y tiosulfato (ecuación 3.1) [297].



Sin embargo, su reactividad está fuertemente influenciada por el pH, la temperatura y la concentración. La desproporción del ditionito fue estudiada por primera vez hace un siglo por K. y E. Jellinek [298, 299]. Ellos encontraron una reacción de segundo orden, con una constante de velocidad de $4,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a 32°C y a $\text{pH} = 4,5$. Münchow y Steudel estudiaron la descomposición de ditionito $0,02 \text{ M}$ a 20°C a diferentes valores de pH y demostraron que la descomposición es muy lenta a valores de pH superiores a 6 y se vuelve rápida a pHs inferiores [300]. Otros grupos informaron de una reacción de descomposición de primer orden con una constante de velocidad de $4,5 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ para concentraciones de ditionito de $0,03$ a $0,06 \text{ M}$ a $88,5^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 13$ [301, 302]. Por otra parte, Burlamaschi *et al.* observaron dos tipos de reacción en la descomposición del ditionito en condiciones de temperatura superiores a 60°C a $\text{pH} = 6,9$. La primera, catalizada por el ion bisulfito, procede según el mecanismo de reacción autocatalítico de segundo orden habitual. La segunda, mucho más rápida que la primera, se produce tras un periodo de inducción, finalizando en cuanto se ha formado una cantidad suficiente de producto de descomposición [297]. En un trabajo más reciente, se estudió la descomposición del ditionito y se evaluaron los productos formados mediante FTIR-ATR [303]. Lister y Garvie evaluaron el efecto de la concentración (entre $0,2 \text{ M}$ y $0,6 \text{ M}$), el pH (entre $\text{pH} = 9$ y $\text{pH} = 14$) y la temperatura (80°C , 100°C y 120°C) a diferentes tiempos de calentamiento. Ellos concluyeron que la degradación aumentaba al aumentar la temperatura, la concentración y el tiempo de calentamiento, y disminuía al aumentar el pH de la solución. En la solución $0,4 \text{ M}$ a $\text{pH} = 8$, no se observaron productos de degradación tras 60 minutos a 20°C [302]. Por último, Telfeyan *et al.* informaron que el ditionito reaccionaba rápidamente en soluciones no *buffer*, mientras que persistía durante aproximadamente 50 días en soluciones casi neutras ($\text{pH} \sim 7$) y durante más de 100 días en soluciones alcalinas ($\text{pH} \sim 9,5$) [304]. En este trabajo de tesis, se utilizó el ditionito de sodio en solución anaeróbica a $\text{pH} = 7,4$. No obstante, dada la diversidad de condiciones y la gran sensibilidad del ditionito a los cambios en ellas, fue importante evaluar la cinética de descomposición del ditionito para nuestra condición experimental específica.

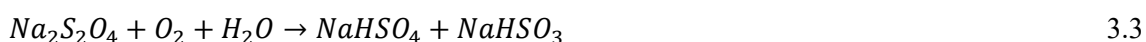
3.2.4 Monomerización y capacidad reductora del ditionito de sodio

Una de las propiedades más interesantes del ditionito es su capacidad para actuar como reductor en su forma iónica $(\text{S}_2\text{O}_4)^{2-}$ o en su forma disociada radical $\text{SO}_2^{\bullet-}$, que se encuentran en equilibrio cuando están en solución (ecuación 3.2).



La presencia del radical aniónico $\text{SO}_2^{\bullet-}$ en una solución acuosa de ditionito se confirmó mediante espectroscopía EPR en la década de 1960 [305]. También se sabe que la reacción de monomerización es bastante endotérmica y que la constante de equilibrio aumenta con la temperatura (a 298 K su valor es de $1,4 \times 10^{-9}$) [306].

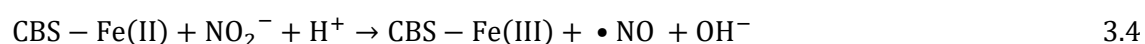
En la misma década, Mayhew *et. al.* estudiaron el potencial de reducción del sistema ditionito/bisulfito, asumiendo que el reductor en soluciones de ditionito es el monómero $\text{SO}_2^{\bullet-}$. El potencial redox E' calculado para el par $\text{SO}_2^{\bullet-}/\text{HSO}_3^-$ a pH 7 y 25 °C fue de -0,66 V [307]. El reductor está presente en gran medida como dímero a concentraciones de ditionito superiores a 10 nM. En consecuencia, el potencial E' de las soluciones de ditionito se vuelve menos negativo a medida que aumenta la concentración de ditionito. Por ejemplo, se ha calculado que el potencial teórico de una solución 1 M de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ y 2 M de bisulfito a pH= 7 es de -0,386 V [307]. Este potencial de reducción negativo lo hace a su vez muy inestable en contacto con el aire, especialmente cuando se disuelve en condiciones ácidas. Esta reacción se estudió hace casi 50 años y desde entonces se ha utilizado como medio para desoxigenar soluciones. Las sales hidratadas también son inestables y reaccionan con el O_2 para formar sales de bisulfito y bisulfato (ecuación 3.3) [308, 309].



3.2.5 Antecedentes de la reactividad entre ditionito de sodio y óxido nítrico

Como se mencionó anteriormente, el ditionito se utiliza generalmente como una herramienta para obtener formas reducidas de enzimas o complejos enzimáticos [291, 310–312]. De hecho, se ha utilizado en concentraciones milimolares con muchas hemoproteínas nitrosiladas, aparentemente sin complicaciones [313–315]. Sin embargo, la adición de ditionito, puede llegar a tener efectos a altas concentraciones [316]. También existen referencias bibliográficas sobre el uso de ditionito como medio para eliminar el $\bullet\text{NO}$ [317]. Por ejemplo, Moore y Gibson utilizaron ditionito para eliminar $\bullet\text{NO}$ libre en 1976 [318]. Ellos estudiaron la disociación del $\bullet\text{NO}$ de hemoglobina, de subunidades de hemoglobina aisladas y de mioglobina utilizando ditionito para eliminar el óxido nítrico libre. Además, analizaron de forma independiente la reacción entre 2 mM de $\bullet\text{NO}$ y concentraciones crecientes de ditionito entre 1,4 y 115 mM. Aunque el ditionito tiene una absorbancia máxima a 315 nm ($\epsilon = 8000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), examinaron la reacción siguiendo la absorbancia a 380 nm y el valor de la constante de velocidad obtenido fue de $1,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Los autores sugirieron que, en las condiciones ensayadas, el agente reductor parece ser el dímero de

ditionito y no el monómero. Luego, Sabine Van Doorslaer y sus colaboradores añadieron ditionito para eliminar el $\bullet\text{NO}$ disociado de la neuroglobina con el fin de facilitar su sustitución por CO [319]. La neuroglobina (Ngb) es una proteína globina que se expresa en el sistema nervioso y desempeña un papel en la protección del cerebro contra el daño isquémico. También se llevó a cabo otro estudio para investigar las funciones redox de la Ngb en relación con el $\bullet\text{NO}$ [320]. En un experimento realizado en ausencia de luz, se controló el consumo de $\bullet\text{NO}$ mediante la adición de Ngb y reductores, incluyendo nicotina adenina dinucleótido (NADH), flavina mononucleótido (FMN) y ditionito. Los resultados obtenidos con un electrodo selectivo de $\bullet\text{NO}$ demostraron que el $\bullet\text{NO}$ residual en solución se eliminaba a un ritmo más rápido mediante la adición de ditionito y a un ritmo más lento mediante la adición de los otros reductores y Ngb. Esto sugiere el potencial de interferencia en estudios que utilizan $\bullet\text{NO}$ como sustrato y ditionito como reductor. Mientras que otros reductores, tales como ácido ascórbico, borohidruro de sodio, formiato de sodio, N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina, ditiotreitól, y glutatión reducido, se emplean comúnmente, el uso del ditionito es a veces necesario para alcanzar el estado reducido cuando el potencial de reducción de la enzima es bajo. Un ejemplo de tal situación se encuentra en el trabajo de Beatriz Álvarez *et. al* [321], donde investigaron la reducción de nitrito (NO_2^-) por la enzima cistationina β -sintasa (CBS) en su forma reducida (CBS-Fe(II)) para dar el complejo CBS-Fe(II)NO $\bullet$ [321]. La secuencia de reacción comienza con la reducción de nitrito (NO_2^-) para dar CBS-Fe(III) y $\bullet\text{NO}$, (ecuación 3.4). En presencia de ditionito de sodio, la enzima se reduce de nuevo a CBS-Fe(II) (ecuación 3.5), cuya reactividad frente al $\bullet\text{NO}$ se evidencia por la formación del complejo nitrosilado CBS-Fe(II)NO $\bullet$ (ecuación 3.6).



Por otro lado, se sabe que el NO_2^- no es susceptible de reducción por el ditionito [322]. Curiosamente, las variaciones en la concentración de ditionito muestran una posible interacción entre este agente reductor y el $\bullet\text{NO}$. Se observó que el aumento de la concentración de ditionito a 3 mM modifica significativamente la cinética de decaimiento de la CBS-Fe(II). Inicialmente, el consumo de CBS-Fe(II) se aceleró, pero se detuvo rápidamente, por lo que la concentración final de esta especie fue mayor. Esto podría deberse a una reacción paralela entre el ditionito y el $\bullet\text{NO}$, en la que este reductor competiría con el CBS-Fe(II) por el $\bullet\text{NO}$, haciéndolo que esté menos disponible para la reacción.

Así, tras un siglo de extensas investigaciones, existe una considerable incertidumbre sobre el modo de acción del ditionito y, aún más, sobre su reactividad con el $\bullet\text{NO}$, en parte debido a la dificultad para preparar soluciones estandarizadas estables. Sin embargo, el estudio de esta reacción adquiere relevancia ya que podría afectar tanto a nivel de sustrato como a nivel enzimático, debido a la capacidad del HNO de reaccionar con los tioles de las enzimas [323–325]. En este capítulo de tesis estudiaremos el mecanismo de la reacción anaeróbica entre ditionito de sodio y $\bullet\text{NO}$ y demostraremos que este gasotransmisor se convierte en su congénere reducido nitroxilo (HNO).

3.3 Objetivos del capítulo

- Confirmar/descartar si tienen lugar las potenciales reacciones paralelas del ditionito
- Evaluar la formación de nitroxilo (HNO) en solución a pH fisiológico a partir de la reducción de $\bullet\text{NO}$ por acción de ditionito de sodio.
- Identificar los productos azufrados y nitrogenados finales de esta reacción.
- Obtener los parámetros cinéticos de la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.
- Dilucidar un posible mecanismo de reacción en concordancia con el análisis de las geometrías optimizadas, que incluya dímero y monómero de ditionito, así como los posibles productos intermedios y finales.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Potenciales reacciones paralelas del ditionito

Como se ha mencionado anteriormente, el ditionito se descompone en condiciones de completa anaerobiosis para dar bisulfito y tiosulfato (ecuación 3.1). Sin embargo, la bibliografía indica que esta descomposición depende en gran medida de las condiciones experimentales tal como el pH, la concentración y la temperatura (ver la sección 3.2.3). Para conocer si esta reacción es lo suficientemente rápida como para influir en la cinética ditionito/ $\bullet\text{NO}$, se midieron los espectros de soluciones de ditionito en estricta anaerobiosis. El experimento consistió en adquirir espectros UV-visible cada 15 segundos durante 6 horas a una solución de ditionito 172 μM a pH= 7,4 y temperatura ambiente. La anaerobiosis se mantuvo por medio de agregados de 2 o 3 ml de argón de alta pureza con jeringa *gas tight* cada 10 minutos al segmento separado de la cubeta de cuarzo (Figura 2.9, sección 2.5.1). En la Figura 3.2, arriba se puede apreciar una disminución de la concentración molar de ditionito en función del tiempo. Luego, se muestra el gráfico $1/[\text{ditionito}] \text{ M}^{-1}$ en función del

tiempo. Los datos concuerdan con una reacción de segundo orden con una constante de velocidad de $0.38 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, la que corresponde a la pendiente de la recta. (Figura 3.2, abajo).

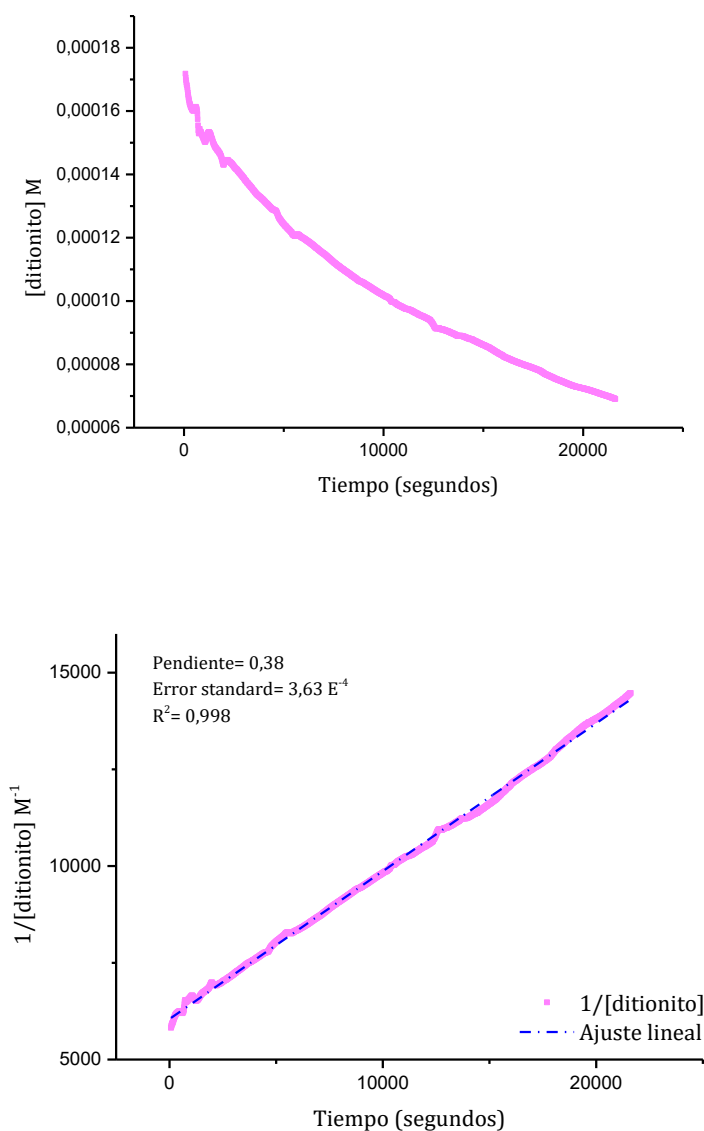
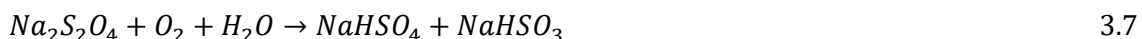


Figura 3.2 *Arriba*: Descomposición anaeróbica de ditionito $172 \mu\text{M}$, $\text{pH} = 7,4$ a temperatura ambiente. Las concentraciones se calcularon a partir del punto de máxima absorbancia a 315 nm y su coeficiente de extinción molar de $8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. *Abajo*: Regresión lineal de $1/[\text{ditionito}]$ en función del tiempo. El valor de la pendiente de esta recta corresponde a la constante de reacción para una reacción de segundo orden.

Aunque no es posible comparar directamente estos datos obtenidos con los reportados en la bibliografía, debido a la variabilidad de las condiciones experimentales (concentración,

temperatura y pH), en general se coincide en que la reacción se enlentece a pHs superiores a 6 y se acelera a medida que sube la concentración de ditionito. En nuestros experimentos se obtuvo una constante de descomposición anaeróbica de $172 \mu\text{M}$ de ditionito mayor que todas las reportadas, $22,92 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ o $0,38 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (sección 3.2.3) a $\text{pH} = 7,4$ y temperatura ambiente. Teniendo en cuenta este valor, el ditionito máximo que se consumiría con una concentración inicial de $100 \mu\text{M}$, es del 0,095% a los 25 segundos de disolverse en el *buffer*. Además, los productos previamente reportados como asociados a la descomposición, bisulfito y tiosulfato, no fueron detectados. Por otro lado, dada la significativa variabilidad en la reacción de descomposición anaeróbica y su marcada dependencia de las condiciones experimentales, es posible que este proceso ocurra en menor medida cuando $\bullet\text{NO}$ está presente en el medio. Por lo tanto, **no se tuvo en cuenta la descomposición anaeróbica del ditionito en el análisis general del mecanismo de reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.**

Otro aspecto importante a tener en cuenta es la reacción entre ditionito y O_2 [309, 326–328]. Si bien, no se ha estudiado tan ampliamente, se sabe que es una reacción muy rápida. De hecho, estudios antiguos sugerían que la reacción ocurre con el monómero y que el paso limitante era la disociación del ditionito [308, 328]. Las sales hidratadas también son inestables y reaccionan con O_2 para formar sales de bisulfito y bisulfato (ecuación 3.7)[308, 309].



Si bien todos los experimentos se realizaron en atmosfera anaeróbica, podrían quedar trazas de este gas, por lo que debe analizarse la posibilidad de que esta reacción esté presente. Se sabe que, la solubilidad del O_2 en el agua varía de $0,45 \text{ mM}$ a 0°C a aproximadamente $0,22 \text{ mM}$ a 35°C (temperatura próxima a la de un medio biológico animal) a una presión de 760 mmHg . A 25°C , la solubilidad es de $0,26 \text{ mM}$, es decir, algo más del 10 % de la solubilidad del $\bullet\text{NO}$ ($1,9 \text{ mM}$) [274, 329]. Aunque el $\bullet\text{NO}$ se diluye al añadirlo a la solución de ditionito, el O_2 también se diluye. Por tanto, el oxígeno debe estar saturado para que pueda competir, al menos en un 10 %, con el $\bullet\text{NO}$. Una reacción paralela es la que involucra al O_2 y el $\bullet\text{NO}$ para dar NO_2 , es decir que la contaminación por entrada de aire al sistema podría generar esta especie, en poca cantidad. **Teniendo en cuenta la baja solubilidad y las estrictas condiciones anaeróbicas utilizadas para realizar los experimentos, la reacción entre el ditionito y el oxígeno no se incluyó en el análisis cinético.**

Otra posible interferencia es la que involucra al sulfito (SO_3^-) y $\bullet\text{NO}$. En 1986, Littlejohn y Chang estudiaron la reacción entre dos especies [295]. Ellos propusieron la formación de N-nitrosohidroxilamina-N-sulfonato (NHAS) como intermediario, cuyo espectro muestra una banda de máxima absorción en 260 nm. Las constantes de velocidad reportadas para la formación de NHAS según la cinética $d[\text{NHAS}]/dt = k_a[\text{NO}][\text{HSO}_3^-] + k_b[\text{NO}][\text{SO}_3^{2-}]$ fueron $k_a = 32 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_b = 620 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, por lo que podría existir una competencia con la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$. Por otro lado, si bien puede haber presencia de sulfitos como contaminantes en las soluciones de ditionito, las concentraciones deberían ser mucho más bajas, reduciendo así los posibles efectos. Igualmente, para verificar si esta reacción influye en la cinética entre ditionito y $\bullet\text{NO}$, se adicionó a la mezcla de reacción de 100 μM de ditionito una concentración de 50 μM de sulfito de sodio, previo a la medición cinética. No se observaron cambios durante la medición cinética por UV-visible con respecto a la mezcla sin sulfito agregado. Cabe aclarar que tampoco se observó la presencia de la banda de absorción en 260 nm. En conclusión, teniendo en cuenta que el ditionito posee una pureza del 90% lo que daría un porcentaje de contaminantes de 10%, **se descartó la influencia de la reacción entre sulfito y $\bullet\text{NO}$ en la cinética estudiada en este trabajo de tesis.**

3.4.2 Detección directa de HNO

El HNO es un gasotransmisor con interesantes propiedades fisiológicas [1, 41] y una interacción química y biológica diferente a la de su congénere redox, el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) [330]. Estas diferencias constituyen las bases de muchos de los métodos de detección de HNO (ver la sección 1.4). Para cumplir el segundo objetivo de este capítulo, se aprovechó la diferencia en la reactividad del HNO y $\bullet\text{NO}$ frente a porfirinas de Mn(III).

Inicialmente, se realizaron mediciones para detectar HNO con el sensor electroquímico en tiempo real basado en porfirinas de cobalto (II) [131]. Sin embargo, debido a la elevada capacidad reductora del ditionito, lo que lo hace extremadamente reactivo, se produjeron modificaciones irreversibles en las porfirinas, por lo que se recurrió a otro método de detección por UV-visible.

El HNO reacciona con las porfirinas de Mn(III) para dar lugar al complejo nitrosilado Mn- $\bullet\text{NO}$. En este experimento se utilizó la porfirina meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) soluble en agua (Mn(III)TEPyP) (ver Figura 3.3), existiendo otras porfirinas de Mn(III) que también serían útiles [90, 128, 130].

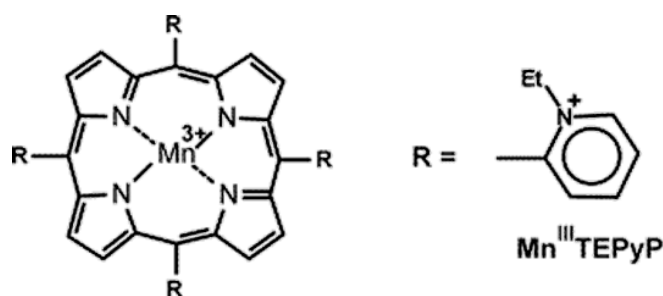


Figura 3.3 Estructura de la meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) (Mn(III)TEPyP).

El complejo porfirínico Mn(II)- •NO posee una banda de máxima absorción a una longitud de onda más corta (434 nm) que la del complejo Mn(III) (462nm), por lo que la formación de este último se evidencia mediante un desplazamiento hacia el azul de la banda de Soret. Por otro lado, el •NO reacciona muy lentamente con estas porfirinas, lo que constituye una herramienta útil para la detección de HNO basada en diferencias de reactividad (para más detalles ver la sección 1.4.2).

No obstante, la detección de HNO por este tipo de reacciones en solución, en las que participa un reductor fuerte como el ditionito, plantea dos desafíos que deben superarse.

i)- El HNO no podría acumularse debido a su alta reactividad con •NO y consigo mismo (ver la sección 1.3.2).

ii)- El ditionito podría reducir a la porfirina de Mn(III) a Mn(II), por lo que no pueden encontrarse juntos en la misma solución ya que daría lugar a una interpretación errónea de los resultados. Esto se debe a que Mn(II) reacciona con •NO para dar el mismo producto que surge de la reacción entre Mn(III) y HNO, el complejo nitrosilado Mn(II)- •NO (figura 3.4).

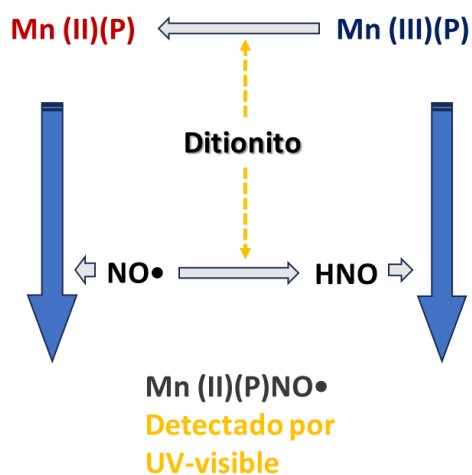


Figura 3.4 Las reacciones entre las especies Mn(II)(P) y $\bullet\text{NO}$ generan el mismo producto que la reacción entre Mn(III)(P) y HNO .

Para superar estos desafíos, se construyó el sistema que se describe en la sección experimental (sección 3.6.2, esquema 3.6) de este capítulo. Este sistema permite mantener un flujo constante de $\bullet\text{NO}$ y acumulación de HNO por atrapamiento con la porfirina de Mn(III) , mientras que las soluciones de ditionito y de porfirina se encuentran en recipientes separados. Además, se utilizó una mezcla de $\bullet\text{NO}$ con N_2 proveniente de la línea de gases, lo que generó una menor interacción entre las moléculas de HNO generado, y de esta manera, se minimizó su dimerización a N_2O . Cabe aclarar que todo el sistema estaba libre de oxígeno y en atmósfera de nitrógeno. El experimento comenzó entonces con la generación de $\bullet\text{NO}$ *in situ* a partir de la mezcla de los sólidos FeSO_4 (8,5 g), NaNO_2 (8,5 g) y NaBr (4 g) (ver la sección 2.3). El $\bullet\text{NO}$ generado se mezcló con N_2 de la línea, lo que generó una presión positiva que provocó el desplazamiento de los gases a través del sistema. Esta mezcla de $\bullet\text{NO}$ y N_2 pasó a través de una solución de NaOH 0,5 M que permitió eliminar otros óxidos de nitrógeno que pudieron generarse durante la síntesis del $\bullet\text{NO}$, tal como NO_2 . A continuación, se introdujo en una solución de ditionito 4 mM en *buffer* fosfato 10 mM a pH=7,4, en la que el HNO fue generado. Finalmente, la mezcla de gases se introdujo en la solución de porfirina ($\text{TEPyP} + 10^{-3}$ M de EDTA), donde se produjo la captura del HNO . Tras 40 minutos de burbujeo lento de la mezcla gaseosa $\bullet\text{NO}/\text{N}_2$ a través del sistema de la figura 3.23, (Sección 3.6.2), se evidenció claramente la formación de la especie $\text{Mn(II)}-\bullet\text{NO}$ cuyo máximo de absorción en el espectro ultravioleta-visible se encuentra en 434 nm (Figura 3.5), mientras que la especie Mn(III) posee un máximo ubicado en 462 nm. Esta demora de 40 minutos en observar el surgimiento de la banda correspondiente a $\text{Mn(II)}-\bullet\text{NO}$ se debe principalmente al tiempo requerido para acumular suficiente producto para ser detectado

por UV-visible. Este tiempo de acumulación está influenciado, no solo por la velocidad de reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$, sino también por la disolución de $\bullet\text{NO}$ en la solución de ditionito, la disolución de HNO en la solución de porfirina, la dimerización del HNO , que compite directamente con la reacción con la porfirina, y el coeficiente de extinción molar de $\text{Mn(II)}-\bullet\text{NO}$. Es decir, son varios los factores que influyen aquí. Por lo tanto, una cuantificación por este método requeriría controlar cada uno de estos factores.

Por otro lado, al excluir uno de los reactivos del sistema (ya sea ditionito o $\bullet\text{NO}$), no se observó un incremento de la banda de 434 nm durante 120 minutos de burbujeo de la mezcla de gases.

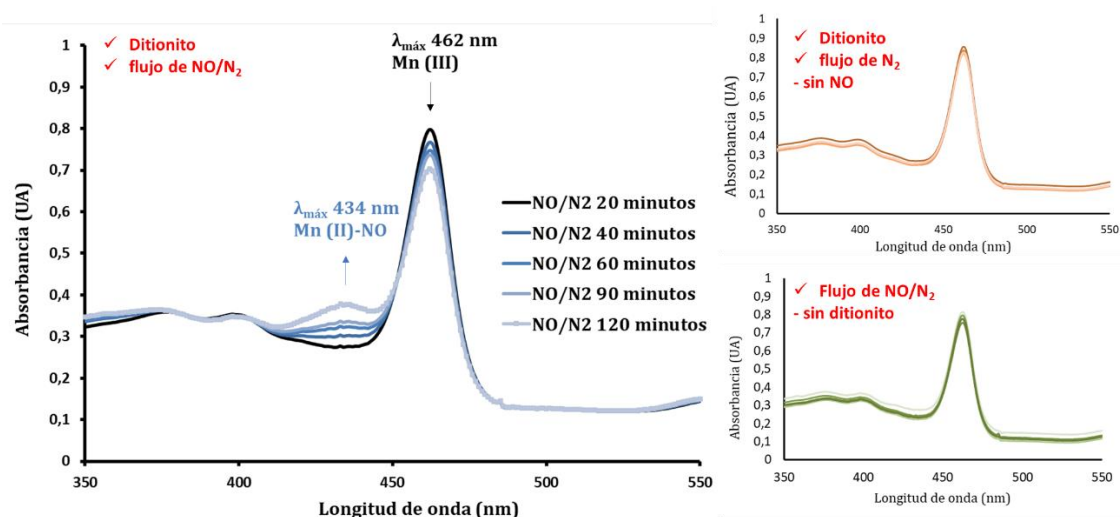


Figura 3.5 Espectroscopía UV-visible de la porfirina Mn(III)TEPyP a diferentes tiempos de burbujeo de los gases en el sistema.

Luego de 40 minutos de burbujeo se logró acumular suficiente HNO en forma de complejo $\text{Mn(II)}-\bullet\text{NO}$ para poder detectarlo por UV-Visible. El análisis de estos espectros, medidos a diferentes tiempos de burbujeo, permitió confirmar por primera vez la **formación de HNO a partir de la reacción en solución (buffer fosfato 10 mM, pH= 7,4) entre ditionito de sodio y $\bullet\text{NO}$.**

3.4.3 Detección indirecta de HNO. Producto nitrogenado final N₂O

El HNO es conocido por su rápida dimerización a H₂N₂O₂ y posterior descomposición a N₂O y H₂O [1, 41]. El N₂O es una molécula gaseosa fácilmente detectable por IR, cuya frecuencia vibracional característica se encuentra entre 2212 y 2236 cm⁻¹ [34, 58]. Si bien el HNO tiene señales en el rango IR [32, 331], es difícil de detectar utilizando esta técnica debido a su corta vida. Por ello, el N₂O se utiliza frecuentemente como herramienta para la detección indirecta del HNO (Sección 1.4).

La detección indirecta se llevó a cabo por medición cuantitativa de N₂O producido a tiempos específicos de reacción entre ditionito y •NO. La cuantificación procedió a través de la comparación de las señales FTIR de los gases de la reacción con las detectadas a partir de una curva de calibración de N₂O. Esta curva se construyó mediante la descomposición del dador de HNO, sal de Angeli (Sección 3.6.3). Para ello, se prepararon soluciones anaeróbicas de ditionito 6 mM en *buffer* fosfato a pH= 7,4 con un volumen total de 10 ml. Esta solución se encontraba en un balón de 100 ml con la finalidad de tener una relación 10 veces mayor de *headspace* (espacio de cabeza) con respecto al líquido. A esta solución se le agregó, mediante inyección por septum, solución saturada en •NO.

Las mediciones por FTIR se realizaron a diferentes tiempos de reacción (un balón de reacción para cada tiempo) mediante la extracción de 1ml del *headspace* y su colocación en la celda para gases (Figura 2.10, capítulo “Metodología general”) con jeringas *gastight*.

Durante los primeros 10 minutos de la reacción, la producción de N₂O se mantuvo prácticamente constante. Es importante considerar que las muestras tomadas del *headspace* para su detección contienen únicamente los gases liberados de la solución. El N₂O, ampliamente estudiado por su uso como anestésico, tiene un coeficiente de partición sangre/gas de 0,47, lo que indica que tiende a permanecer en la fase gaseosa más que disuelto en líquidos. Por lo tanto, si el gas fue recientemente generado requerirá un tiempo para alcanzar el equilibrio entre la fase gaseosa y la solución, lo que dependerá factores como temperatura, presión y solubilidad en agua. Por lo tanto, la fase inicial de aproximadamente 10 minutos podría deberse al tiempo necesario para que el N₂O se distribuya y alcance el equilibrio entre ambas fases.

La Figura 3.6, muestra los μ moles de N₂O producidos en función del tiempo para 6 mM de ditionito y 390 μ M •NO. Tras 35 minutos, se produjeron 1,8 μ moles de N₂O. Esto implicaría que, en este ejemplo, se consumieron 3,6 μ moles de •NO totales de 3,9 μ moles presentes en la reacción. Es decir, alrededor del 92.7% del •NO forma parte del producto final N₂O.

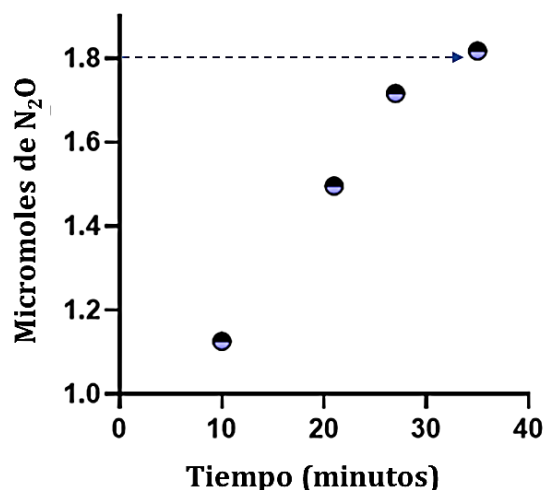


Figura 3.6 Micromoles de N₂O en función del tiempo de reacción entre el ditionito (6 mM) y el •NO (390 μM). La flecha indica el punto de máxima producción de N₂O en este experimento.

En general, el comportamiento observado indicó que la producción de N₂O se incrementó hasta aproximadamente 35 minutos, luego se mantuvo constante hasta los 90 minutos, y finalmente, fue perdiendo gas por escape a través del septum. A partir de esta observación, se consideró que a los 60 minutos de iniciada la reacción el valor de N₂O en el *headspace* sería máximo. Entonces, partir del promedio de 4 experimentos independientes medidos a los 60 minutos se obtuvo **un rendimiento final de $1,82 \pm 0,04$ μmoles de N₂O, indicando un rendimiento del 93%. Con este dato, es posible confirmar que el producto nitrogenado final es exclusivamente N₂O.**

Paralelamente, teniendo en cuenta la capacidad reductora del ditionito y que el potencial de reducción de N₂O a N₂ ($\text{N}_2\text{O} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- > \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O}$) es 1.766 V vs SHE, podríamos pensar en una reacción paralela entre estas dos especies. Sin embargo, al adicionar ditionito en una relación 3:1 (ditionito/N₂O), a uno de los puntos de la curva de calibración de N₂O, no se observaron diferencias con respecto a su contraparte sin ditionito después de estar 26 minutos en contacto.

3.4.4 Productos azufrados finales

La detección de especies azufradas se realizó mediante espectroscopía ATR-FTIR. En primer lugar, se obtuvieron los espectros de varias especies azufradas comunes que podrían convertirse en el producto final de la reacción entre ditionito y •NO. Estos compuestos tienen un estado de oxidación del azufre mayor que el del ditionito y, además, algunos de ellos son productos de la oxidación del ditionito por O₂ tal como bisulfito y sulfato [308, 309].

En base a un trabajo reciente en el que se midieron los espectros ATR de varias especies azufradas producidas a partir de la descomposición del ditionito, se optó por preparar soluciones en concentraciones 0,2 M (*buffer* fosfato 10 mM, pH= 7,4) de cada compuesto [303]. Si bien, las soluciones estuvieron al aire en todo momento, es decir que no se mantuvo atmósfera anaeróbica durante estos experimentos, se prepararon justo antes de comenzar a medir. Únicamente la mezcla de reacción se preparó en atmósfera anaeróbica y luego se midieron los espectros al aire. La Figura 3.7 muestra los espectros de varias especies azufradas en comparación con el espectro de la mezcla de reacción (curva de color celeste).

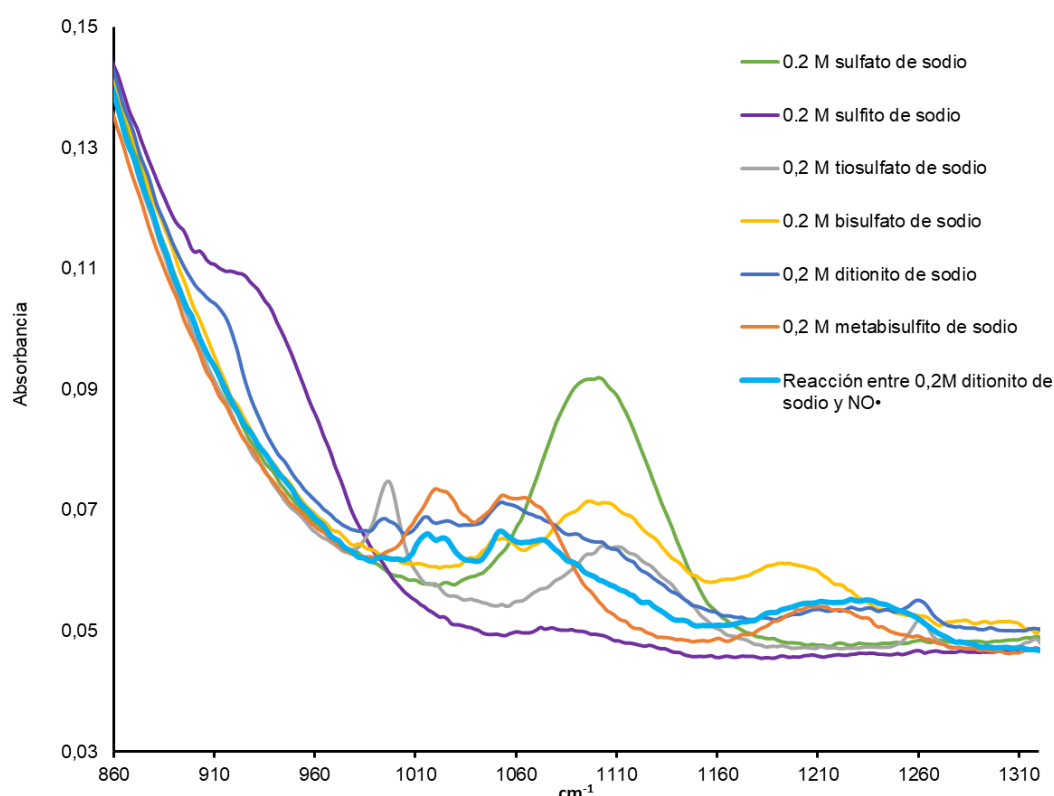


Figura 3.7 Comparación entre los espectros ATR-FTIR de sulfato de sodio, tiosulfato de sodio, sulfito de sodio, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, ditionito de sodio y la mezcla de reacción entre ditionito de sodio y $\bullet\text{NO}$.

La reacción anaeróbica entre ditionito y $\bullet\text{NO}$ se llevó a cabo mediante la aplicación de un flujo de $\bullet\text{NO}$ a una solución de ditionito de sodio 0,2M durante 15 minutos. A partir de la comparación de cada uno de los espectros de los compuestos azufrados y de la mezcla de reacción, se pudo observar que el metabisulfito de sodio, cuya fórmula molecular es ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), parece coincidir espectralmente con la reacción (Figura 3.8).

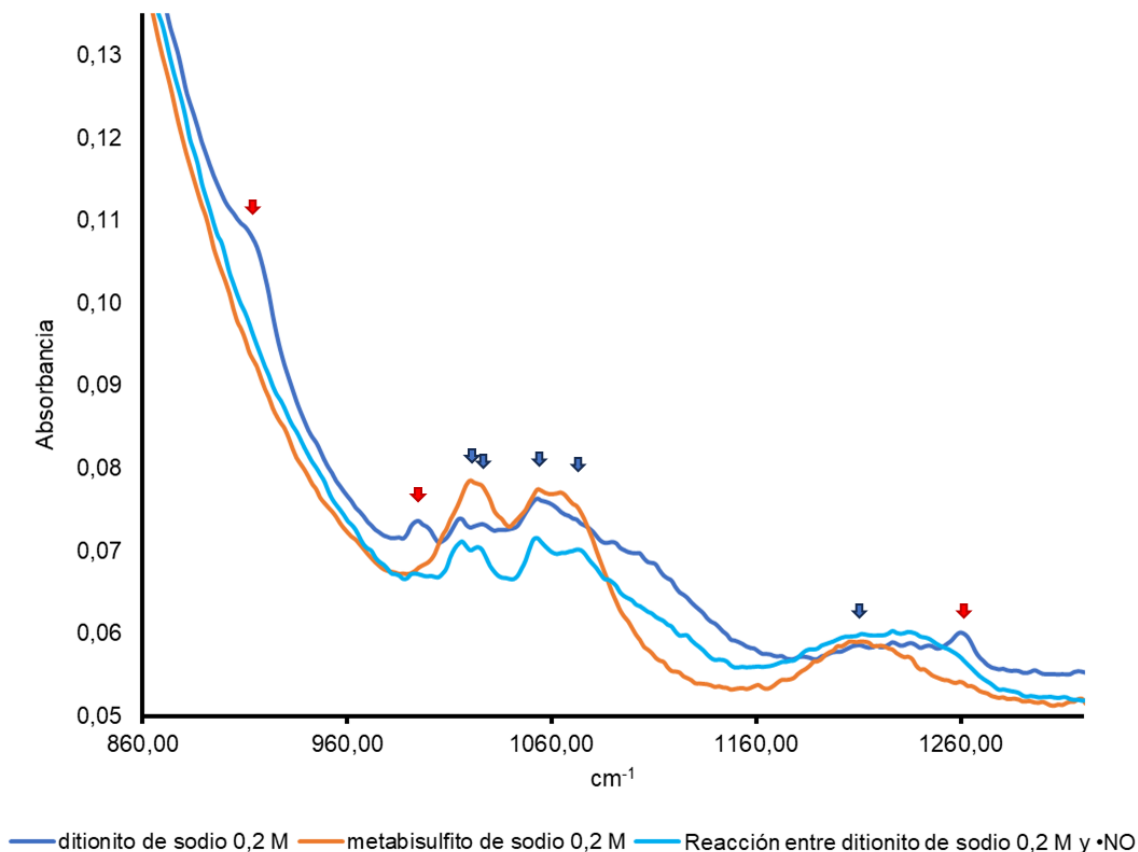


Figura 3.8 Comparación entre los espectros ATR-FTIR de metabisulfito de sodio, ditionito de sodio y la mezcla de reacción. Las flechas rojas señalan las bandas de ditionito que desaparecieron luego de la reacción con •NO, mientras que las flechas azules indican las bandas nuevas que coinciden con el espectro de metabisulfito.

Esta similitud espectral nos permitió proponer al **metabisulfito de sodio como un posible producto azufrado final de la reacción entre ditionito de sodio y •NO.**

Por otro lado, la solución de ditionito se dejó en contacto con aire durante una semana con el fin de obtener una muestra de los productos azufrados generados por la oxidación de ditionito por O_2 . El espectro de esta muestra presentó señales nuevas que indicarían la formación de tiosulfato y sulfato como productos de dicha reacción. Estas señales no se encontraban presentes en los espectros de la reacción entre ditionito y •NO, lo que permite descartar que los productos detectados provengan de la oxidación de ditionito por contaminación con O_2 (Figura 3.9). Las señales en 912 cm^{-1} y 1051 cm^{-1} fueron asignadas a estiramientos simétricos y antisimétricos SO_2 del ión ditionito, respectivamente. Mientras que la señal en 997 cm^{-1} fue asignada al estiramiento simétrico SO_2 de tiosulfato [332].

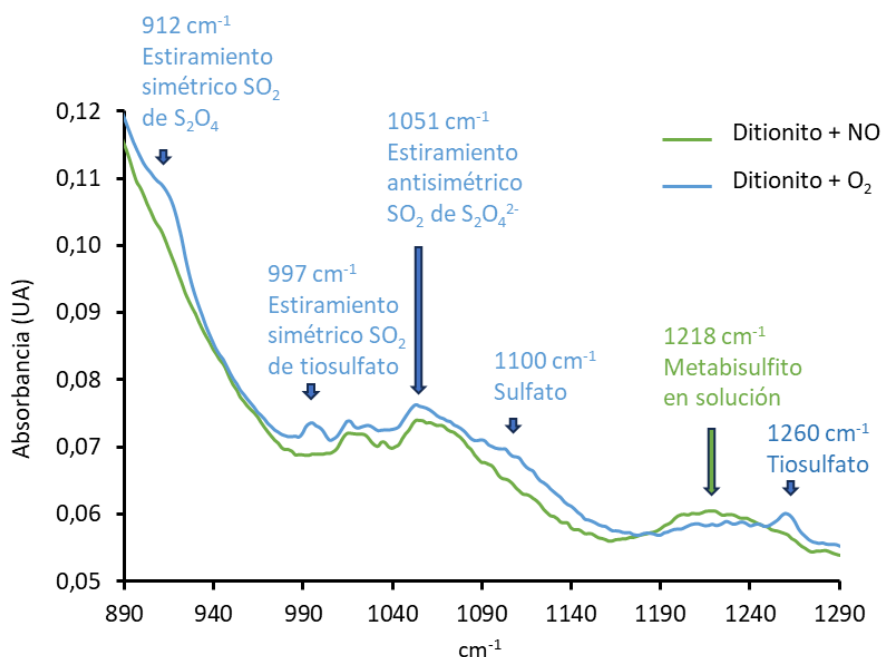


Figura 3.9 Comparación de los espectros ATR-FTIR de la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$ con el espectro de la reacción de ditionito por O_2 .

Otro aspecto a tener en cuenta es que el espectro de metabisulfito obtenido no coincide con el reportado en la base de datos ni con el espectro medido en pastillas de KBr de metabisulfito sólido. Esto se debe a que el metabisulfito en solución se encuentra en un equilibrio con la especie bisulfito (HSO_3^-). De hecho, el bisulfito en solución se comercializa como una solución acuosa de metabisulfito (Ecuación 3.8).



En un trabajo de 1960, Golding y sus colaboradores estudiaron el equilibrio metabisulfito/bisulfito a pH ácido por espectroscopía UV-visible[333]. Observaron una clara dependencia de los espectros con la concentración. Por ejemplo, a una concentración de bisulfito en solución de 0,16 M, el espectro presenta una absorbancia 0,8 para el metabisulfito ($\lambda_{\text{máx}} = 255\text{nm}$) y una absorbancia de 1,4 para el bisulfito ($\lambda_{\text{máx}} = 215\text{nm}$). Cuando la concentración de bisulfito disuelto fue 0,24 M, las absorbancias máximas para metabisulfito y bisulfito fueron 1,7 y 1,5, respectivamente. Por otro lado, un estudio más reciente confirmó la detección de otras especies azufradas al disolver metabisulfito de potasio en soluciones de diferentes pH [334]. Así, a pH= 3 se observó un 92% de bisulfito y

un 8% de SO_2 , mientras que a $\text{pH}=7$ un 60 % corresponde a HSO_3^- y un 40% a SO_3^{2-} . Es decir, en solución ácida o neutra existirán mezclas de diferentes especies.

Una característica de las soluciones de metabisulfito es que acidifican las soluciones. Teniendo esto en cuenta, se preparó una solución de metabisulfito, con un pH inicial de 7 en H_2O , que se llevó a valor agregando NaOH . Se midió el pH antes y después de disolverlo y se observó una bajada del mismo hasta un valor de 3. Al analizar el pH de la mezcla de reacción, antes y después (1 hora) de agregar el $\bullet\text{NO}$ a la solución de ditionito, se observó una bajada idéntica hacia $\text{pH}=3$. Teniendo en cuenta esta característica, se concluye que **metabisulfito podría ser el producto azufrado final que en solución da lugar a una mezcla que contiene a las especies HSO_3^- y SO_3^{2-}** . Las reacciones se realizaron en *buffer*, manteniendo un pH neutro, por lo que la formación de SO_2 por efecto del pH debería ser despreciable.

3.4.5 Cinética de la reacción por espectroscopia UV-visible

El ditionito de sodio tiene un máximo de absorción a 315 nm, por lo que su concentración puede determinarse a partir del registro de sus espectros UV-visible (figura 3.10). Es importante remarcar que estas mediciones deben realizarse en condiciones estrictamente anaeróbicas para evitar la pérdida de ditionito por reacción con O_2 del aire, lo que podría dar lugar a subestimaciones de las concentraciones y reacciones no deseadas. Para garantizar la anaerobiosis, en todos los experimentos de espectroscopia UV-visible, se utilizó una cubeta adaptada de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Sección 2.5.1).

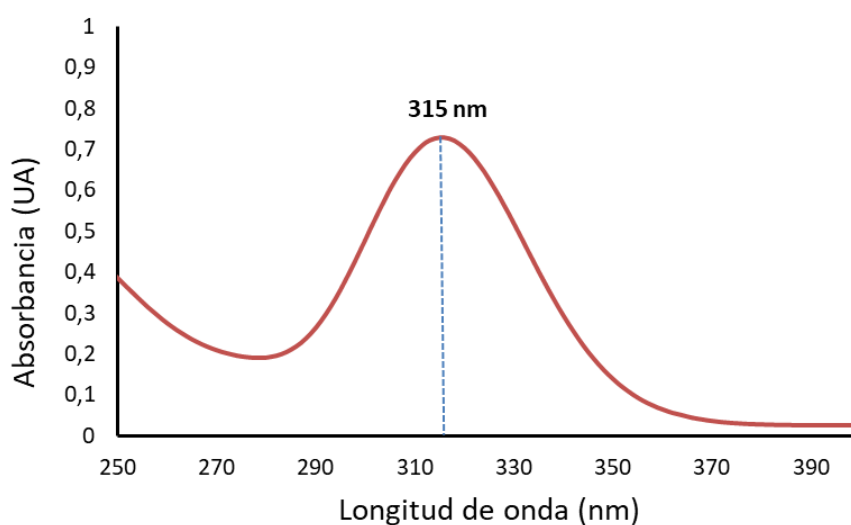


Figura 3.10 Espectro de absorción de ditionito en *buffer* fosfato, $\text{pH}=7,4$.

Para analizar el comportamiento cinético se midió la velocidad de consumo de ditionito tomando espectros cada 0,5 s a partir de la adición de un volumen específico de una solución acuosa saturada en $\bullet\text{NO}$ (ver la sección 2.3.2 para detalles sobre la generación de $\bullet\text{NO}$ en solución). Con estos datos se calcularon las concentraciones en cada punto sabiendo que su coeficiente de extinción molar a 315 nm es $\epsilon_{315} = 8000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Figura 3.11).

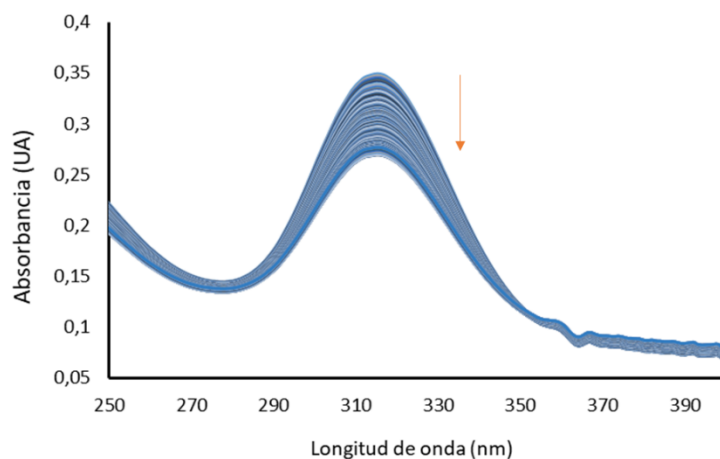


Figura 3.11 Cambio espectral ejemplo del descenso de la banda de absorción de 45 μM de ditionito cada 0,5 segundos ante el agregado de 100 μM de una solución saturada en $\bullet\text{NO}$. El último espectro se midió a los 100 segundos.

Sin embargo, los intentos de ajustar las curvas a ecuaciones lineales o exponenciales no fueron exitosos (Figura 3.12), incluso a los pocos segundos después de iniciar la reacción. Por lo tanto, la reacción no parece seguir una cinética simple (orden 0, 1 o 2) y es necesario un tratamiento más detallado de los datos.

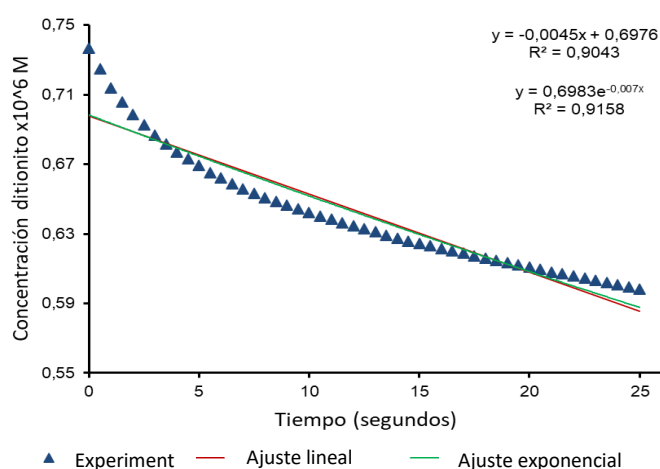


Figura 3.12 Ajuste lineal y exponencial de la curva concentración frente al tiempo de la reacción entre ditionito 73 μM y de $\bullet\text{NO}$ 100 μM .

Se obtuvieron las curvas correspondientes a la variación de la concentración de ditionito en función del tiempo, para diferentes concentraciones iniciales del reductor, entre 40 y 100 μM . Mientras que las concentraciones de $\bullet\text{NO}$ se variaron entre 50 y 250 μM . La concentración de ditionito no podría subirse más allá de los 100 μM debido a que esto implicaría que la absorbancia del mismo a 315 nm estuviese por arriba de 1. Estos datos experimentales se transformaron a velocidad expresada como $-d[\text{ditionito}]/dt$ M s^{-1} y se graficaron en función de $[\text{ditionito}]$ M (Figura 3.13).

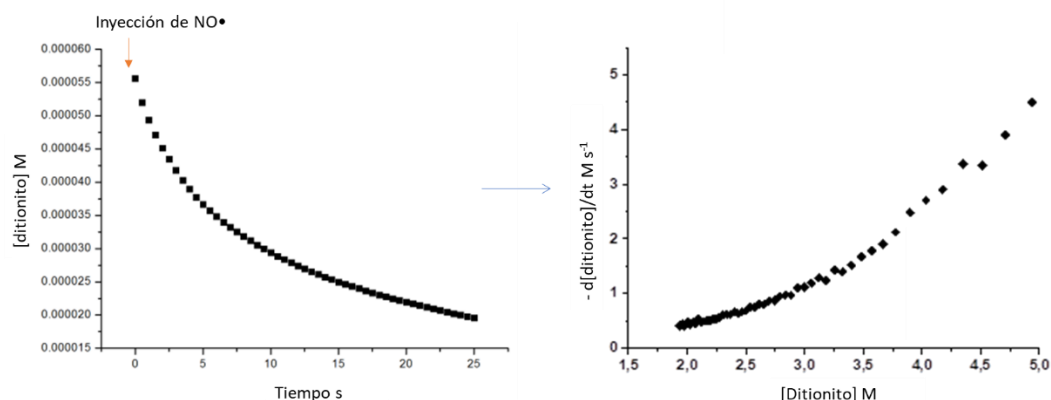


Figura 3.13 Ejemplo de una de las curvas experimentales de consumo de ditionito 55,5 μM en función del tiempo a partir del agregado de 250 μM de $\bullet\text{NO}$ (izquierda). Se muestra una curva de velocidad de consumo en función de la concentración graficada como $-d[\text{ditionito}]/dt$ (derecha). La misma fue calculada cada 0,5 segundos de la siguiente forma: $(\text{concentración final} - \text{concentración inicial})/0,5 \text{ s}$

Un ajuste inicial aplicado a esta cinética mostró una tendencia polinómica de grado 2 y superiores. Sin embargo, la utilización de una ecuación del tipo $y = A \cdot x + Bx^2 + Cx^3 \dots n \cdot x^n$ implica que debe considerarse que la cinética solo depende de la concentración de ditionito a diferentes niveles, mientras que la concentración de $\bullet\text{NO}$ no varía con el paso del tiempo. No obstante, esta afirmación no es correcta ya que las condiciones experimentales no presentan un exceso de $\bullet\text{NO}$ en relación con el ditionito, lo que impide que se considere una condición de pseudo-orden. Además, al inyectar un volumen de solución saturada de $\bullet\text{NO}$ a la solución de ditionito, ambos reactivos comienzan a consumirse y no hay un suministro constante de los mismos. En consecuencia, las constantes de velocidad obtenidas de esta manera tendrían grandes errores. En este punto, nos enfrentamos al desafío de hallar una ecuación de 3 variables que, no solo contemple a las variaciones tanto de las concentraciones de ditionito como las de $\bullet\text{NO}$, sino que también sea respaldada por la química subyacente de las posibles reacciones. Tras evaluar numerosas ecuaciones posibles, se identificó un buen ajuste a la fórmula $Z = A + Bx + Dxy$. Para este ajuste se

configuraron como parámetros constantes a A, B y D, siendo las variables independientes de la ecuación “x” e “y”.

La figura 3.14 muestra un ejemplo de un experimento con ditionito 80 μM y $\bullet\text{NO}$ 150 μM en el cual se aplicó el ajuste a esta ecuación. Los valores de los signos de los parámetros que acompañan a cada término indican que dos de ellos implican un descenso en la velocidad de la reacción mientras que el otro implica un aumento. Es decir, la curva está compuesta por una cuadrática que relaciona las concentraciones de ditionito y $\bullet\text{NO}$ con un aporte de la parte lineal que no es despreciable, y fundamentalmente de signo contrario.

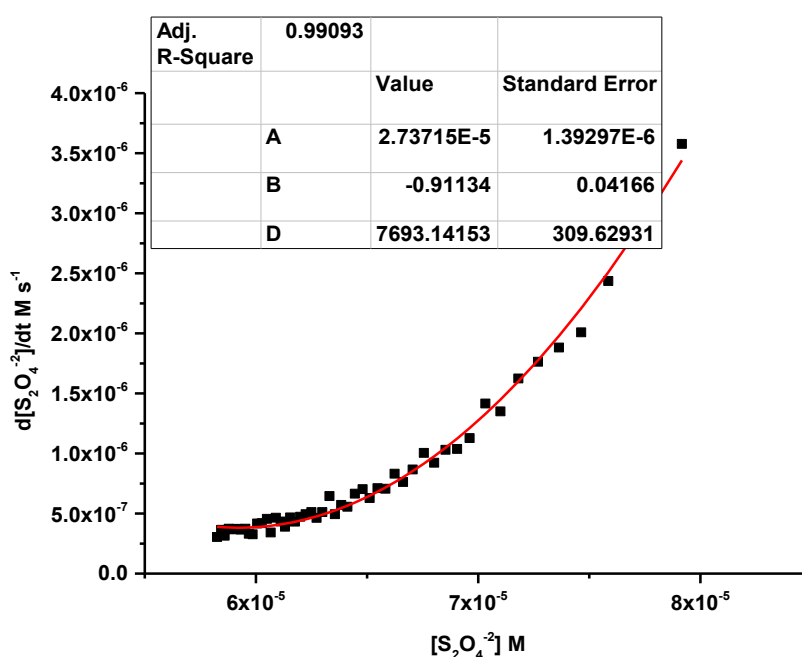


Figura 3.14 Curva experimental ditionito 80 μM y $\bullet\text{NO}$ 150 μM . Datos experimentales (cuadrados negros). Curva construida a partir del ajuste a la ecuación $Z = A + Bx + Dxy$ (línea roja).

Indudablemente, esto implica que la cinética está conformada por una reacción lineal que regenera ditionito. Además, uno de los términos es una constante de igual signo que el término que consume ditionito, con lo cual hay que pensar en una reacción que no depende de las concentraciones de ditionito ni $\bullet\text{NO}$, sino que implica la reacción de algún intermediario. La ecuación debe poseer 3 términos principales: un término de consumo constante, un término de regeneración y un término que relaciona el consumo de ditionito por $\bullet\text{NO}$.

$$d[S_2O_4^{2-}]/dt = -\text{consumo constante} + \text{regeneración} - \text{consumo vía } \bullet\text{NO}$$

$$d[S_2O_4^{2-}]/dt = A + B \cdot x + D \cdot x \cdot y$$

A partir de la aplicación de esta ecuación de ajuste a 15 curvas experimentales con diferentes concentraciones de ditionito y de $\bullet\text{NO}$, se obtuvieron los promedios de los valores de los parámetros A, B y D y sus desvíos estándar:

$$A = 2,87 \times 10^{-5} \pm 1,71 \times 10^{-5}$$

$$B = -0,90 \pm 0,42$$

$$D = 8464 \pm 1634$$

La comparación de estas constantes indica que el término de la reacción que contiene al parámetro “D” influye en mayor medida que los otros dos términos. Esta parte contiene dos variables independientes, además, se trata de una reacción que consume ditionito. El siguiente paso debe centrarse en identificar y analizar las posibles vías de reacción que puedan justificar este comportamiento cinético.

3.4.6 Mecanismo de reacción y cálculos computacionales

En el esquema de la figura 3.15 se representan las principales reacciones que tendrían lugar a partir de mezclar una solución de ditionito con una solución de $\bullet\text{NO}$ en condiciones de anaerobiosis. A partir de los resultados experimentales sabemos que las vías de consumo de ditionito generan HNO como intermediario, detectado por atrapamiento con porfirinas de Mn(III) , y terminan con los productos finales N_2O y $\text{HSO}_3^-/\text{HS}_2\text{O}_5^-$ detectados por FTIR y FTIR-ATR, respectivamente. Obviamente, una vía de regeneración daría lugar a la formación de más moléculas de ditionito.

Lambeth y Palmer han realizado un estudio cinético de la reacción del ditionito con una variedad de proteínas y compuestos bioquímicamente relevantes, que son capaces de participar en reacciones de transferencia de electrones [306]. Como se menciona en la Ecuación 3.2, el ditionito sufre una homólisis en solución que da lugar a la formación de dos radicales idénticos $\text{SO}_2\bullet$. Aunque, en general, se puede establecer que el radical $\text{SO}_2\bullet$, es una especie más reactiva que el $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, los autores concluyeron que a veces el agente reductor

es el dímero, otras veces es el monómero, y, en muchas ocasiones, el dímero y el monómero pueden actuar al mismo tiempo [306]. Por lo tanto, las vías de reacción propuestas deben contemplar la posibilidad de que ambos reactivos pueden estar disponibles para reaccionar de alguna manera con $\bullet\text{NO}$.

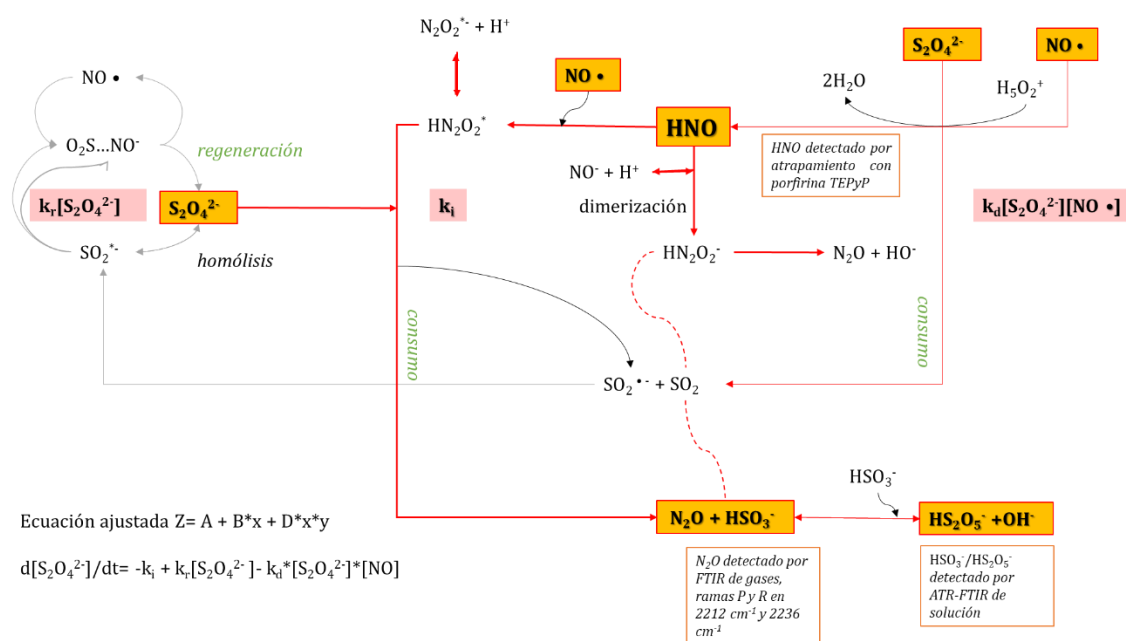


Figura 3.15 Esquema propuesto para las reacciones involucradas en la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.

La principal vía de consumo de ditionito proviene de la parte de la ecuación que depende de dos especies: $D \cdot x \cdot y$. La reacción entre el dímero, es decir el ditionito sin romperse por homólisis ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$), y $\bullet\text{NO}$ sería de la forma: $k_d[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}][\bullet\text{NO}]$. Por lo tanto, el valor obtenido del parámetro “D” corresponde a la constante k_d : $8464 \pm 1634 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La detección de HNO como intermediario permite sugerir que ocurre una reducción de $\bullet\text{NO}$ y una oxidación de ditionito (ecuación 3.9).



Para determinar la viabilidad de cada una de las vías propuestas en este mecanismo, se realizó el análisis computacional en colaboración con el Dr. Mateus F. Venâncio de Universidade Federal da Bahia, Brasil. La Figura 3.16 ilustra las geometrías optimizadas

para la etapa inicial de la reacción entre el dímero de ditionito y una molécula de $\bullet\text{NO}$. En la Figura 3.16, *Reac* representa el complejo pre-activo, en el que todas las moléculas se encuentran en un estado de interacción. En esta instancia, se introdujo un ión Zundel (H_5O_2^+) proveniente de las moléculas de H_2O del disolvente en el que están disueltas ambas especies. El ditionito, que tiene carga negativa, atrae a esta especie cargada positivamente mediante la intermediación de un protón. Esta interacción posibilita la formación de un enlace de tipo puente de hidrógeno (N-H) entre un hidrógeno del Zundel y el nitrógeno del $\bullet\text{NO}$. De esta manera, se produce el acercamiento de las especies a reaccionar.

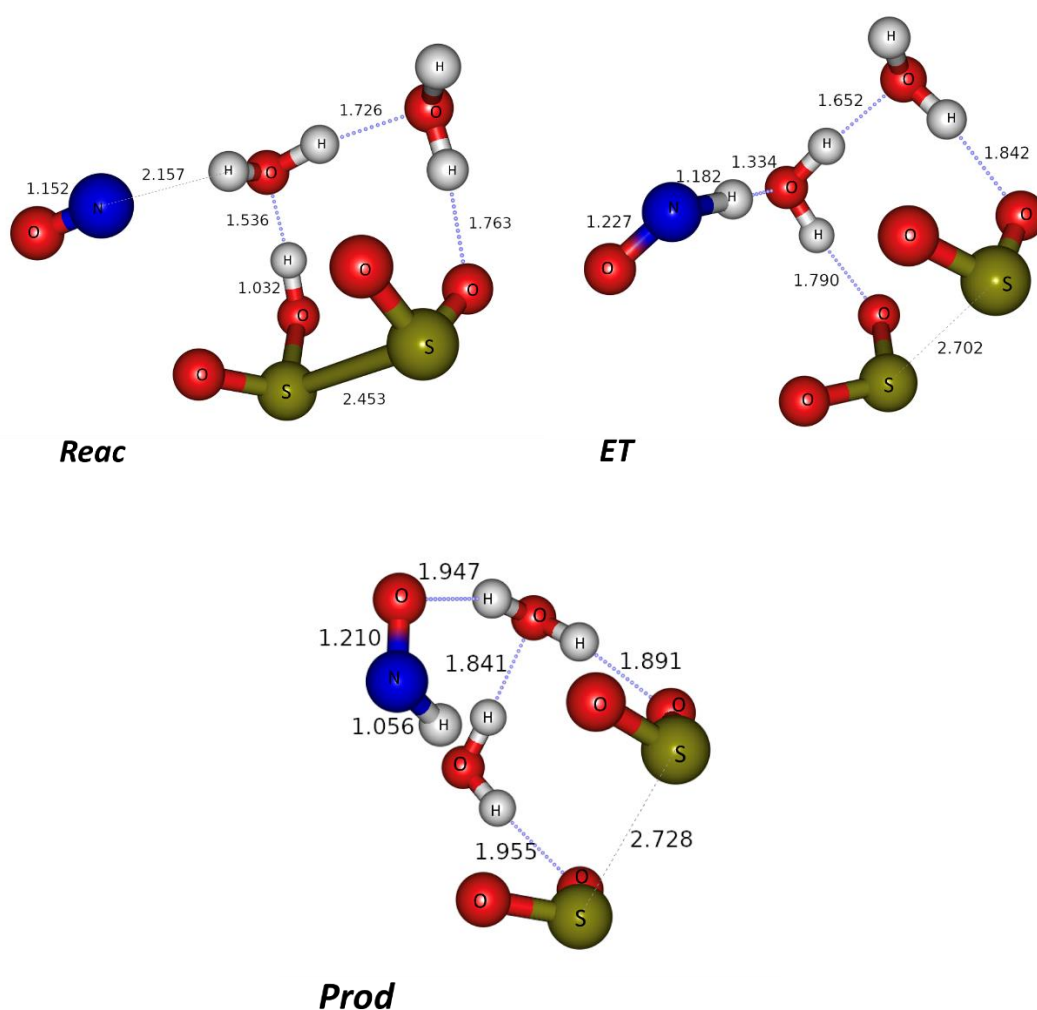


Figura 3.16 Geometrías optimizadas para el paso inicial del mecanismo de reacción propuesto entre ditionito y $\bullet\text{NO}$. Se muestran las geometrías del complejo pre-activo (*Reac*), el estado de transición (*ET*) y los productos (*Prod*).

El estado de transición corresponde al punto en el que la reacción está preparada para proceder (Figura 3.16, *ET*). La interacción entre la molécula de $\bullet\text{NO}$ y el par ditionito-Zundel

se produce a través del nitrógeno. Este estado, facilitado por el puente de hidrógeno (N-H), tiene como resultado un desplazamiento neto de un átomo de hidrógeno ($H^+ + e^-$) desde el Zundel hacia el $\bullet NO$.

Posteriormente, se produce una rotación de la especie ONH, dando lugar a una nueva orientación que permite al oxígeno formar un puente de hidrógeno con el protón del Zundel. Esta forma más estable que sigue al estado de transición conduce finalmente a la formación de HNO, como se evidencia en Figura 3.16, *Prod.*

Además, se analizó la energía potencial asociada a la separación de los fragmentos “SO₂” durante esta etapa de la reacción (figura 3.17). A partir de los 2 Å en adelante la energía potencial baja abruptamente hasta un valor cercano a 0. Esto indicaría que los fragmentos son más estables cuando están separados o que la energía requerida para que se mantengan unidos es muy alta. Esto apoya a la primera etapa del mecanismo propuesto en la cual, paralelamente a la reducción de $\bullet NO$ a HNO se produce la separación de los fragmentos en SO₂ y SO₂^{•-} (ecuación 3.9).

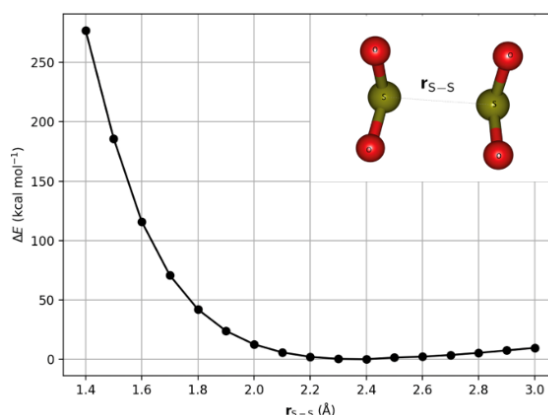


Figura 3.17 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol⁻¹, para la separación de fragmentos de SO₂ + SO₂^{•-}.

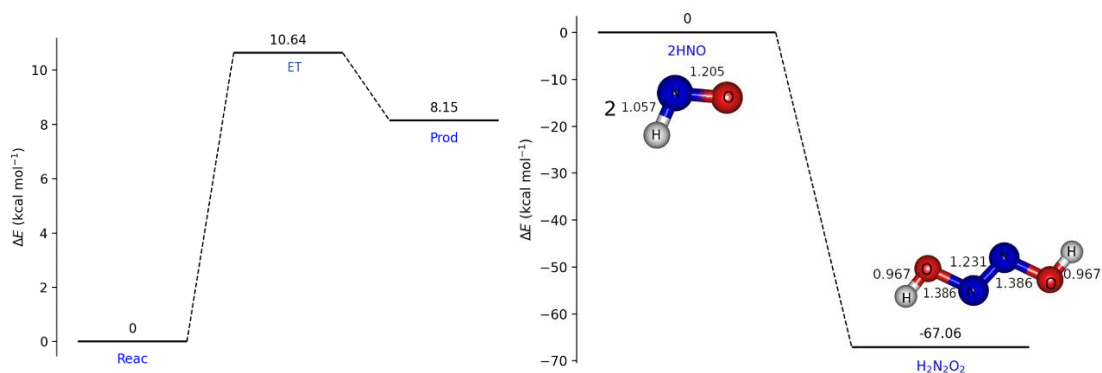


Figura 3.18 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol⁻¹, para el paso inicial del mecanismo propuesto (izquierda) y para la dimerización del HNO (derecha).

La Figura 3.18 muestra la superficie de energía potencial de reacción para el paso inicial del mecanismo propuesto en el que se forma HNO y luego puede dimerizar para dar N₂O. El panel izquierdo de la muestra la superficie de energía potencial en kcal mol⁻¹ para los reactivos (Reac), el estado de transición (ET) y el producto (Prod). Se puede observar que la formación del estado de transición desde el complejo pre-activo necesita superar una barrera energética de 10,64 kcal mol⁻¹. Luego, esta barrera energética se estabiliza en aproximadamente 2,5 kcal mol⁻¹, lo que permite la formación de los productos. Si bien los niveles de energía indican que los reactivos son más estables que los productos, la barrera energética no es tan grande como para excluir la posibilidad de que la reacción ocurra. Además, el HNO generado en esta primera etapa dimeriza rápidamente para formar H₂N₂O₂ (Figura 3.18, panel derecho). Esta reacción de dimerización provee al sistema una estabilización de 67 kcal mol⁻¹, lo que podría favorecer aún más el avance de la primera reacción.

Está establecido que el producto primario de la dimerización del HNO es la especie H₂N₂O₂. Sin embargo, su p*K*_{a1} es 6,9 y su p*K*_{a2} es 11,6, de modo que, al pH de nuestros experimentos, se encontraría en la forma desprotonada HN₂O₂⁻ [335, 336]. En la figura 3.19 se muestra el perfil energético para la reacción de abstracción de un OH⁻ del HN₂O₂⁻ por SO₂ para producir HSO₃⁻ y N₂O (ecuación 3.9).



En primer lugar, se requiere superar una barrera energética de 9,77 kcal mol⁻¹ para la formación del complejo del estado de transición y, a partir de aquí, se calcula una estabilización de 51,31 kcal mol⁻¹ para la formación de los productos.

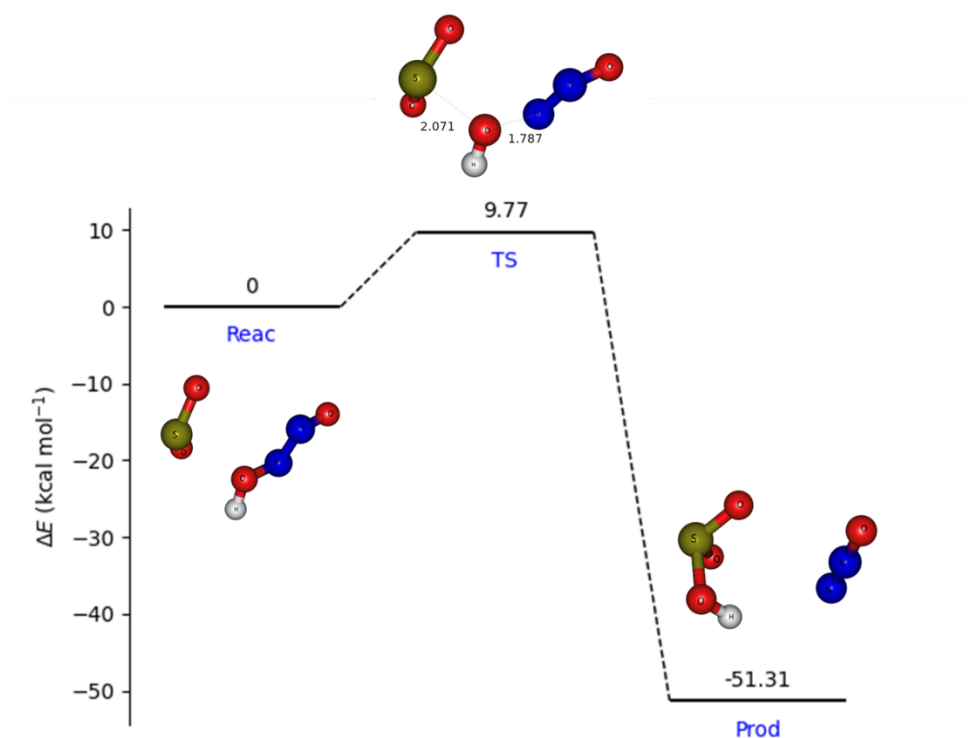


Figura 3.19 Superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol⁻¹, para la reacción entre HN₂O₂⁻ y SO₂ para producir HSO₃⁻ y N₂O. Además, se muestran las geometrías optimizadas en los diferentes niveles.

Estos resultados indican que los pasos de reacción involucrados en el consumo de ditionito por •NO ($k_d[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}][\bullet\text{NO}]$) son energéticamente favorables. En este proceso, HNO se forma como intermediario, y los productos finales obtenidos son N₂O y HSO₃⁻/HS₂O₅⁻, como se observa en la parte derecha del esquema en la Figura 3.15. Más adelante analizaremos las posibles reacciones en las que puede participar el radical SO₂•⁻ que se forma también por esta vía.

Según la ecuación ajustada, se identificó un parámetro “A” que representa un consumo constante de ditionito, independiente de su concentración. Esto sugirió la posible existencia de una reacción en la que participe una especie intermediaria. Por lo tanto, definimos k_i como la constante de reacción entre ellos (Ecuación 3.12), cuyo valor fue determinado a partir del ajuste de las curvas experimentales, $k_i = 2,87 \times 10^{-5} \pm 1,71 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$. Para examinar esta parte, se llevó a cabo la observación de los intermediarios reactivos potencialmente presentes en el sistema. Una reacción que está presente en el medio es la que ocurre entre HNO y •NO para dar el radical HN₂O₂•, la cual posee una constante de velocidad de $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [77]. El radical HN₂O₂• resultante reacciona rápidamente con

otra molécula de $\bullet\text{NO}$, produciendo el anión de capa cerrada N_3O_3^- , que decae a los productos finales $\text{N}_2\text{O} + \text{NO}_2^-$ con una constante de velocidad de aproximadamente 300 s^{-1} [77]. Sin embargo, mediante cromatografía de intercambio iónico no se detectó la formación de NO_2^- por lo que esta reacción fue excluida, al menos en las condiciones experimentales empleadas. Alternativamente, se evaluó mediante cálculos computacionales si era posible que la especie $\text{HN}_2\text{O}_2\bullet$ pudiese reaccionar con $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ para dar lugar a la formación de N_2O , $\text{SO}_2\bullet^-$ y HSO_3^- (Ecuaciones 3.11 y 3.12).



La figura 3.20 muestra que el estado de transición entre $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ y $\text{N}_2\text{O}_2\bullet^-$ requiere superar una barrera energética de 10 kcal, mientras que el decaimiento hacia los productos implica una estabilización de casi -50 kcal con lo cual, la reacción de consumo por esta vía se encuentra favorecida energéticamente, por lo que es probable que ocurra. Además, ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$) se encuentra en exceso con respecto al radical $\text{HN}_2\text{O}_2\bullet$, por lo que la velocidad será independiente de su concentración. Entonces, estas reacciones representadas en la parte central del esquema de la Figura 3.15, fueron asignadas al consumo constante de ditionito a partir de la observación de una independencia, al menos de manera directa, con las concentraciones del mismo y de $\bullet\text{NO}$.

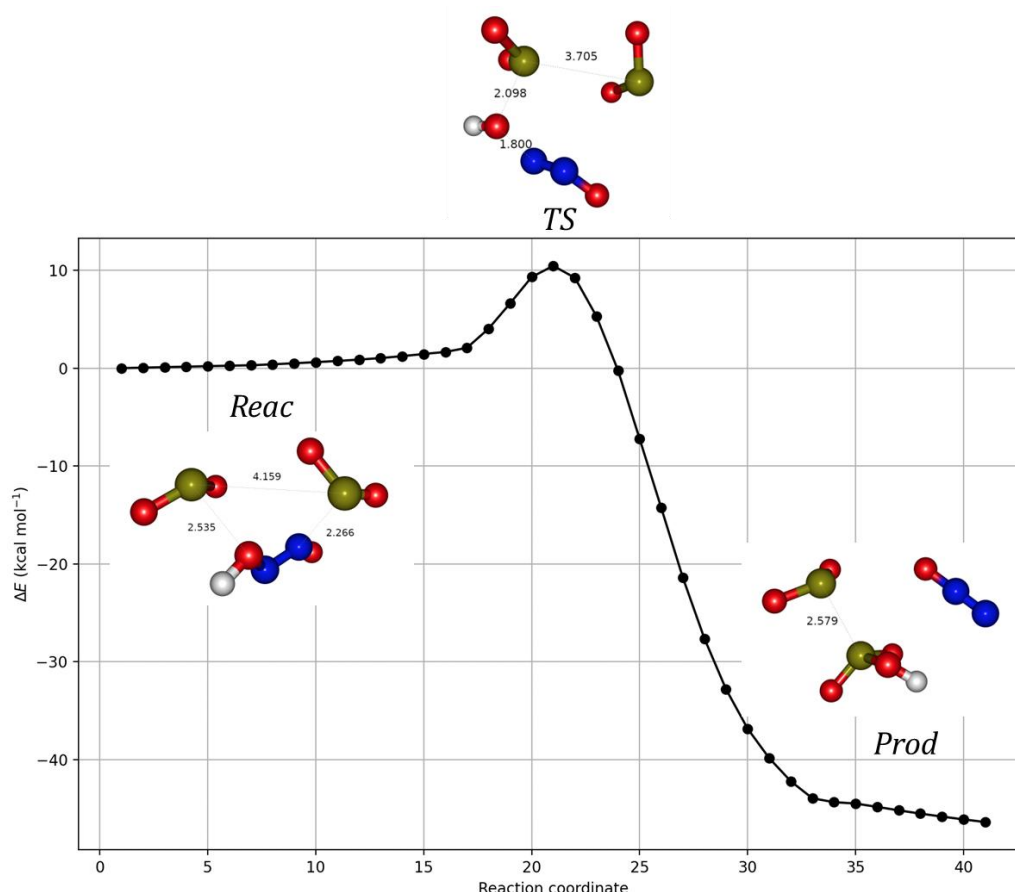


Figura 3.20 Geometrías optimizadas y superficie de energía potencial de reacción, en kcal mol⁻¹, para la reacción entre HN₂O₂• y ditionito (S₂O₄²⁻) para producir SO₂•, HSO₃⁻ y N₂O.

Como se observa en la ecuación de ajuste a las medidas cinéticas, debe existir un término de regeneración de ditionito que dependa de la concentración del mismo sin alterar la concentración de •NO ($k_r[S_2O_4^{2-}]$). Entonces, se evaluó la posibilidad de que se produzca la regeneración de ditionito a partir de la reacción entre el monómero SO₂• y •NO, mientras que no haya un consumo neto de •NO. En solución, ditionito se puede romper por homólisis dando lugar a la formación de los radicales idénticos SO₂• (ecuación 3.2) aunque la concentración de monómero formado por ruptura homolítica es baja. Por ejemplo, a partir de 55 μM de ditionito con, tenemos que $K_H = \frac{[SO_2^{\bullet-}]^2}{[S_2O_4^{2-}]}$ y $[S_2O_4^{2-}]_{eq} = 55 \mu M - [SO_2^{\bullet-}]_{eq}$. Entonces, las concentraciones en el equilibrio (considerando la K_H reportada de $1,4 \times 10^{-9}$) serían $5,47 \times 10^{-5}$ para S₂O₄²⁻ y $5,46 \times 10^{-7}$ para SO₂•, es decir, habría 100 veces más dímero que monómero. Además, se estimó la constante de equilibrio mediante análisis computacional con el dímero y el monómero solos o en presencia de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ de tal manera de evaluar un posible efecto causado por la presencia del contraión. Aunque la constante de equilibrio

(K_H) fue ligeramente inferior en presencia de los cationes, no hubo diferencias significativas entre ellos, dentro del 1% para todos. Por otro lado, si bien el $\text{SO}_2^{\bullet-}$ formado por esta vía es casi despreciable, paralelamente se forma por la vía de consumo de ditionito por $\bullet\text{NO}$ (Ecuación 3.9). Es decir, como se propuso más arriba, cuando ditionito reacciona con $\bullet\text{NO}$ para dar HNO (k_d), se produce la separación de los fragmentos SO_2 y $\text{SO}_2^{\bullet-}$. Entonces, para la reacción entre $55\ \mu\text{M}$ de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ y $250\ \mu\text{M}$ de $\bullet\text{NO}$, y sabiendo que la velocidad está dada por $k_d[\text{S}_2\text{O}_4^{2-}][\bullet\text{NO}]$ siendo $k_d = 8464 \pm 1634\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, la formación de $\text{SO}_2^{\bullet-}$ ocurre con una velocidad inicial de $1,16 \times 10^{-4}\ \text{M}\ \text{s}^{-1}$. Además, si bien es más difícil obtener un valor certero, también se formaría monómero por la reacción de la Ecuación 3.12. Por lo tanto, si bien la concentración de monómero formado por homólisis del ditionito resulta pequeña, la reacción de regeneración a partir de $\text{SO}_2^{\bullet-}$ se vuelve relevante debido a que el mismo se genera por las otras dos vías de reacción.

Entonces, $\text{SO}_2^{\bullet-}$ que es un radical, podría combinarse con otro $\text{SO}_2^{\bullet-}$ mediante la reacción de monomerización ya conocida. Por otro lado, podría combinarse rápidamente al $\bullet\text{NO}$ que también es un radical y está en exceso. Las reacciones de combinación entre radicales, o también llamadas reacciones de terminación, son un paso crucial en las reacciones en cadena de radicales, en las que, generalmente, se forman enlaces σ . En este caso, la interacción fuerte entre $\text{SO}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$ podría dar lugar a la especie cargada negativamente SO_2NO^- en estado triplete o singlete. Los cálculos indicaron que el estado triplete es más estable que el singlete, similar a lo que ocurre con $\text{NO}^{\bullet}$. Además, la interacción relativamente fuerte S-N, cuya distancia de mínima energía es de $2.1\text{\AA}$, se rompe con una energía de $7\ \text{kcal/mol}$, similar a la fuerza de enlace de los puentes de hidrógeno más fuertes, es decir que no es realmente un enlace. La figura 3.21 muestra el perfil energético asociado a las distancias en el enlace S-N en la especie SO_2NO^- partiendo del estado singlete.

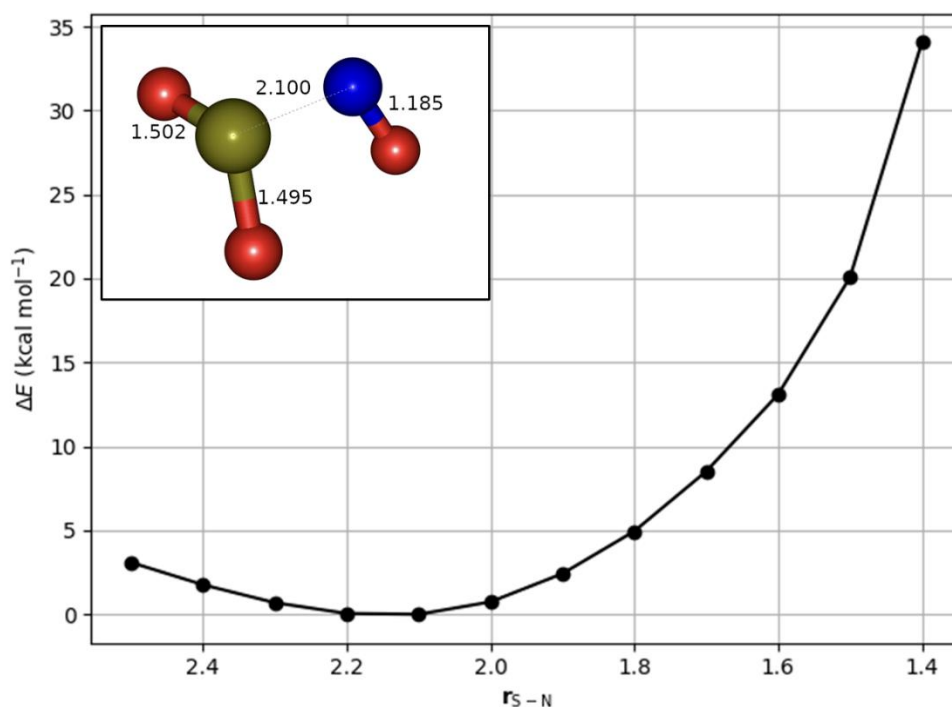


Figura 3.21 Perfil energético asociado a las distancias en el enlace S-N en la especie SO_2NO^- formado a partir de la interacción de los radicales $SO_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$.

Luego, mediante cálculos computacionales, se analizó la posibilidad de que esta especie reaccione con otro $SO_2^{\bullet-}$ dando lugar a la regeneración de ditionito con liberación de la molécula de $\bullet NO$ (Ecuaciones 3.13 y 3.14).



Sin embargo, las energías involucradas en la transición desde reactivos a productos, sin considerar el estado de transición, son diferentes si se parte de SO_2NO^- triplete o singlete. Mientras que si se parte de SO_2NO^- singlete, $\Delta G = -0,56$ Kcal/mol, la energía requerida partiendo de $O_2S...NO^-$ triplete es $\Delta G = 3,89$ Kcal/mol. Por lo tanto, se consideró que la reacción de regeneración debe ocurrir más probablemente desde el estado singlete. Entonces, la regeneración puede ocurrir por reacción de $SO_2...NO^-$ con $SO_2^{\bullet-}$ o por recombinación con otra especie idéntica ($SO_2^{\bullet-}$) mediante el equilibrio de dimerización/monomerización conocido, desplazando al mismo hacia la formación de $S_2O_4^{2-}$ (Ecuación 3.2).

Si bien, aún no se cuenta con los valores del estado de transición de esta reacción, las energías involucradas son cercanas a 0, indicando que podrían ser, al menos, equilibrios probables. Esto es consistente con la cinética observada mediante el análisis de los espectros UV-visible, donde se confirma que existe una regeneración de ditionito.

3.5 Conclusiones

Desde el punto de vista redox, mientras que los ambientes oxidantes favorecen la conversión de $\bullet\text{NO}$ en nitrito, nitrato, peroxinitrito o $\bullet\text{NO}_2$ (entre otros), se espera que los ambientes reductores produzcan HNO , N_2O o hidroxilamina. En los últimos años se ha avanzado mucho en este campo y ahora se sabe que es posible obtener HNO a partir de la reducción de $\bullet\text{NO}$ por la acción de agentes reductores suaves como fenoles, tioles o aminas [57, 58, 231]. Si bien la reacción entre un agente reductor fuerte, como el ditionito, y el $\bullet\text{NO}$ podría dar lugar directamente a otros productos más reducidos, como el N_2O , en este trabajo de tesis confirmamos que se generan tanto HNO como N_2O . El N_2O es uno de los productos de la rápida dimerización del HNO , por lo cual, la formación de HNO fue demostrada tanto de manera directa como indirecta. N_2O es probablemente el único producto nitrogenado final de la reacción, debido a que el rendimiento de N_2O fue mayor al 90%. Además, no se observó la presencia de nitritos, por lo que se excluyó la generación de esta especie a partir de la reacción de $\bullet\text{NO}$ con HNO . La incertidumbre en la identificación de los productos finales azufrados se debe a su equilibrio dinámico en solución, lo que dificulta una caracterización definitiva. Sin embargo, la mezcla de reacción mostró un comportamiento análogo a las soluciones de metabisulfito/bisulfito, reflejado en su espectro ATR-FTIR y en su capacidad para alterar el pH del medio. Esta observación, junto con la diferenciación de los productos azufrados obtenidos por la acción del O_2 o por descomposición anaeróbica, sugiere que la presencia de $\bullet\text{NO}$ introduce una ruta de reacción diferente a las vías clásicas de descomposición del ditionito.

Los resultados obtenidos en este capítulo de tesis revelaron una cinética que no se ajusta a reacciones de orden convencional (0, 1 o 2), lo que hizo necesario un análisis más detallado. Lo interesante de estos hallazgos es que la cinética observada sugería la coexistencia simultánea de procesos de consumo y regeneración de ditionito. Aunque las vías de reacción podrían ser diversas, proponemos algunas que podrían explicar el comportamiento cinético registrado teniendo en cuenta que la descomposiciones aeróbicas y anaeróbicas de ditionito parecen no influir en el comportamiento cinético general. Asimismo, cada etapa de esta propuesta se sustenta en cálculos computacionales, los cuales indicaron, en términos

generales, estabilizaciones energéticas favorables para pasar del estado de transición hacia los productos, mientras que la formación de los complejos de transición desde los reactivos requería superar barreras energéticas pequeñas.

En conclusión, se comprobó que la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$ genera HNO , el cual se encuentra inmerso en una compleja red de reacciones que ocurren en paralelo y que confluyen en los productos finales bisulfito/metabisulfito y N_2O (figura 3.22).

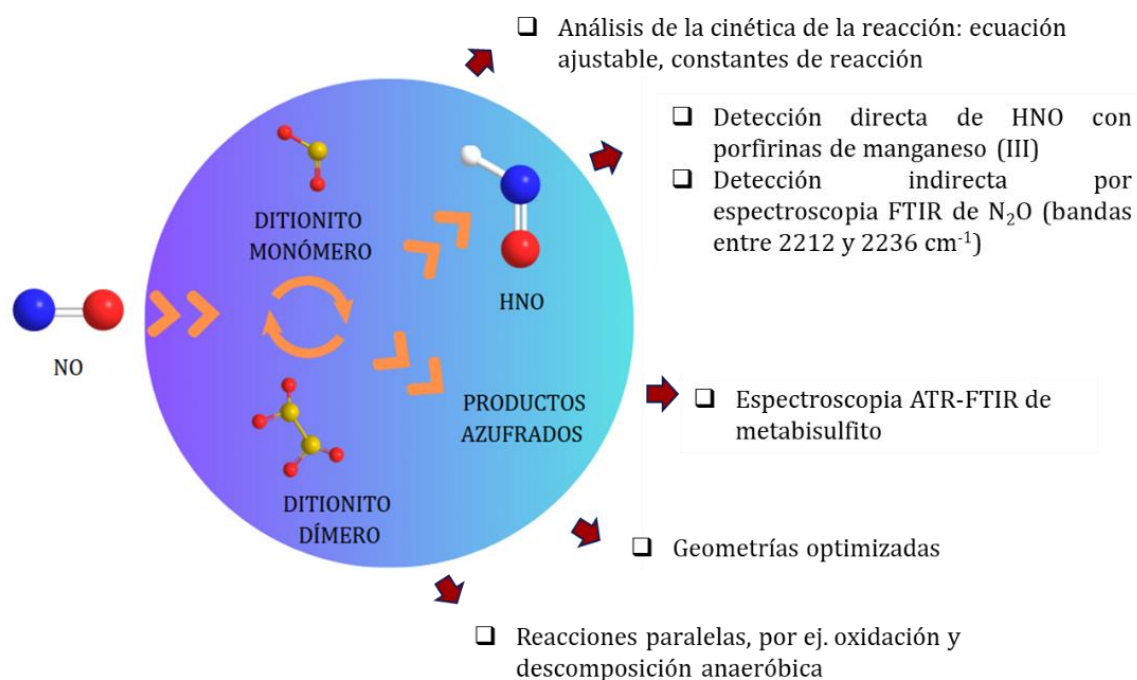


Figura 3.22 Resumen de los resultados de la reacción entre ditionito y $\bullet\text{NO}$.

En sistemas en los que ambas especies están presentes debe considerarse la presencia de esta reacción. Por ejemplo, en ocasiones se emplea el ditionito para obtener el estado reducido de una enzima y el $\bullet\text{NO}$ está presente en el sistema como un sustrato. Debido a esto, los efectos observados en reacciones catalizadas por enzimas, la cinética y/o productos observados podrían estar influenciados por la presencia de HNO . Además, como es sabido el HNO reacciona con tioles de las enzimas dando lugar a disulfuros o sulfenamidas, lo que podría dar lugar a inhibiciones de la actividad enzimática.

3.6 Sección experimental

El hidrosulfito sódico (ditionito) se adquirió a Sigma-Aldrich. La meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) soluble en agua (Mn(III)TEPyP) se adquirió en Frontier Scientific. El trioxodinitrato o sal de Angeli ($\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$, dador de HNO) se sintetizó según lo detallado en el capítulo 2, conforme a los procedimientos publicados en la

bibliografía [29, 30]. El $\bullet\text{NO}$ se generó anaeróbicamente añadiendo gota a gota agua desgasificada a una mezcla de 4 g de NaNO_2 , 8,5 g de FeSO_4 y 8,5 g de NaBr según los procedimientos publicados en la bibliografía, ver en el capítulo II [272]. El $\bullet\text{NO}$ resultante se pasó por una solución de NaOH 0,25 M para eliminar más óxidos de nitrógeno y se dejó burbujear en agua desgasificada para obtener una solución saturada de $\bullet\text{NO}$ ($[\bullet\text{NO}] = 1,9 \text{ mM}$). Para más detalles sobre esta síntesis dirigirse al capítulo 2.

En todos los experimentos se utilizó agua de grado Milli-Q y argón de alta pureza. Salvo que se indique lo contrario, todos los reactivos se adquirieron y utilizaron tal cual se recibieron. Todos los experimentos se realizaron a 25°C en *buffer* fosfato 0,1 M, $\text{pH} = 7,4$, con 10^{-4} M de EDTA para evitar interferencias o reacciones no deseadas con Cu (II) u otros cationes divalentes. Las soluciones de ditionito se prepararon de manera estrictamente anaeróbica dentro de tubos de Schlenk y se manipularon con jeringas *gastight*.

3.6.1 Recristalización de ditionito

Como se mencionó anteriormente el ditionito es altamente inestable y se descompone incluso en su estado sólido. Por lo tanto, la disponibilidad del ditionito puro es limitada. Sin embargo, se logró elevar la pureza de ditionito desde un 80 % a un 90% mediante una técnica de recristalización. Brevemente, la técnica consistió en disolver ditionito en una mezcla anaeróbica 80:20 de metanol/ NaOH 0.1 M, seguido de la precipitación del ditionito mediante la adición de metanol seco. Luego, por centrifugación se logró la separación del ditionito precipitado del resto de los contaminantes que permanecían en la solución. Por último, se realizaron lavados con metanol y secado del sólido por aplicación de vacío. La pureza final se midió por titulación del mismo con hexacianoferrato de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$) según el método de Charles W. J. Scaife y Ralph G. Wilkins [337]. Sabiendo que un mol de ditionito de sodio (peso molecular 174.107g/mol) reduce dos moles de hexacianoferrato de potasio (peso molecular 329.26, ϵ 1012 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se preparó una solución de este reactivo en *buffer* fosfato $\text{pH} = 7$ desgasado, para una absorbancia de 1 y luego se fueron agregando de a $\frac{1}{4}$ de equivalente de ditionito. Por medición del cambio de absorbancia mediante cada agregado, y sabiendo que el coeficiente de extinción molar del reactivo es 1012 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se obtuvo el número de moles consumidos, lo que arrojó el nivel de pureza del ditionito del 90%. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a la reactividad del ditionito no recristalizado con respecto al recristalizado. Para minimizar esta descomposición, durante el desarrollo de este trabajo de tesis se mantuvo el frasco de ditionito de sodio en atmósfera de argón y dentro de un freezer a -20°C , verificando el mantenimiento del porcentaje de pureza cada 3 meses, aproximadamente.

3.6.2 Sistema para la detección de HNO gaseoso

Como se mencionó en el Capítulo I “Introducción”, las porfirinas de manganeso se emplean frecuentemente para detectar HNO. La ventaja de este método es que permite discriminar HNO de •NO ya que estas dos especies reaccionan de manera diferente con la porfirina. La reacción entre estas porfirinas y HNO da como producto el complejo nitrosilado Mn(II)-NO, mientras que la reacción con •NO es muy lenta. No obstante, la porfirina Mn(III)TEPyP es susceptible de convertirse en Mn(II) por la acción de reductores, cuya reactividad con •NO se evidencia también por la formación de la especie Mn(II)-•NO [90, 120, 148, 338]. Así, en presencia del reductor ditionito, se obtiene el mismo producto al reaccionar la especie Mn(II) con •NO y la especie Mn(III) con HNO. En consecuencia, no es posible discriminar entre HNO y •NO en una mezcla de reacción que contiene ditionito. Debido a este problema, el desafío consistió en llevar a cabo la reacción en un recipiente separado de la solución de porfirina y, a continuación, dirigir el gas producido a dicha solución para su detección por UV-visible. Con este fin, se construyó el sistema experimental que se muestra en la Figura 3.23 para permitir la detección del HNO gaseoso producido a partir de la reacción en solución entre el ditionito y el •NO. El •NO se generó anaeróbicamente en (1) mediante la adición gota a gota de agua desgasificada a una mezcla de NaNO₂, FeSO₄ y NaBr. Esta mezcla gaseosa se hizo burbujear en la solución de NaOH en (2) para eliminar las impurezas de nitrógeno, como el NO₂. A continuación, el gas se hacía pasar por la solución y reaccionaba con el ditionito en (3), y finalmente se hacía burbujear en la solución de porfirina para la detección UV-visible en (4).

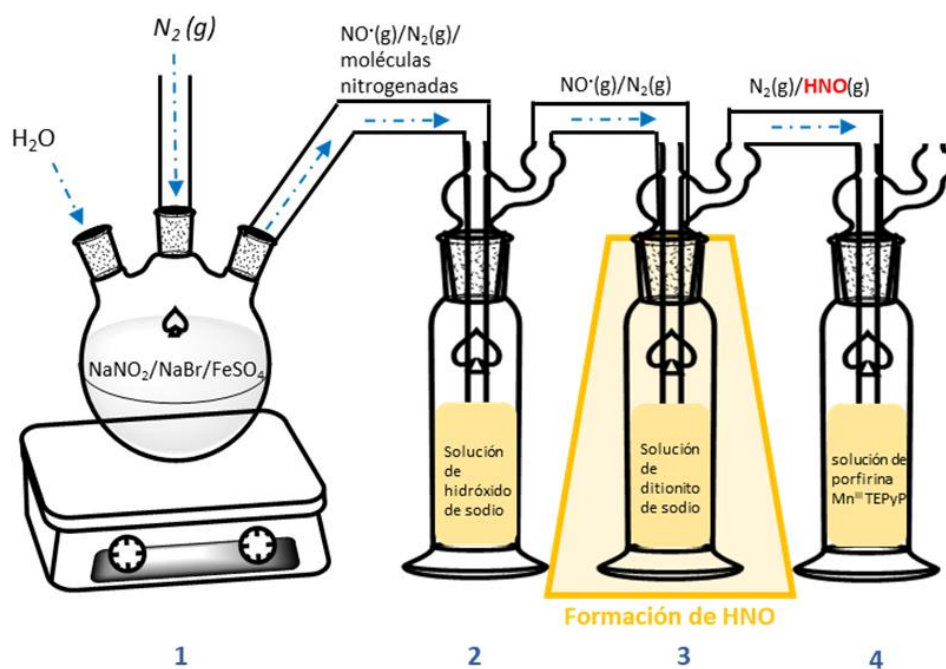


Figura 3.23 Sistema anaeróbico para la detección directa de HNO por atrapamiento con porfirinas de Mn(III). El sistema consta de cuatro partes, (1) - síntesis de •NO, (2) - solución de NaOH (0,25M) para eliminar otras moléculas nitrogenadas, (3) - solución de ditionito (3,3 mM) para reducir el •NO a HNO, (4) - porfirina de Mn(III) (1 mM) para atrapar/detectar el HNO.

3.6.3 Curva de calibración con sal de Angeli

El espectro IR de N_2O presenta bandas de absorción entre 2212 cm^{-1} y 2236 cm^{-1} para las ramas P and R, respectivamente [34]. Como se mencionó anteriormente, HNO dimeriza rápidamente para formar $H_2N_2O_2$, que luego se descompone en N_2O y H_2O . Por ello, la detección de estas bandas por espectroscopia IR indica de manera indirecta la formación de HNO. De hecho, es un método de detección indirecta y cuantificación de HNO muy utilizado aún en la actualidad.

En este trabajo de tesis, se llevó a cabo la cuantificación de HNO a partir del registro de los espectros IR de N_2O producido por descomposición *in situ* de sal de Angeli ($Na_2N_2O_3$). Como es bien sabido, la sal de Angeli, en su forma $HN_2O_3^-$, se descompone para dar HNO con una velocidad independiente del pH en un rango de pH entre 4 y 8 (Ecuación 3.15) [30]. A 25°C la constante de velocidad para esta descomposición es $6,75 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ lo que equivale a un $t_{1/2}$ de 17 minutos.



Es importante aclarar que, a pHs superiores a 8, la descomposición de la especie $\text{N}_2\text{O}_3^{2-}$ es mucho más lenta, mientras que, a pH por debajo de 3 el producto de la descomposición es $\bullet\text{NO}$ y no HNO .

La construcción de la curva de calibración requirió la preparación de soluciones con cantidades específicas de sal de Angeli en *buffer* fosfato a pH 7,4. Cada punto de la curva se hizo a volumen final de 10 ml en un recipiente de 100ml de capacidad, de esta manera, el volumen del *headspace* es suficientemente grande para realizar las extracciones de gas sin perturbar demasiado el sistema. Luego de 90 minutos de espera para una descomposición completa de la sal de Angeli, se extrajeron muestras de gas y se inyectaron en la celda para gases del FTIR (Figura 3.24, superior). A partir de la medición de la absorbancia de la banda ubicada en 2236 cm^{-1} se obtuvieron los valores para la construcción de la curva de calibración que se muestra en la Figura 3.24, inferior.

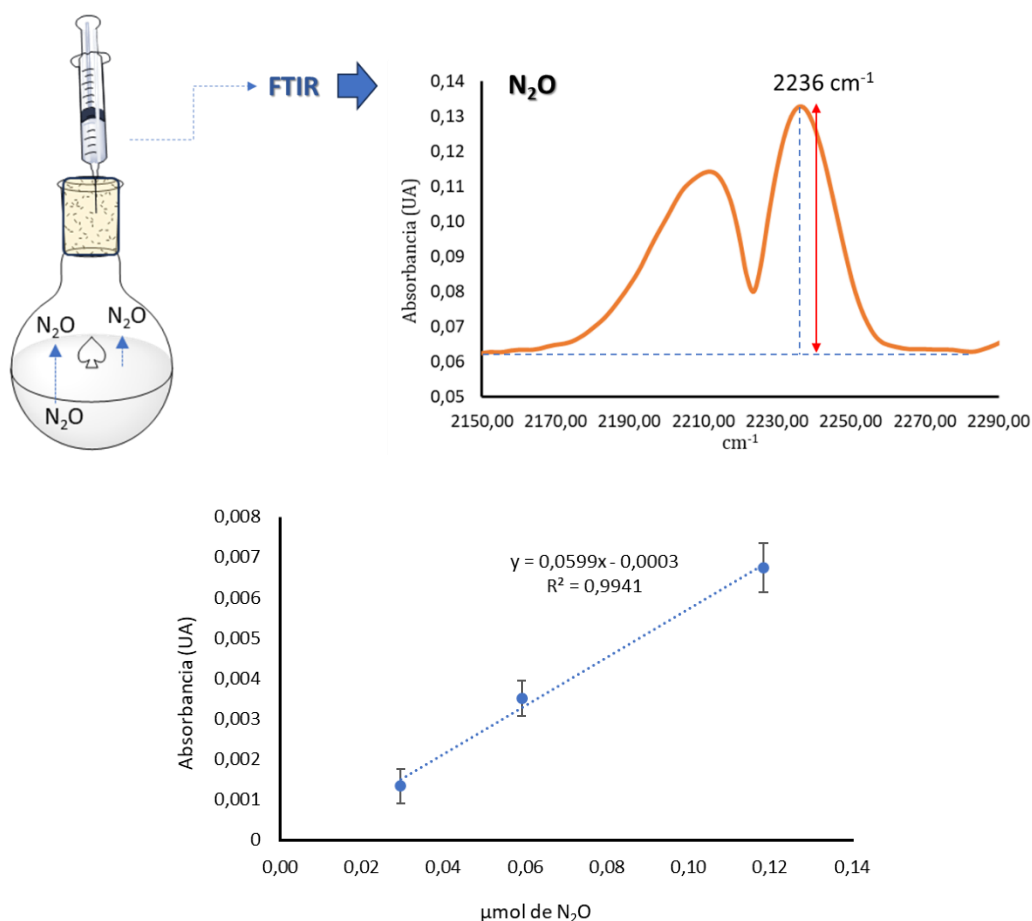


Figura 3.24 Procedimiento experimental para la construcción de la curva de calibración con sal de Angeli como dador de $\text{HNO}/\text{N}_2\text{O}$ (superior). Curva de calibración con ajuste lineal. Las barras de error indican corresponden al desvío estándar de la media (inferior).

Capítulo 4

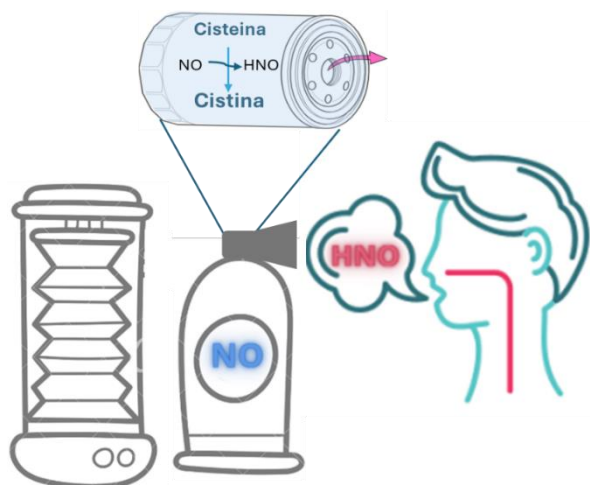
Generación de HNO en la
reacción entre óxido nítrico
gaseoso y cisteína sólida

Capítulo 4. Generación de HNO en la reacción entre •NO gaseoso y cisteína sólida

4.1 Resumen del capítulo

El desarrollo de nuevos métodos para generar HNO es muy interesante debido a su posible uso como tratamiento médico. En particular, la obtención de HNO sin la utilización de fases líquidas surge como una nueva y prometedora estrategia para su uso como HNO inhalado, teniendo en cuenta que su congénere más oxidado (•NO) se está usando de esta manera con buenos resultados. La administración de •NO inhalado (iNO) mejora la oxigenación en pacientes con COVID-19 [339–341], en neonatos con hipertensión pulmonar [342, 343] y en adultos con insuficiencia respiratoria [344]. En este contexto, recientemente, en el grupo de trabajo hemos presentado un novedoso método de generación de HNO, que evita la necesidad de utilizar un sistema líquido o condiciones experimentales extremas. Este método consiste en la reacción entre una base gaseosa (NH_3) y un dador de HNO (ácido de Piloty) en fase sólida, permitiendo la formación de HNO gaseoso de forma rápida y económica [198, 345]. En este capítulo de tesis, presentamos otra forma de generar HNO gaseoso en una reacción heterogénea, en la que sólidos reductores como la cisteína reaccionan con •NO (g) para producir HNO (g).

Primeramente, la identificación de HNO se llevó a cabo de manera indirecta mediante el uso de espectroscopía infrarroja para detectar N_2O . Posteriormente, la detección directa se logró midiendo por UV-visible el atrapamiento de HNO con porfirinas de Mn(III). Además, se probaron otros sólidos económicos y biocompatibles como el ácido ascórbico y los flavonoides (naringina, naringenina). Los resultados mostraron que este nuevo método es una forma más fácil y barata de generar HNO en fase gaseosa. Además, este método evita la necesidad de utilizar reactivos tóxicos como el amoníaco, y dadores de HNO como el ácido de Piloty, los cuales requieren ser conservados a baja temperatura.



Palabras clave: cisteína, óxido nítrico, nitroxilo, inhalación

4.2 Introducción

Como se desarrolló ampliamente en el capítulo 1, se ha puesto la atención en el HNO como fármaco potencial para el tratamiento de diversas patologías. Una estrategia nueva y prometedora para la obtención de HNO es evitar el uso de fases líquidas, permitiendo su aplicación como HNO inhalado. Esta técnica se inspira en los buenos resultados obtenidos con el uso inhalado de su congénere más oxidado, el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$). El $\bullet\text{NO}$ induce la relajación de las células musculares lisas en la vasculatura. Debido a su alta afinidad con la oxihemoglobina, el $\bullet\text{NO}$ inhalado se elimina rápidamente por los glóbulos rojos y sus efectos vasodilatadores se limitan a las regiones ventiladas del pulmón, mejorando la oxigenación de la sangre y disminuyendo la derivación intrapulmonar.[24] Históricamente, medicamentos generadores de $\bullet\text{NO}$, como la nitroglicerina y el nitroprusiato de sodio, han sido utilizados para reducir la presión arterial y tratar la angina de pecho, pero su uso sistémico en pacientes con lesión pulmonar puede causar hipoxemia arterial. Frostell y colaboradores sugirieron que el $\bullet\text{NO}$ inhalado tiene la capacidad de relajar la vasculatura pulmonar. Sin embargo, al entrar en el torrente sanguíneo, sería eliminado rápidamente por la hemoglobina, lo que evitaría los efectos de vasodilatación a nivel sistémico.[346, 347] Diversas investigaciones indican que el $\bullet\text{NO}$ inhalado tiene un papel importante en el tratamiento de la hipertensión pulmonar de pacientes pediátricos y adultos con insuficiencia respiratoria y cardíaca. [348–352] El $\bullet\text{NO}$ inhalado también se puede usar durante el cateterismo cardíaco para determinar la capacidad vasodilatadora del lecho vascular pulmonar en pacientes con hipertensión pulmonar. Además, estudios recientes sugieren que el $\bullet\text{NO}$ inhalado puede prevenir la lesión por isquemia-reperfusión y reducir la vasoconstricción inducida por la hemólisis y la insuficiencia renal después de un bypass cardiopulmonar prolongado. [353] Al presente, el $\bullet\text{NO}$ inhalado se usa para tratar un espectro de afecciones cardiopulmonares, incluida la hipertensión pulmonar en niños y adultos. [354] Por lo tanto, la administración de la especie gaseosa HNO, que es su congénere reducido, presenta un enorme potencial. No obstante, se debe tener en cuenta que la administración de estos dos gases a través de respiradores, puede llevar a la formación de especies tóxicas derivadas de la reacción de los mismos con el O_2 . El $\bullet\text{NO}$ reacciona con el oxígeno para dar $\bullet\text{NO}_2$, [107] mientras que la reacción de HNO con O_2 da lugar a la formación de peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$). [97, 98] Para más detalles de estas reacciones ver la sección 1.3.3.1. A pesar de que la presencia de este tipo de reacciones es posible y puede llevar a la formación de especies tóxicas, se obtuvieron buenos resultados con la administración de $\bullet\text{NO}$ inhalado.

Si bien HNO posee propiedades similares al $\bullet\text{NO}$, tiene otras diferentes que, en ciertos casos, son mejoradas. Como se detalló en la sección 1.5, HNO ha demostrado tener aplicaciones terapéuticas en distintos sistemas biológicos, desde tratamiento del alcoholismo, hasta enfermedades cardiovasculares y cáncer. [14, 35, 36, 54, 170, 172, 173, 185, 355] Actualmente, hay datos públicos sobre los donantes de HNO que se están evaluando en ensayos clínicos para tratar la insuficiencia cardíaca. Entre ellos, el Cimlanod (BMS-986231, CXL-1427) es un donante de segunda generación que libera HNO mediante una descomposición química dependiente del pH. Al entrar en contacto con el pH neutro del torrente sanguíneo, genera efectos lusitrópicos e inotrópicos positivos, además de vasodilatación.

Dado su potencial, nuestro grupo presentó recientemente un método para generar HNO sin necesidad de utilizar líquidos ni condiciones extremas. El método consistió en la reacción entre una base gaseosa, tal como NH_3 , y ácido de Piloty (un dador de HNO). Los derivados del ácido de Piloty (PA) [356–358] se destacan por su mecanismo de liberación en dos etapas: primero, la rápida desprotonación de su grupo sulfohidroxámico y, posteriormente, la liberación gradual de nitroxilo cuya velocidad depende del pK_a de cada derivado influenciado por el patrón de sustitución en el anillo. [359] En esta investigación se lograron resultados positivos con respecto a detección de HNO en fase gaseosa tanto de manera directa por el sensor electroquímico y espectrometría de masas como de manera indirecta a través del producto de su dimerización, N_2O . [198] Esta producción simple y controlada de HNO gaseoso abre nuevas posibilidades en la administración de fármacos para tratamientos médicos innovadores. Sin embargo, la presencia de NH_3 posee una desventaja debido a su posible toxicidad; por ello, resultaría apropiada la producción de HNO a partir de $\bullet\text{NO}$ gaseoso y un sólido reductor biocompatible. Sabiendo que cisteína y $\bullet\text{NO}$ reaccionan cuando se encuentran disueltos en una solución acuosa a pH neutro, en este capítulo de tesis estudiaremos la reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso como estrategia para la generación de HNO gaseoso.

La reacción entre cisteína y $\bullet\text{NO}$ en solución acuosa a un pH de 7,4 genera HNO como intermediario.[58] El mecanismo de reacción propuesto inicia con un ataque nucleofílico acoplado a protones (PCNA) del tiol a $\bullet\text{NO}$, mediante una cinética de primer orden en ambos reactivos con una constante $180 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El análisis mediante métodos *ab initio* demostró que mediante un PCNA del tiol al $\bullet\text{NO}$ se produce un radical tionitrito intermediario $\text{RSNO(H)}\bullet$. La descomposición directa de $\text{RSNO(H)}\bullet$ para producir HNO y un radical tiilo $\text{RS}\bullet$ es altamente desfavorable ($>30 \text{ kcal/mol}$); por lo tanto, se espera que el tionitrito reaccione rápidamente con una segunda molécula de $\bullet\text{NO}$, produciendo intermediarios di-NO-tiol o

HNO y RSNO [58]. Finalmente, en exceso de tioles, la vía culminaría con RSSR y N₂O como productos finales.

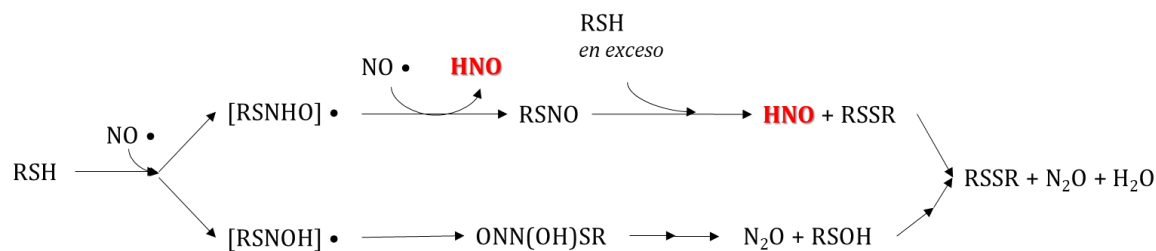


Figura 4.1 Esquema de reacciones propuestas para la reacción en solución entre cisteína y •NO. Referencia [58]

Si la reacción ocurre en solución, resulta razonable pensar que la misma podría tener lugar en condiciones de sólido-gas, generando HNO como intermediario gaseoso.

4.3 Objetivos del capítulo

- Determinar de manera directa e indirecta la formación de HNO a partir de la reacción sólido-gas entre cisteína sólida y •NO gaseoso.
- Identificar los productos sólidos finales de esta reacción.
- Proponer un mecanismo de reacción posible y analizar el rol del H₂O adicionada.
- Analizar si otros compuestos con grupos funcionales -OH pueden llevar a cabo esta reacción.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Detección indirecta de HNO mediante cuantificación de N₂O por FTIR

Bajo estrictas condiciones anaeróbicas (ver la sección 2.1) se evaluó la formación de HNO a partir de la reacción entre cisteína sólida y •NO gaseoso. Como se describió en los capítulos anteriores, el HNO puede cuantificarse de manera indirecta a través de las mediciones del espectro infrarrojo de N₂O, cuyos máximos de absorbancia se encuentran entre 2212 y 2236 cm⁻¹ [360, 361]. Para más detalles sobre la construcción de la curva de calibración de N₂O dirigirse a la sección 3.6.3.

A viales que se encontraban en atmósfera anaeróbica dentro de un tubo de Schlenk se le colocaron 100 mg (825 μmol) de cisteína sólida, a continuación, se añadieron 2 ml (89 μmol) de •NO gaseoso de tal manera de tener una relación 10:1. Luego de 1 hora bajo agitación

magnética, se extrajo el *headspace* de cada uno de los viales y se colocó dentro de la celda para gases del FTIR. Los resultados mostraron una clara diferencia en la producción de N_2O en el caso de la cisteína seca en comparación con cisteína humedecida con 50 μ l de H_2O (Figura 4.2). El blanco de $\bullet NO$ se llevó a cabo mediante la extracción de 2 ml de $\bullet NO$ de balón de generación (ver la sección 2.3.1) y su colocación en la celda para gases del IR.

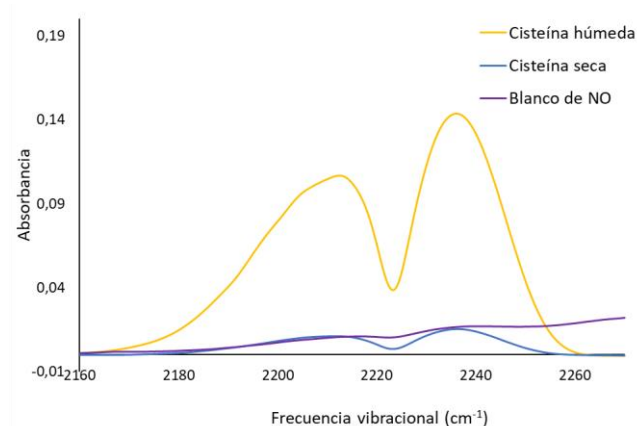


Figura 4.2 Espectro Infrarrojo entre 2212 y 2236 cm^{-1} a modo de comparación entre el experimento sin H_2O agregada, con H_2O agregada y el blanco de $\bullet NO$.

Dado que la humedad (H_2O) parece ser un requisito para el progreso de la reacción entre la cisteína sólida y el $\bullet NO$ gaseoso, se evaluó si el contenido de H^+ u OH^- tiene algún efecto sobre la reacción. Para ello, se llevó a cabo la reacción en presencia de 50 μ l H_2O de calidad milliQ, $NaOH$ 0.1 M, H_3PO_4 0.1 M y buffer fosfato 10mM pH 7.2. Luego de 1 hora de reacción bajo agitación magnética se obtuvieron las cantidades de N_2O (μ mol) que se muestra en la figura 4.3.

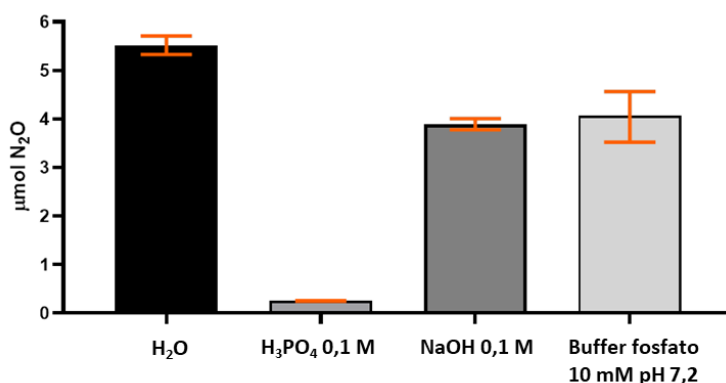


Figura 4.3 Producción de N_2O durante 1 hora de reacción bajo agitación magnética en presencia de H_2O , H_3PO_4 0.1 M, $NaOH$ 0.1 M y buffer fosfato 10 mM pH 7.2. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de tres experimentos independientes.

Aquí puede observarse que la adición de ácido desfavorece completamente la producción de N_2O y, por tanto, la formación de HNO . Sin embargo, no se observan diferencias apreciables entre los rendimientos de este producto en las condiciones en las que se humedeció con buffer fosfato 10 mM pH 7.2, NaOH 0.1 M o H_2O . Dados estos resultados, los siguientes análisis se realizaron en presencia de H_2O . Se evaluó la producción de N_2O en función del tiempo de contacto entre la cisteína sólida y el $\bullet\text{NO}$ gaseoso en presencia de humedad (Figura 4.4). El experimento se realizó de forma similar al anterior, manteniendo los viales dentro del tubo Schlenk anaeróbico durante diferentes períodos de tiempo.

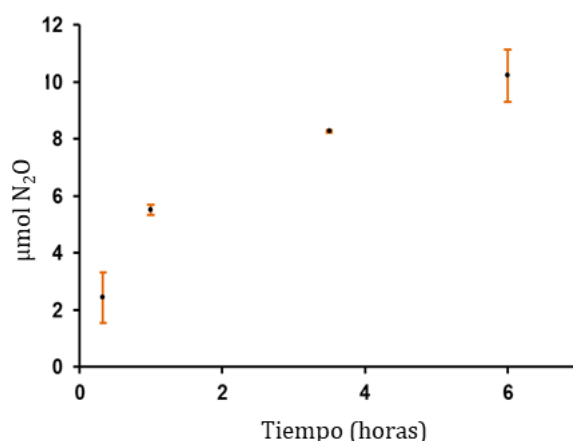


Figura 4.4 Producción de N_2O en función del tiempo para la reacción entre cisteína (s) y $\bullet\text{NO}$ (g) en presencia de H_2O . Cada punto indica el promedio (micromoles) de N_2O producido. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Estos resultados indican que N_2O es un producto final de la reacción sólido-gas entre cisteína y $\bullet\text{NO}$ gaseoso, cuya producción se incrementa con el avance del tiempo de contacto entre ambos reactivos. Se alcanza un rendimiento máximo de N_2O de $10,22 \pm 0,92 \mu\text{mol}$ a las 6 horas. Cabe aclarar que a tiempos mayores a los mostrados se observó una disminución en la cantidad de N_2O detectado, probablemente, debido a que el sistema comienza a perder de gas a través el septum.

4.4.2 Detección directa de HNO por atrapamiento con meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) soluble en agua (Mn(III)TEPyP)

Como se describió en capítulos anteriores, las porfirinas de Mn(III) permiten la discriminación entre HNO y $\bullet\text{NO}$. La reacción entre estas porfirinas y HNO se evidencia por un desplazamiento de la banda de Soret de 30 nm en espectroscopia UV-visible, mientras que la reacción con $\bullet\text{NO}$ es muy lenta.

Para llevar a cabo la detección de HNO por esta técnica, se utilizó un sistema (ver sección 4.6) que permitió dirigir la mezcla gaseosa generada como producto de la reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso hacia una solución de la porfirina Mn(III)TEPyP. El sistema consistió en la aplicación de un flujo de $\bullet\text{NO}$ gaseoso a través de cisteína sólida. De esta manera, se generó el contacto entre ambos reactivos, la generación de HNO y el movimiento del flujo de gases hacia la solución de porfirina. Sin embargo, el HNO es una especie altamente reactiva con $\bullet\text{NO}$, consigo mismo y con tioles a una velocidad elevada ($k \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo que deben adaptarse las condiciones para minimizar estas reacciones y posibilitar la identificación. Si bien, se sabe que el HNO interactúa con tioles generando una hidroxilamina ligada al tiol, otros estudios demostraron que es posible detectar tanto HNO como N_2O aún en presencia de un exceso de tioles [112]. Además, el HNO generado se sumerge en una mezcla gaseosa que puede contener un exceso de $\bullet\text{NO}$. Como es bien sabido, el HNO reacciona con el $\bullet\text{NO}$ para dar N_2O y nitrito,[33] por lo que esta reacción entraría en competencia con la porfirina de nuestro sistema de detección de HNO. Para disminuir las reacciones que consumen al HNO, se modificó el sistema mediante la dilución de la mezcla gaseosa en la que se encuentra, utilizando flujos de nitrógeno (N_2) gaseoso de velocidades variables, desde lentas hasta más rápidas. El desafío principal fue identificar una velocidad de flujo en la que el atrapamiento del HNO fuera viable. En este contexto, se plantea que el HNO se forma inicialmente como un intermediario, que puede ser atrapado mediante porfirinas de manganeso (Mn) o dimerizar para generar N_2O .

Luego de 35 minutos de flujo constante, la aparición de la banda a 434 nm correspondiente al complejo nitrosilado Mn(II)- $\bullet\text{NO}$ se observó simultáneamente con la disminución de la banda a 462 nm (Figura 4.5). Este tiempo, entonces, es el necesario para lograr una acumulación de complejo medible por esta técnica, el cual se encuentra influenciado por varios factores, ya sean el coeficiente de absorptividad molar del complejo formado, las reacciones que compiten con el atrapamiento, etc. Este resultado proporciona la primera evidencia directa de la formación de HNO a partir de la reacción sólido-gas entre cisteína(s) y $\bullet\text{NO}$ (g).

Cabe aclarar que no se observaron cambios en el espectro de la porfirina TEPyP al aplicar $\text{N}_2/\bullet\text{NO}$ sin la presencia de cisteína sólida ni al aplicar flujo de N_2 (sin $\bullet\text{NO}$) en el sistema conteniendo cisteína sólida.

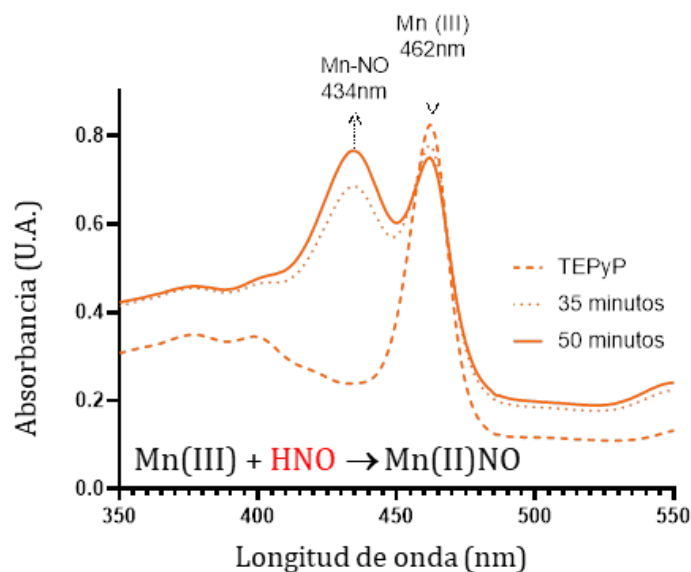


Figura 4.5 Espectros UV-visible de la porfirina TEPyP en buffer fosfato pH 7.25 burbujeado con el flujo de gas del sistema mostrado en la figura 4.11. La banda de máxima absorbancia en 434 nm corresponde al complejo nitrosilado Mn(II)-NO.

4.4.3 Análisis de productos sólidos por FTIR

Dado que el producto nitrogenado observado N_2O está más reducido que $\bullet NO$, se puede suponer que el otro producto es la forma oxidada de la cisteína, la cistina [58, 237]. A continuación, se analizó el sólido por FTIR tras la reacción con $\bullet NO$ (Figura 4.6). Para ello, una vez finalizada la reacción, el sólido se colocó al vacío para eliminar todos los gases, incluido el $\bullet NO$ y la humedad. Se sabe que la cisteína puede oxidarse a cistina en presencia de humedad y aire, por lo que debe evitarse esta oxidación. A continuación, se hicieron pastillas de KBr para la medición FTIR. Un control pertinente es el blanco de cisteína sin la adición de $\bullet NO$. De este modo, es posible detectar si se produce oxidación por oxígeno.

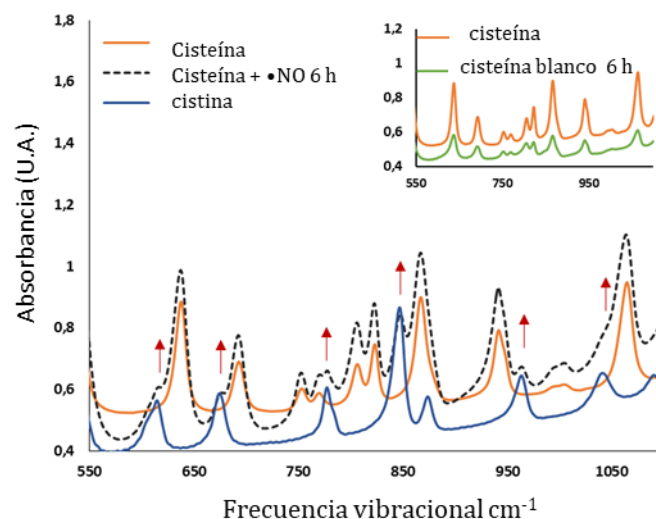


Figura 4.6 Espectroscopía FTIR en pastillas de KBr de cisteína sólida, tras la reacción con $\bullet\text{NO}$, en comparación con los espectros de la cisteína y la cistina. *Inserto*. Comparación del control (cisteína blanco 6 h) con el espectro de la cisteína sin reaccionar.

La figura 4.6 muestra que el espectro de la cisteína tras reaccionar con $\bullet\text{NO}$ contiene bandas tanto de cisteína como de cistina. Las flechas rojas indican los picos de absorbancia correspondientes a la cistina, que aparecen en el espectro del sólido tras reaccionar con $\bullet\text{NO}$. Por otra parte, la cisteína en la reacción de control no se oxidó. Por lo tanto, a partir de estos resultados podemos confirmar que la cisteína es oxidada por $\bullet\text{NO}$, dando cistina como producto sólido final.

4.4.4 Nitrosocisteína como intermediario

La adición de $\bullet\text{NO}$ gaseoso a cisteína húmeda genera un cambio de color instantáneo del sólido que va desde blanco, sin reaccionar, a rojizo, luego de reaccionar con $\bullet\text{NO}$ (Figura 4.7, A). Posteriormente, esta coloración se va desvaneciendo hasta que a los pocos minutos vuelve a una coloración blanca.

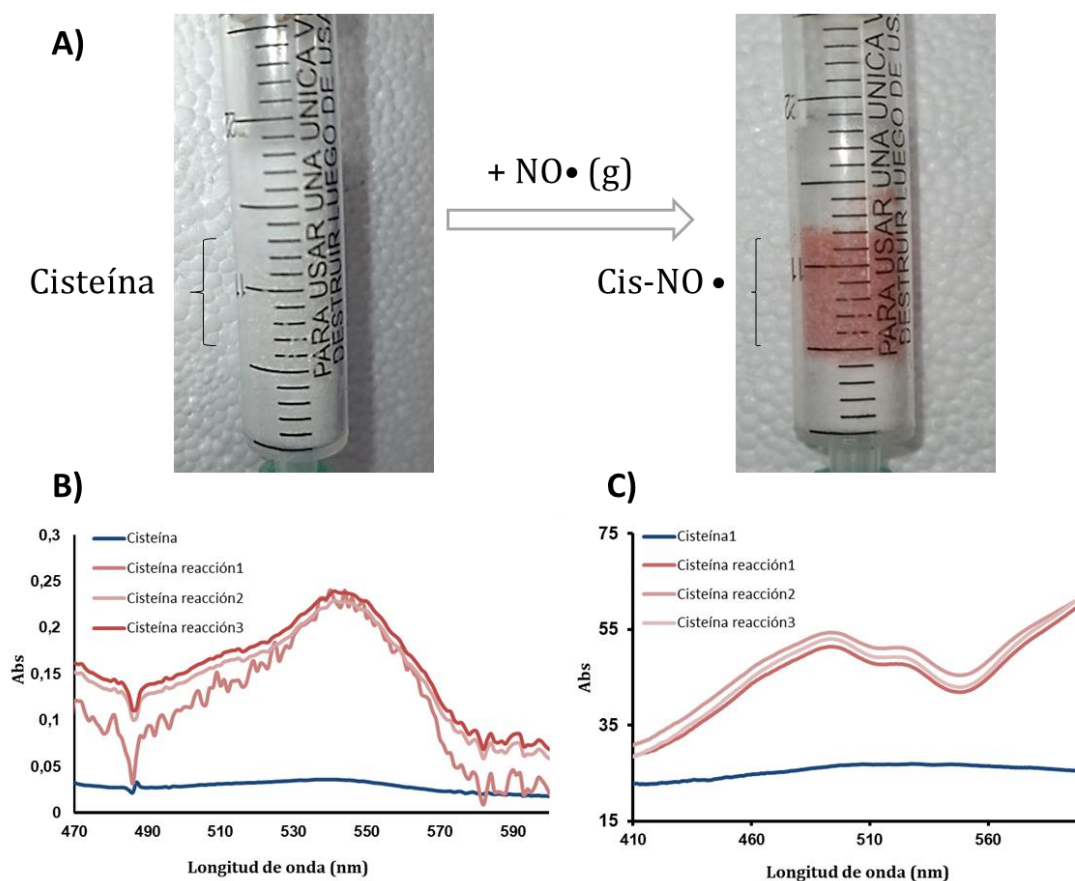


Figura 4.7 Fotos del cambio de color que toma la cisteína sólida húmeda luego de estar en contacto con $\bullet\text{NO}$ gaseoso A). Espectro del sólido rojizo, disuelto en H_2O por UV-visible B) y sin disolver por reflectancia difusa C).

Se llevó a cabo el análisis por espectroscopía UV-visible del sólido rojizo, el cual fue disuelto en H_2O milliQ. Los resultados obtenidos revelaron un espectro con un máximo en 540 nm (Figura 4.7, B). Los S-nitrosotioles presentan bandas de absorbancia débiles en el rango UV (330-340 nm) y visible (450-550 nm). Dependiendo del ángulo diedro formado por el enlace S-N, su color puede variar de verde a naranja/rosa [362]. De manera paralela, en colaboración con el Dr. Diego Onna, se obtuvieron los espectros del sólido mediante la técnica de reflectancia difusa. Las diferencias espectrales entre el sólido blanco (sin reaccionar) y el sólido rojizo son evidentes (Figura 4.7, C), además, las bandas de absorción tienen máximos cercanos a los correspondientes a los espectros UV-visible. Estos resultados permiten proponer que el mecanismo de reacción incluye la formación de un nitrosotiol (nitrosocisteína, Cis-NO).

4.4.5 Análisis del mecanismo de reacción entre cisteína (s) y NO (g)

La reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso requiere de la presencia de humedad, ya que en situación anhidra o de humedad ácida (H_3PO_4) no se observó la formación de HNO. Por lo tanto, el mecanismo propuesto iniciaría con la asistencia de agua, que podría darse mediante un ión Zundel (H_5O_2^+ , figura 4.8). La necesidad de incorporar las moléculas de H_2O en este tipo de reacciones PCNA queda implícita al analizar las barreras energéticas en ausencia y presencia de las mismas. En la figura 4.8 se muestra el diagrama de los niveles de energía involucrados en la etapa de participación del ión Zundel en un trabajo hecho en solución sobre tiofenol con $\bullet\text{NO}$ en el cual se observó que la reacción es favorable en presencia de iones Zundel (figura 4.8), mientras que es desfavorable en ausencia de estas especies. El estado de transición tiene una frecuencia imaginaria de $510,03i\text{ cm}^{-1}$, y el movimiento nuclear asociado a este modo es el movimiento concertado de los átomos de hidrógeno del grupo S-H al agua y del agua al nitrógeno de la molécula de $\bullet\text{NO}$, formando el enlace N-H. A partir de esta observación podríamos considerar un efecto similar para el caso de la cisteína.

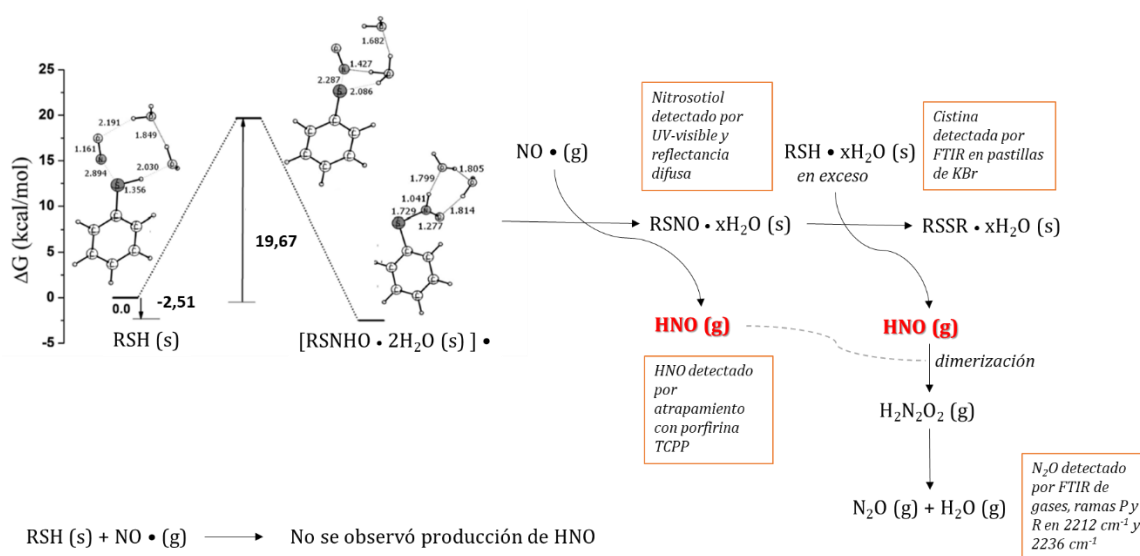


Figura 4.8 Esquema de reacciones propuesto para la reacción entre cisteína sólida y $\bullet\text{NO}$ gaseoso desarrollado en la presente tesis. A la izquierda se muestra el ataque nucleofílico acoplado a protones del RSH al átomo de nitrógeno del $\bullet\text{NO}$, mediado por un ion Zundel ($\text{R} = \text{Ph}$). Los resultados se expresan en kcal/mol. Adaptado de la referencia [58].

El hecho de que la mezcla de reacción no sea líquida simplificó la detección de los productos finales tanto azufrados (cistina) como nitrogenados (N_2O) mediante el análisis de las partes sólida y gaseosa por separado. La identificación del producto azufrado final cistina

(disulfuro de la cisteína, RSSR en el esquema de la Figura 4.8), se hizo a través de la obtención de los espectros FTIR de pastillas de KBr armadas con los sólidos que ya reaccionaron, en vez de la caracterización preliminar por RMN realizada anteriormente [58]. Por otro lado, el *headspace* que se encontraría enriquecido en N_2O , debido a su baja solubilidad, permitió confirmar que este gas es el producto nitrogenado final de la reacción.

El interés principal en esta reacción radica en la obtención de HNO en un sistema que excluye el H_2O como disolvente. La confirmación de la generación de HNO se logró por atrapamiento con porfirinas de Mn que se utilizan como sensor colorimétrico de esta especie, evidenciado como un corrimiento en la banda de Soret por espectroscopia UV-visible. Además, se optimizó el sistema para reducir las reacciones que consumen HNO (reacción con $\bullet NO$ o consigo mismo) mediante la dilución de la mezcla gaseosa con flujos de N_2 de distintas velocidades con el fin de encontrar una velocidad adecuada para atrapar el HNO.

Por otra parte, al mezclar cisteína sólida húmeda con $\bullet NO$ gas, se observó una coloración rojiza transitoria. Este sólido mostró una banda de absorción, UV-visible de solución y reflectancia difusa del sólido, con un máximo en 540 nm, característica de los nitrosotioles (RSNO). Por lo tanto, en el mecanismo se incluye la formación de nitrosotioles, particularmente nitrosocisteína. Posteriormente, podría tener lugar una reacción conocida que se da entre los nitrosotioles y un exceso de tioles (cisteína) en la que se genera una segunda molécula de HNO y el disulfuro correspondiente (RSSR), que en este caso sería cistina. Si bien hasta nuestro conocimiento no existen pruebas que indiquen la formación de nitrosotioles a partir de la reacción directa entre tioles y $\bullet NO$ en condiciones fisiológicas, su formación debe estar mediada por otro proceso redox. Además, como se detalló en la introducción, el HNO generado podría reaccionar con cisteína (un tiol), sin embargo, al no encontrarse ambos reactivos inmersos en una solución, lo más probable es que el mismo escape del sólido y dimerice o reaccione con $\bullet NO$. En conclusión, el mecanismo propuesto para la reacción sólido-gas entre cisteína y $\bullet NO$ no solo respalda, sino que complementa los hallazgos previos obtenidos en solución.

4.4.6 Otros compuestos sólidos como candidatos a producir HNO a partir de la reacción con $\bullet NO$.

Luego, se comprobó la capacidad de otros sólidos económicos para generar N_2O a partir de la reacción con $\bullet NO$. Es sabido que tanto la cisteína como el ácido ascórbico son capaces de generar HNO a través de la reducción de $\bullet NO$ en solución [57, 58, 237], por lo que se

incluyeron en el presente estudio. Los fenoles restantes son las versiones metaladas de la naringenina y la naringina (ver Figura 4.9). Estos compuestos, que poseen propiedades antioxidantes, forman parte de un grupo de polifenoles conocidos como flavonoides y se encuentran principalmente en los cítricos. La naringina puede extraerse fácilmente mediante una mezcla de agua y etanol de los subproductos de la producción industrial de zumo de cítricos en nuestro país, en particular de las cáscaras de pomelo [363]. La naringenina es naringina, con los residuos de glucosa y ramnosa eliminados mediante una reacción de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico. Los complejos metálicos de estos compuestos se obtienen por incubación con soluciones de metales de transición a pH neutro [364].

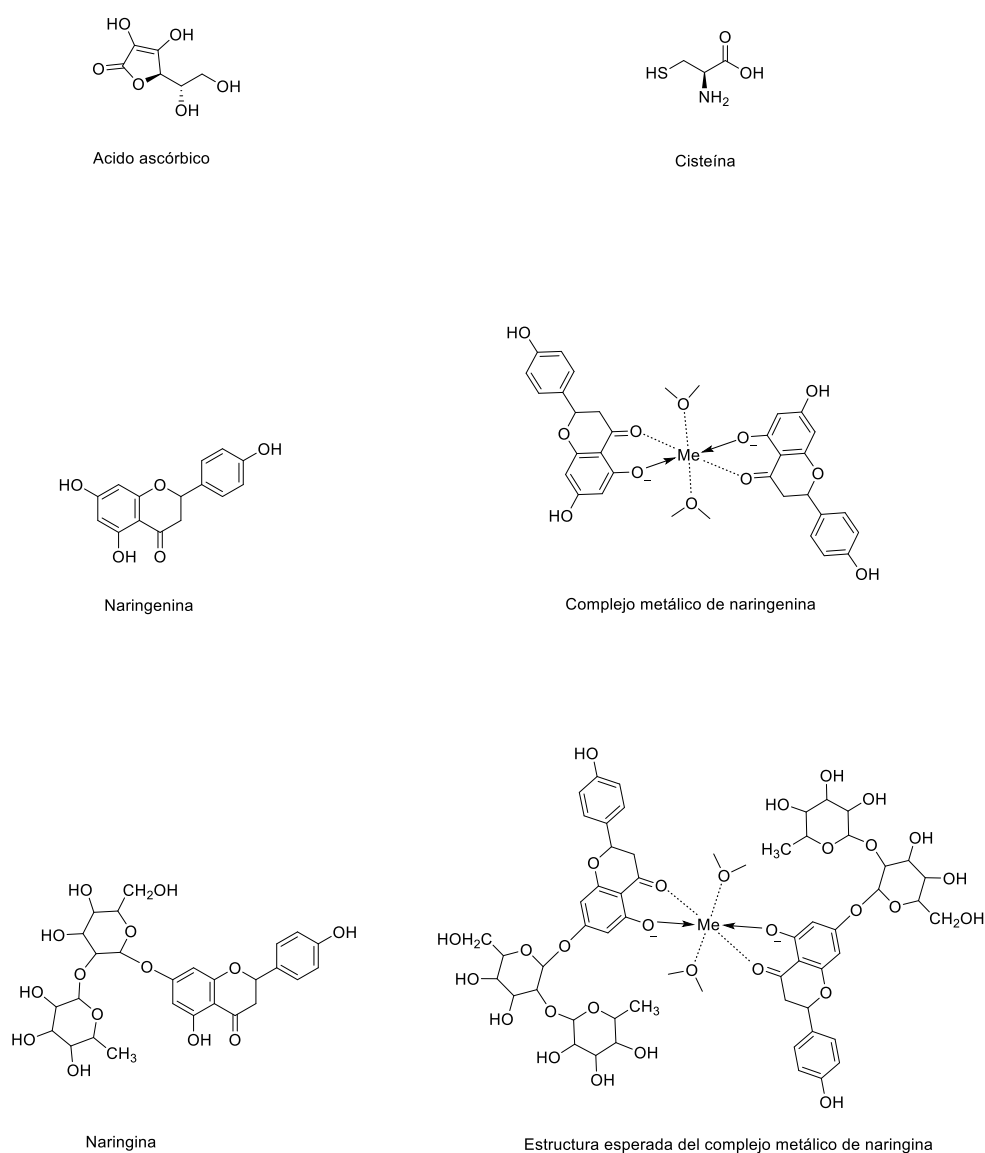


Figura 4.9 Estructura del ácido ascórbico, cisteína, naringenina, naringina y naringenina metalada. Además, se muestra la estructura esperada del complejo metalado de naringina.

Todos los experimentos se realizaron en presencia de H₂O, en línea con el experimento anterior. La proporción entre sólidos y •NO se mantuvo en 10:1 y la agitación por 24 horas, con la excepción del ácido ascórbico, que se preparó en una proporción 100:1 y se mantuvo en agitación durante dos días. Los resultados mostrados en la Figura 4.10 permiten realizar una comparación de la producción de N₂O entre la cisteína, el ácido ascórbico y los flavonoides metalados. Todos los compuestos produjeron N₂O, aunque en menor cantidad que la obtenida con cisteína como sólido reductor en las mismas condiciones. El rendimiento de estos flavonoides fue entre 2.2% y 3.5% con respecto al •NO agregado, mientras que el rendimiento obtenido con cisteína como reductor fue de 18.4%. Con respecto al ácido ascórbico, se obtuvo un rendimiento de 2.3% con una relación 100:1 y 2 días de reacción. En conclusión, de manera análoga, podría proponerse al HNO como intermediario en la reducción heterogénea del •NO gaseoso con sólidos ácido ascórbico y flavonoides metalados con un bajo rendimiento.

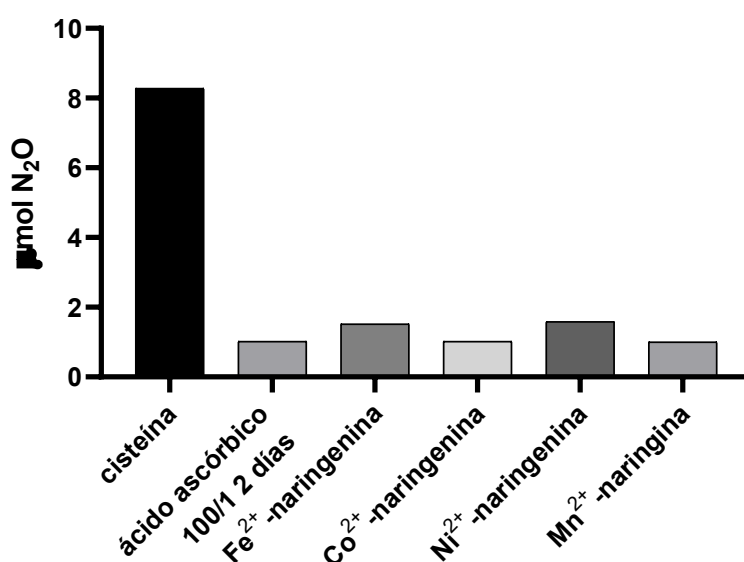


Figura 4.10 Evaluación de otros sólidos como candidatos para producir HNO gaseoso a partir de la reacción sólido-gas. Todos los experimentos se realizaron a una relación 10/1 (sólido/•NO), a excepción del correspondiente al ácido ascórbico.

Al analizar los espectros FTIR de los sólidos mediante pastillas de KBr no se pudieron observar diferencias entre los sólidos sin reaccionar y los sólidos que reaccionaron, probablemente debido a que estas diferencias se encuentran por debajo del límite de detección de esta técnica. También se llevó a cabo la reacción entre los flavonoides no

metalados y el •NO gaseoso. Sin embargo, no se detectaron señales de N₂O por FTIR cuando se analizó el *headspace* de los tubos de reacción. Esto puede explicarse a través del conocimiento existente sobre la capacidad de este tipo de coordinación para reducir el p*K*_a de los fenoles cercanos en aproximadamente 3 unidades [365, 366]. Por lo tanto, al ser el enlace H-O más débil (y al mismo tiempo la base conjugada más estable), esto hace que la reacción de ataque nucleofílico acoplado a transferencia de protón avance más hacia la formación de HNO [57] cuando se tienen complejos metálicos de los flavonoides. Como se mencionó anteriormente, estos complejos metálicos pueden obtenerse de manera fácil y económica a partir de productos naturales, lo que convierte a esta fuente de HNO en una de gran interés. [364]. Se necesitan más estudios para determinar las mejores condiciones para la producción y detección del HNO mediante la reacción de estos flavonoides metalados y •NO gaseoso.

4.5 Conclusiones

El presente capítulo estudió un método para la generación heterogénea de HNO gaseoso mediante la reacción de •NO gaseoso con diversos sólidos. Los resultados más efectivos en términos de generación de HNO se obtuvieron con la cisteína, ya que el rendimiento de N₂O fue mayor y se produjo una detección directa de HNO por atrapamiento con porfirinas de Mn(III). Además, se ha comprobado que los flavonoides pueden actuar como sólidos reductores que resultan rentables y biocompatibles, al igual que la cisteína y el ácido ascórbico. Estos compuestos presentan la ventaja adicional de ser respetuosos con el medio ambiente, ya que se obtienen como subproductos de la producción de jugos de cítricos.

El sistema sólido-gas se caracteriza por no emplear disolventes, permitiendo su administración por inhalación. En el caso de HNO, la administración podría realizarse mediante la fijación de un elemento que contenga uno de estos sólidos (como los cartuchos preparados en las jeringas en el presente capítulo, Figura 4.11), adicionando también un filtro para permitir el paso de los gases. En conclusión, se expuso un método económico y biocompatible que posee un extenso potencial en aplicaciones médicas.

4.6 Sección experimental: sistema para la detección de HNO

El HNO reacciona con las porfirinas de Mn, como la meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il) porfirina de manganeso (III) soluble en agua (Mn(III)TEPyP), para dar lugar al complejo nitrosilado Mn(II)-•NO, que provoca un desplazamiento de 30 nm en la banda de máxima intensidad o banda de Soret (por su descubridor Jacques-Louis Soret) [90, 128, 367, 368]. Además, estas porfirinas reaccionan con •NO con bastante lentitud, lo que las convierte en una herramienta útil para la detección de HNO. Esta reacción se utilizó para detectar HNO a partir de la reacción sólido-gas, como se muestra en la Figura 4.11. El •NO se generó en (1) anaerómicamente mediante la adición gota a gota de agua desgasificada a una mezcla de 4 g de NaNO₂, 8,5 g de FeSO₄ y 8,5 g de NaBr [272]. Esta mezcla gaseosa se hizo burbujear en la solución de NaOH en (2) para eliminar las impurezas de nitrógeno, como el NO₂. A continuación, se hizo pasar el gas a través de la cisteína sólida húmeda contenida en una jeringa, entre dos trozos de algodón (3). Por último, se burbujeo la mezcla gaseosa en la solución de porfirina para la detección UV-visible en (4) (figura 4.11). Las mediciones se registraron con un espectrofotómetro HP/Agilent 8453 en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso óptico y utilizando como blanco las respectivas soluciones buffer. Los espectros de la porfirina TEPyP en sus variantes Mn(III), Mn(II) y Mn(II)-•NO se muestran en la Figura 4.12.

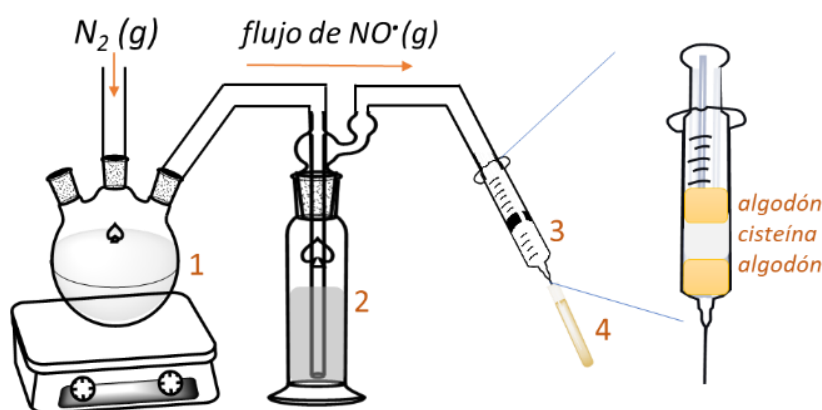


Figura 4.11 Sistema para la detección de HNO gaseoso. El sistema consta de cuatro partes: (1) Generador de •NO, (2) Trampa de NaOH para eliminar los óxidos de nitrógeno contaminantes, (3) Jeringa con filtro de algodón armado con cisteína sólida en su interior, (4) Solución de porfirina Mn(III) TEPyP.

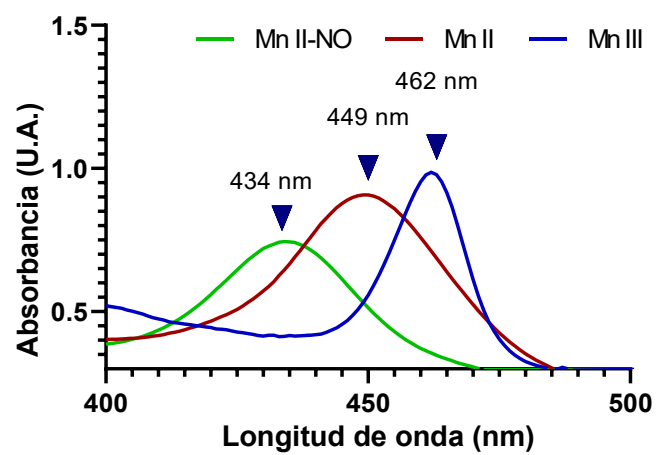


Figura 4.12 Espectros de la porfirina TEPPyP en sus variantes Mn(III), Mn(II) y Mn(II)- •NO.

Capítulo 5

Generación de HNO en fase
gaseosa en la reacción entre
sulfuro de hidrógeno y óxido
nítrico en presencia de
amoníaco

Capítulo 5. Generación de HNO en fase gaseosa en la reacción entre sulfuro de hidrógeno y óxido nítrico en presencia de amoníaco

5.1 Resumen del capítulo

El H_2S , conocido inicialmente solo como un contaminante ambiental, ha sido reconocido en las últimas décadas como un gasotransmisor, junto con el $\bullet\text{NO}$, CO y, más recientemente, el HNO . Su papel fisiológico, especialmente en el sistema cardiovascular, ha despertado gran interés en la comprensión de su reactividad, especialmente en lo que respecta a su interacción con $\bullet\text{NO}$.

En una investigación reciente de nuestro grupo, se examinó la reacción entre H_2S y $\bullet\text{NO}$ en solución, confirmando que se produce HNO de una manera dependiente del pH. En este estudio se observó que los pH más altos la favorecen, lo que sugiere que la especie reactiva es HS^- en lugar de H_2S . Basándonos en esos resultados, en este capítulo de tesis exploramos si esta reacción también ocurre en condiciones gaseosas y anhidras. En primera instancia, se analizó la mezcla de H_2S y $\bullet\text{NO}$ en condiciones estrictamente anhidras y anaeróbicas, evitando así interferencias del O_2 y H_2O . Los resultados demostraron que no se produce N_2O , lo que descarta también la formación de HNO como intermediario. Posteriormente, se estudió el efecto de agregar vapores de H_2O , HCl y NH_3 en la producción de N_2O , observando que este solo se genera en presencia de NH_3 , mientras que la adición de H_2O o HCl no lo produce. Aunque en solución acuosa H_2S y NH_3 formarían hidrosulfuro de amonio (HSNH_4) mediante una reacción ácido-base, en fase gaseosa estos compuestos establecen un complejo estable débilmente unido por medio de un enlace N-H entre el nitrógeno del amoníaco y un hidrogeno del H_2S , como se evidencia en las superficies de energías potenciales para las etapas de reacción.

Los resultados de esta tesis complementan las investigaciones previas sobre la reacción en solución y respaldan la influencia positiva del pH básico en el proceso.

Palabras clave: sulfuro, amoníaco, gases, nitroxilo

5.2 Introducción

Los gasotransmisores son una subfamilia de moléculas señalizadoras que incluyen monóxido de carbono (CO), sulfuro de hidrógeno (H_2S), $\bullet\text{NO}$ y más recientemente incluido, el HNO . Estos pequeños gases, que suelen entrecruzar su producción y función, llevan a cabo

sus tareas de forma única, diferenciándose de las moléculas de señalización clásicas de las células. Entre ellos, el H_2S es conocido por su olor, que también se puede apreciar en los huevos podridos, y su elevada toxicidad debida principalmente a la inhibición de la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.[369] Hasta hace poco, el H_2S se consideraba exclusivamente un gas tóxico y peligroso para el medio ambiente. Sin embargo, durante los últimos años se acumularon numerosas evidencias que le confieren un importante rol fisiológico, principalmente en el sistema cardiovascular. [247, 370]

Dado que se ha comprobado que la reducción de $\bullet\text{NO}$ por tioles [58] y otros reductores suaves genera HNO , tanto *in vitro* [57, 230, 231, 245] como *in vivo* [159], diversos estudios han planteado la posibilidad de que el HNO sea un intermediario de la reacción entre el H_2S y el $\bullet\text{NO}$. [59, 60, 371] Yong *et al.* aplicaron conjuntamente NaHS (dador de H_2S) y nitroprusiato de sodio (SNP , dador de $\bullet\text{NO}$) a cardiomiocitos de rata, [371] mostrando que producían un aumento de la eficacia de la contracción y relajación celular, de las amplitudes de los transitorios de calcio y del nivel de calcio en reposo. En cambio, estos resultados no se obtuvieron cuando se utilizó un único dador, ya sea NaHS o SNP . Esto sugiere que los efectos observados se debieron probablemente a la formación de otra especie, como el HNO , con un efecto específico. Además, Eberhardt *et al.* propusieron que una vía de señalización neuroendocrina HNO-TRPA1-CGRP dependiente de HNO generado por reacción entre H_2S y $\bullet\text{NO}$. [59] Ellos demostraron que la producción de estos dos gasotransmisores se localiza en el canal A1 del potencial receptor transitorio (TRPA1), el cual solo puede ser activado por altas concentraciones de H_2S , pero no por $\bullet\text{NO}$. Sin embargo, la mezcla de estos dos gases provoca una activación similar a la generada por sal de Angeli, dador de HNO . Esta activación ocurre mediante la formación de enlaces disulfuro aminoterminales, lo que provoca una afluencia sostenida de calcio y la liberación de CGRP , y como consecuencia, una vasodilatación local y sistémica. Este trabajo también incluye mediciones de HNO con el sensor electroquímico para esta reacción, lo que demuestra que la misma puede ocurrir en condiciones fisiológicas. Además, un hallazgo reciente ubicó al H_2S como un modulador en la interconversión no enzimática $\text{HNO}/\bullet\text{NO}$ en *Arabidopsis thaliana* [43].

Finalmente, desde un punto de vista químico, el grupo llevó a cabo el estudio de la reacción anaeróbica en solución entre H_2S y $\bullet\text{NO}$, [237] analizando la influencia del pH de la solución sobre las constantes de velocidad efectivas (k_{eff}) entre H_2S ($\text{p}K_{a1,2} = 7.0$ y 12) y $\bullet\text{NO}$. Se confirmó una fuerte dependencia del valor de las constantes de velocidad con el pH, siendo máxima cuando la especie predominante es HS^- (Tabla 5.1). [41] En ese contexto, se propuso que la reacción es de primer orden y procede por un mecanismo directo de transferencia de un electrón pasando por HNO como intermediario y culminando en N_2O y

NO_2^- . Alternativamente, podría producirse un ataque nucleofílico acoplado a protones de la especie HS^- sobre $\bullet\text{NO}$, similar al proceso observado en la reacción de $\bullet\text{NO}$ con alcoholes y tioles. [57, 58]

Tabla 5.1 Constantes de velocidad, k_{eff} , para la reacción entre H_2S y $\bullet\text{NO}$ a diferentes valores de pH .[41].

pH	$k_{\text{eff}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}) \times 10^{-3}$
5,10	<0,1
6,05	1,1
7,38	6,6
7,40	6,3
9,01	5

Algo importante a destacar es que las constantes de velocidad efectivas incluyen tanto la velocidad de formación de HNO como la de decaimiento (reacciones de dimerización y reacción con $\bullet\text{NO}$). Con el objetivo de arribar a un valor de constante de formación de HNO más cercano al real, también se estudió la reacción entre H_2S y $\bullet\text{NO}$ mediante cálculos de mecánica cuántica y simulaciones de mecánica estadística Monte Carlo.[237] Para ello, se analizaron las geometrías optimizadas y las energías libres de Gibbs involucradas en cada uno de las etapas de la reacción, confirmando que el mecanismo más probable podría incluir la reacción entre la especie HS^- y el dímero de $\bullet\text{NO}$, $(\text{NO})_2$ (Figura 5.1, A y B). La interacción con la especie HS^- produciría un acortamiento de las distancias N-N, lo que se traduce en una estabilización de los reactivos de 6 Kcal. Tras esta interacción, HS^- efectúa un ataque nucleofílico a uno de los $\bullet\text{NO}$, el mismo tiempo que dona un protón y un electrón al otro $\bullet\text{NO}$, en un estado de transición (ET) con una barrera energética de 12 kcal. Finalmente, culmina con la formación de HNO y a una especie SNO^- cargada negativamente (ecuación 5.1), lo que se traduce en una estabilización energética de 3 kcal con respecto a los reactivos separados. (figura 5.1, B).



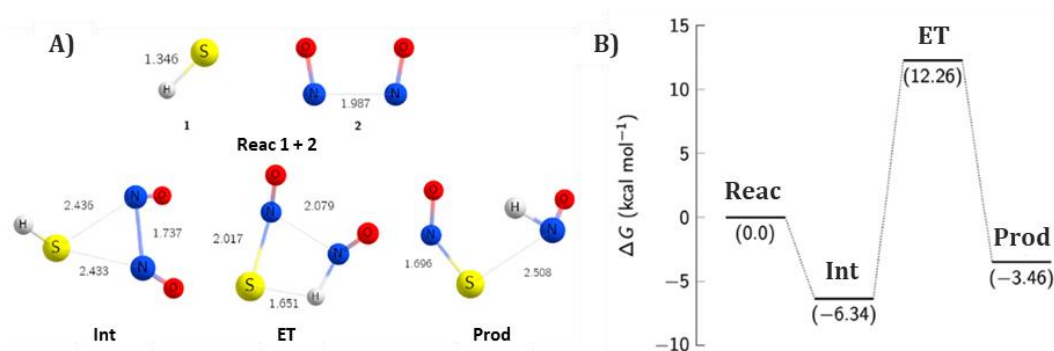


Figura 5.1 **A)** Energías optimizadas y **B)** Energía libre de Gibbs, en kcal mol⁻¹ para la reacción de HS⁻ con (NO)₂. Figura adaptada de la referencia [237].

Este proceso contrasta con la hipótesis propuesta por Cortese-Krott *et al.* quienes sugirieron que el producto primario de la reacción directa entre H₂S y •NO es el nitropersulfuro (SSNO⁻) [372]. SSNO⁻ es resistente a los tioles y a la cianólisis, dona eficazmente azufre y/o azufre y •NO, y disminuye potentemente la presión arterial. Sin embargo, otros grupos señalaron que las propiedades del producto observado no se corresponden con lo que se conoce sobre el SSNO⁻, sugiriendo la formación de HSNO.[226, 373] En este contexto, estudios recientes han intentado resolver esta controversia investigando las reacciones de transulfuración en las que el •NO se transfiere de una especie a otra (RSNO + R'SH ⇌ R'SNO + RSH). En un enfoque mecanístico, Olabe *et al.* observaron que, una vez consumido todo el reactivo RSNO inicial, comenzaba la liberación de •NO.[374] Esta característica es coherente con que el producto amarillo observado sea SSNO⁻ y no HSNO, que tiene una vida media de sólo unos segundos. Además, los resultados de RMN ¹⁵N apoyan la asignación de SSNO⁻, lo que lleva a la conclusión de que el HSNO actúa como intermediario en la reacción de transnitrosación y es un precursor del SSNO⁻. [374]

Por lo tanto, la generación de HNO en la reacción entre H₂S y •NO, es altamente competitiva con otras reacciones que ocurren en paralelo, lo que demuestra su enorme relevancia biológica. Sin embargo, aunque se trata de moléculas gaseosas, los estudios se han realizado siempre en disoluciones acuosas, por lo que la bibliografía disponible sobre la reacción entre •NO y H₂S en fase gaseosa es prácticamente inexistente. En este capítulo se abordará la reacción entre estos dos gases puros y secos, analizando el efecto de agregar oxígeno, vapor de agua, especies básicas, como NH₃, o ácidas, como HCl.

5.3 Objetivos del capítulo

- Evaluar la formación de HNO a partir de la reacción entre H₂S y •NO gaseosos y secos de manera indirecta mediante mediciones de N₂O, el producto de su dimerización.

- Determinar el efecto en la formación de N_2O al agregar O_2 y vapores de H_2O , NH_3 y HCl .
- Evaluar mediante herramientas computacionales las geometrías optimizadas y las energías involucradas en los pasos de reacción propuestos.

5.4 Resultados y discusión

4.4.1 Reacción entre H_2S (g) y $\bullet\text{NO}$ (g) en presencia de aire y vapor de H_2O

Se registraron los espectros de espectroscopía FTIR de 1ml de cada gas en la celda para gases herméticamente sellada que impide la entrada de aire (para más detalles ver la sección “Metodología General”). En cada experimento, se analizó la presencia de señales de $\bullet\text{NO}$, $\bullet\text{NO}_2$ y N_2O (Tabla 5.2), con máximos de absorción en 1903 , 1630 y 2236 cm^{-1} , respectivamente [34, 361, 375]. En primer lugar, se inyectó 1 ml de $\bullet\text{NO}$ libre de oxígeno en la celda, lo que se evidencia por la presencia de la señal en 1903 cm^{-1} y ausencia de la señal en 1630 cm^{-1} (Figura 5.2). El recipiente en el que se almacena el $\bullet\text{NO}$, contiene NaOH mortereado que absorbe el $\bullet\text{NO}_2$ generado durante la síntesis, siendo completa esta absorción luego de 30 minutos.

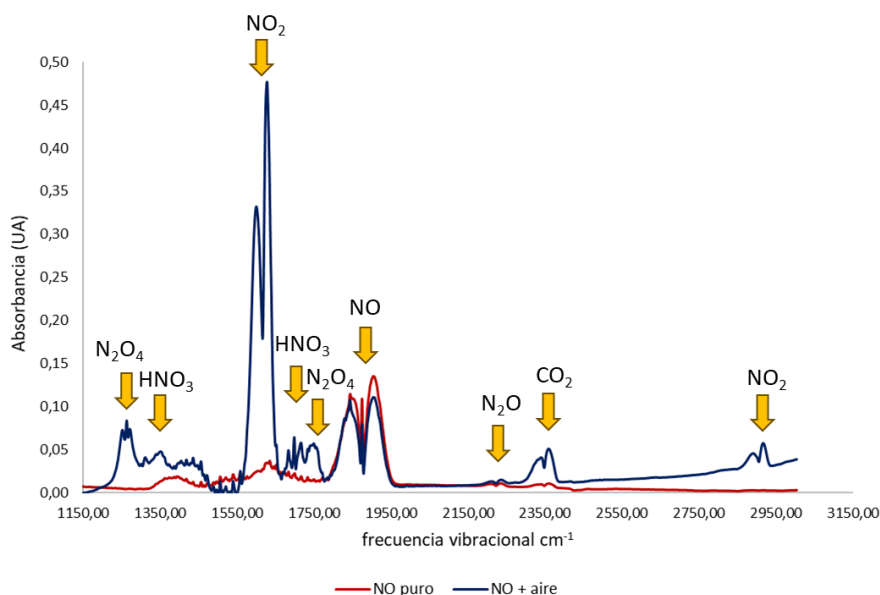


Figura 5.2 Comparación de los espectros FTIR a partir de la inyección de 1 ml de $\bullet\text{NO}$ en la celda para gases. La línea roja corresponde a una muestra de $\bullet\text{NO}$ puro y la línea azul a una muestra de $\bullet\text{NO}$ que se ha contaminado con aire del ambiente.

Como se puede observar en la figura 5.2, el espectro de $\bullet\text{NO}$ puro no debe contener señales correspondientes a otras especies, o deben ser mínimas. Un espectro como el de la línea azul

indicaría el ingreso de aire al balón en el que se almacena el $\bullet\text{NO}$, a la celda para gases o a las jeringas con las que se manipularon los gases. Este análisis se hizo en todos los experimentos para evaluar si las condiciones de anaerobiosis estaban logradas o si se debía cambiar/mejorar algún elemento o técnica empleada.

Si bien el HNO posee señales en el rango IR,[331] es difícil detectarlo mediante esta técnica debido a que habría que acumularlo en la celda para gases donde además de reaccionar consigo mismo para dar N_2O , puede reaccionar con $\bullet\text{NO}$ dando N_2O y NO_2^- . Por ello, el N_2O , producto de la dimerización del HNO , se emplea a menudo como herramienta para la detección indirecta del HNO . [34] En este contexto, la reactividad entre H_2S y $\bullet\text{NO}$ para dar HNO , se pondría de manifiesto por la aparición de las bandas características de N_2O . De manera estrictamente anaeróbica se colocó 1 ml de H_2S en la celda para gases que ya contenía al $\bullet\text{NO}$, lo que no produjo N_2O . Seguido a esto, se agregó a la mezcla 2ml de vapor de H_2O , lo que tampoco condujo hacia la formación de N_2O . El vapor de H_2O se generó calentando un balón que contenía agua libre de O_2 , en atmósfera de argón. La sobrepresión creada por la formación del vapor se liberó mediante conexión a un burbujeador. Por último, el agregado de 2 ml de aire provocó disminución instantánea de la señal de $\bullet\text{NO}$ y aumento de la señal de $\bullet\text{NO}_2$, que fue descendiendo a medida que aumentaba la señal de N_2O (figura 5.3).

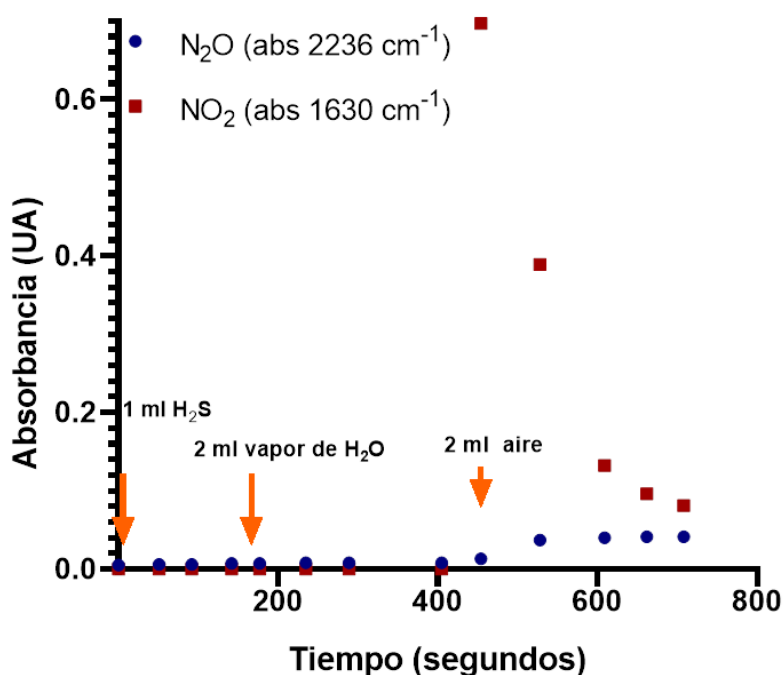


Figura 5.3 Absorbancia obtenida del espectro FTIR en la región espectral de 1630 cm^{-1} y 2236 cm^{-1} correspondiente a $\bullet\text{NO}_2$ y N_2O , respectivamente. Las flechas indican los agregados de H_2S , vapor de H_2O y aire al $\bullet\text{NO}$ gaseoso contenido en el interior de la celda.

El progreso de la reacción, evidenciado por el aumento de la absorbancia en 2236 cm⁻¹, correspondiente a la molécula de N₂O, se produce mientras exista una señal en 1630 cm⁻¹, correspondiente al •NO₂. En el momento en que la señal de •NO₂ se aproxima a 0, la reacción parece detenerse. Este resultado concuerda con la hipótesis propuesta por McCarthy *et al.*, que sugiere que la reacción inicial entre •NO y •NO₂ da lugar a la formación de N₂O₃ (Ecuación 5.2). [376]



Posteriormente, el N₂O₃ experimenta una nueva reacción con el H₂S, dando lugar a la formación de HSNO (Ecuación 5.3). Este último se combina con otra molécula de H₂S para generar HNO y HSSH (Ecuación 5.4). Finalmente, se produce la dimerización del HNO para dar N₂O (Ecuación 5.5). Estas observaciones confirmaron que el oxígeno es un componente necesario para que se produzca la reacción entre •NO y H₂S. Esto se debe a que la reacción depende de la participación de •NO₂, un producto de la oxidación de •NO por O₂. Por otro lado, la adición de vapor de H₂O no produjo un avance de la reacción, lo que indica que las moléculas de H₂O no parecen participar en la reacción.

5.4.2 Reacción entre H₂S (g) y •NO (g) en presencia de vapores de NH₃ y HCl

Como se mencionó anteriormente, las constantes de velocidad de la reacción entre H₂S y •NO en solución tienen una fuerte dependencia con el pH. En este contexto, se decidió evaluar el efecto de agregar una base o un ácido en fase gaseosa que puedan promover el avance de la reacción. La generación de vapores de HCl y NH₃ se llevó a cabo de forma anaeróbica. El primer balón que contenía NH₄OH (s) se desgasificó por aplicación de un flujo de argón. A continuación, se conectó mediante cánulas a un segundo balón sometido a vacío. Éste contenía una precámara para aislar el microambiente del balón del aire del laboratorio. Esto permitió la transferencia de NH₄OH y la formación de vapor de NH₃ sin contaminación por oxígeno. La generación del vapor ácido se realizó de forma similar a la generación del

vapor básico, con una variación mínima en la desgasificación del balón con HCl líquido, ya que se evitó el contacto de las agujas metálicas con el ácido. Se adaptaron puntas de pipeta automáticas para la jeringa de entrada de argón y cánulas para la jeringa de salida.

En consecuencia, el experimento realizado en la celda de gas implicó la adición de •NO, luego H₂S y finalmente uno de los dos vapores (HCl y NH₃) (Tabla 5.2). Una condición indispensable para que una muestra sea considerada apta para su análisis fue la ausencia de señal de •NO₂, ya que esto significa que no hubo contaminación con O₂, por ello en la tabla se observan señales nulas en la columna asignada a este gas. Es decir, ante la adición de cada gas o vapor, se verificó la ausencia de formación de •NO₂ en el sistema.

Table 5.2 – Señales de •NO, •NO₂, N₂O y otras, registradas durante los experimentos.

	Señales detectadas (cm ⁻¹)			
	•NO	•NO ₂	N ₂ O	otras señales
H ₂ S + NH ₃	-	-	-	3049,00; 3128,75
•NO + NH ₃	1903	-	-	1232,72; 1436,26; 1790; 3052,81; 3192,42
•NO + H ₂ S	1903	-	-	-
•NO + H ₂ S + O ₂	1903	1630	2235,65 2205,26	1356-1373 (estiramiento antisimétrico del SO ₂ ?)
•NO + H ₂ S + NH ₃	1903	-	2235,65 2205,26	Bandas de •NO+H ₂ S + Bandas de •NO+NH ₃ + ≈803 - 867; ≈1250; ≈1600 (N-O); 2832,43; 3152,08 (N-H)
•NO + H ₂ S + HCl	1903	-	-	-

Lo más relevante que se desprende de la tabla es que la única condición anaeróbica en la que se detectaron señales de N₂O fue la mezcla que contenía los tres gases juntos: •NO + H₂S + NH₃, lo que sugiere (indirectamente) la formación de HNO. Como se detalló en la introducción de este capítulo, HNO fue detectado directamente en la reacción en solución entre H₂S y •NO mediante sensor electroquímico y colorimétrico [59]. Por otro lado, las mezclas •NO + NH₃ y H₂S + NH₃ mostraron nuevas señales, aunque sin evidencia de la formación de N₂O.

Para determinar la identidad de los intermediarios o productos presentes, se requieren estudios adicionales, ya que las señales observadas presentan ambigüedades. No obstante, algunas pueden asignarse parcialmente con base en tablas de frecuencias características. Por ejemplo, la señal en 3152 cm⁻¹ podría estar relacionada con los estiramientos N-H en el

amoníaco o el ión amonio. Además, las bandas correspondientes al amoníaco desaparecen cuando se incorpora otro gas. En particular, las bandas de mayor intensidad del amoníaco a 930 cm^{-1} , 965 cm^{-1} y 3333 cm^{-1} estaban presentes en la muestra pura utilizada como blanco mientras que no se detectaron en las otras mezclas.

Asimismo, al mezclar $\bullet\text{NO}$ y H_2S puros, no se observaron señales nuevas ni se detectó ninguna alteración en la banda característica del $\bullet\text{NO}$ ubicada en 1903 cm^{-1} . Una posible presencia de señales S-N, que suelen encontrarse entre 1300 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} , habría sido relevante; sin embargo, no se detectaron en este análisis.

Estos resultados revelaron un claro aumento de la formación de N_2O en presencia de NH_3 (Figura 5.4, A y 5.4, C). Sin embargo, este efecto no se observó con la adición de vapor de HCl (Figura 5.4, B y 5.4, C). Además, no se observaron señales adicionales en los espectros tras la adición de HCl .

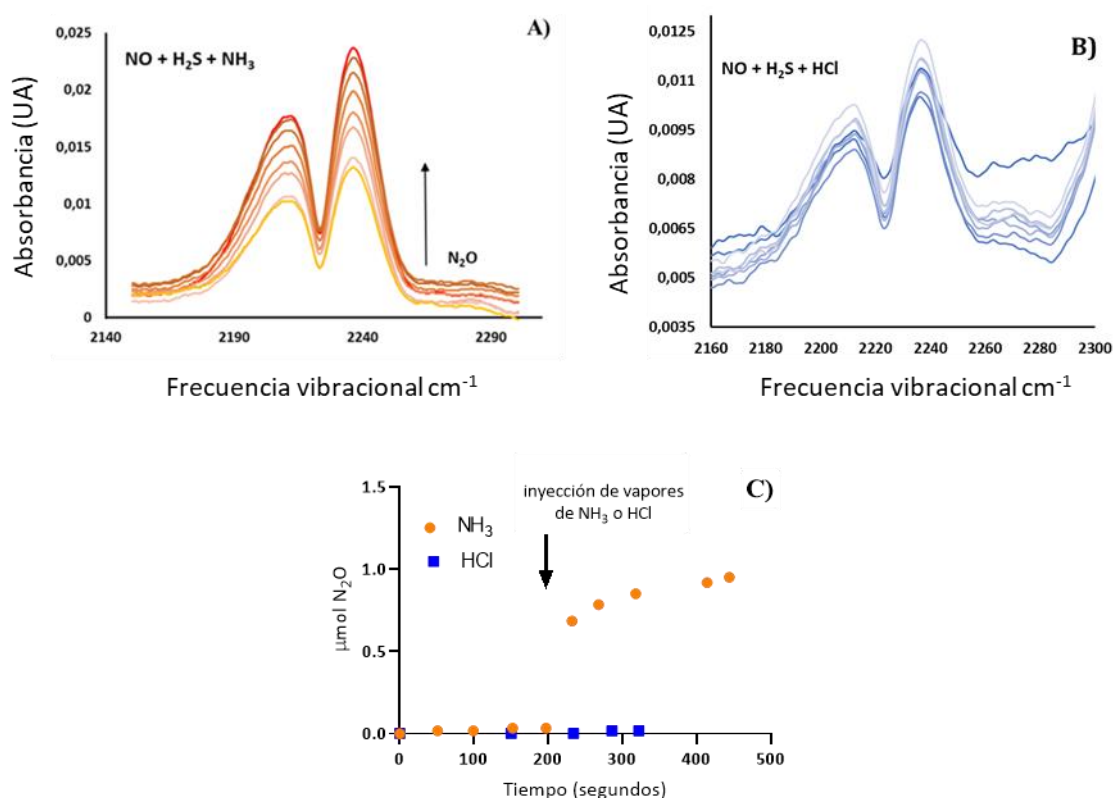


Figura 5.4 Respuesta a la adición de NH_3 y HCl a la mezcla de H_2S y $\bullet\text{NO}$. Cambios espectrales en la región del N_2O (2150 y 2250 cm^{-1}) por la adición de A) NH_3 y B) HCl . C) Comparación del N_2O producido entre las condiciones de NH_3 y HCl .

La observación de la tendencia creciente de la señal correspondiente al N_2O indica que la condición básica podría potenciar la reacción entre el H_2S y el $\bullet\text{NO}$. Además, es posible que se formen especies adicionales en la reacción de tres componentes, o entre NH_3 y $\bullet\text{NO}$ o NH_3 y H_2S . Para más detalles, véase la Tabla 5.2. La mezcla de gases $\bullet\text{NO}$ y NH_3 muestra una reducción de las señales de amoníaco y la aparición de nuevas señales. La mezcla de NH_3 y H_2S también genera nuevas señales (Tabla 5.2), lo que sugiere una reacción entre estas dos especies. Sin embargo, ninguna de estas dos mezclas conduce a la formación de N_2O .

5.4.3 Análisis computacional del mecanismo $\text{H}_2\text{S} (g)/\bullet\text{NO} (g)/\text{NH}_3 (g)$

Se ha demostrado que la única mezcla anaeróbica capaz de generar N_2O es la que contiene las tres especies, a saber, NH_3 , H_2S y $\bullet\text{NO}$, sin trazas de $\bullet\text{NO}_2$ presentes. Por consiguiente, el análisis computacional se centrará en esta condición específica. Las reacciones de tercer orden son poco frecuentes, ya que la probabilidad de que se produzca una colisión simultánea entre tres especies es muy baja. Nuestro enfoque comenzó entonces investigando la formación de un complejo bimolecular a partir de todas las especies reactivas.

Entonces, se consideraron tres posibilidades: un complejo formado por la aproximación de las moléculas de NH_3 y H_2S de un átomo de hidrógeno del sulfuro de hidrógeno al átomo de nitrógeno del amoníaco, y la aproximación entre NH_3 y $\bullet\text{NO}$ por dos orientaciones diferentes: la aproximación del átomo de nitrógeno del óxido nítrico a un átomo de hidrógeno de la molécula de amoníaco y la aproximación del mismo nitrógeno del óxido nítrico al átomo de nitrógeno de la molécula de amoníaco. Estas posibilidades se calcularon mediante un procedimiento de barrido relajado, que varió la distancia entre el par de átomos bajo estudio en 20 pasos separados por igual de 3,00 a 1,00 Å. En cada paso, la distancia entre el par de átomos se mantuvo constante mientras que el resto del sistema tenía su geometría optimizada al nivel de teoría mencionado. La Figura 5.5 muestra los resultados y los esquemas de aproximación realizados en colaboración con el Dr. Mateus Venâncio de Universidade Federal da Bahia, Brasil.

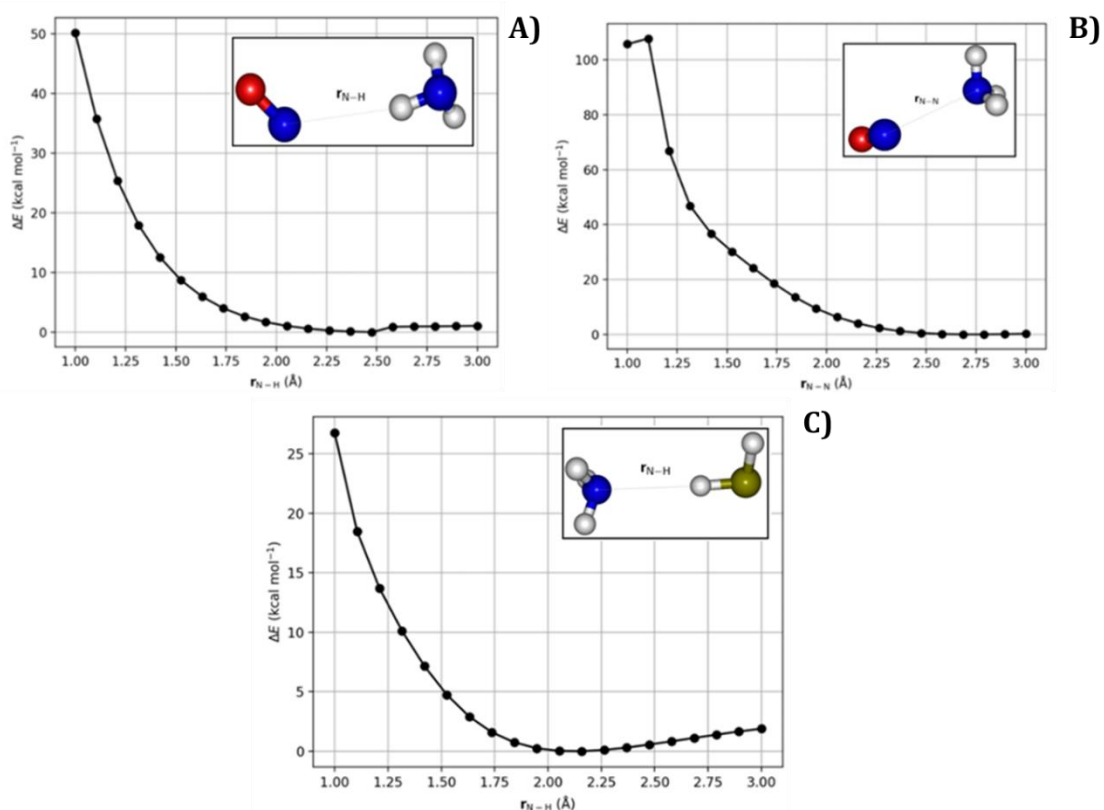


Figura 5.5. Superficie de energía potencial para la aproximación de A) NH₃ y •NO (N-H), B) NH₃ y •NO (N-N), y C) NH₃ y H₂S.

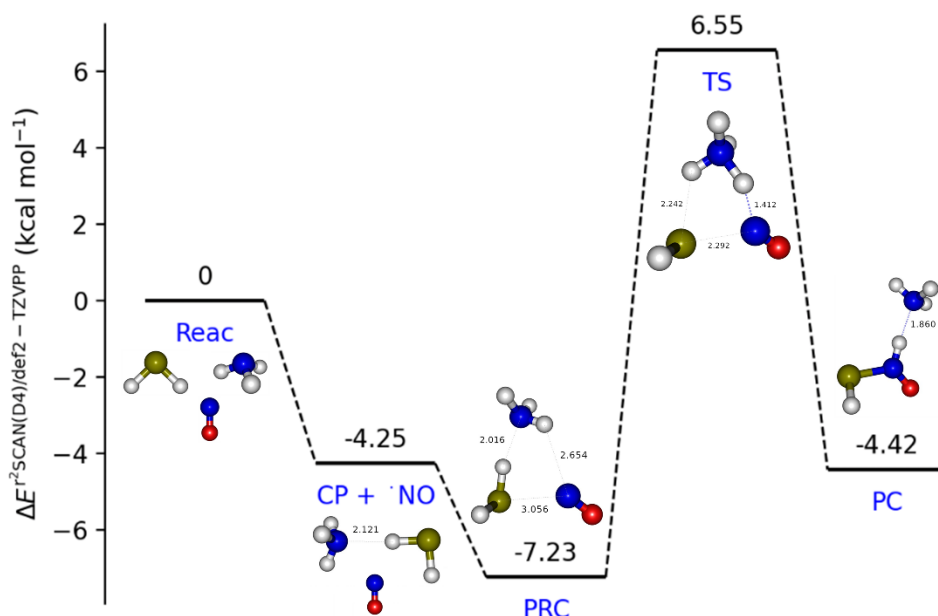


Figura 5.6 Perfil de energía electrónica en función de la coordenada de reacción en el nivel de teoría r²SCAN(D4)/def2-TZVPP.

Estos resultados muestran que sólo el par NH_3 y H_2S forma un complejo estable débilmente unido $\text{HS}\cdots\text{NH}_4^+$ (CP, por sus siglas en inglés). La Figura 5.6 muestra el perfil de la energía electrónica en función de la coordenada de reacción para este último caso. Puede observarse que $\text{CP} + \bullet\text{NO}$ son $4,25 \text{ kcal mol}^{-1}$ más estables que los reactivos aislados. Tras la estabilización, estas dos especies pasan a formar un complejo bimolecular prerreactivo (PRC, por sus siglas en inglés) $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ más estable. La energía de activación para que este PRC supere el estado de transición es de $13,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, dando lugar a un complejo producto $\text{NH}_3, [\text{HSN}(\text{H})\text{O}]\bullet$ (PC, por sus siglas en inglés) que es $4,42 \text{ kcal mol}^{-1}$ más estable que los reactivos, lo que indica una ruta de reacción exotérmica. El estado de transición se caracterizó por una sola frecuencia imaginaria de $i344,84 \text{ cm}^{-1}$.

Dado que se forma PC, este complejo puede reaccionar con otra molécula de $\bullet\text{NO}$ disponible en el recipiente. Evaluamos esta posibilidad creando un nuevo diagrama de perfil energético utilizando como reactivos el $\text{NH}_3, [\text{HSN}(\text{H})\text{O}]\bullet$, y otro $\bullet\text{NO}$. La suma de la energía electrónica de estas tres especies se fijó entonces como energía de referencia (cero). Al igual que lo descrito en la Figura 5.6, la especie PC se consideró un complejo estable para reaccionar con el óxido nítrico en una reacción elemental pseudo-bimolecular, dado que tanto el PC como el $\bullet\text{NO}$ son radicales. A grandes distancias, no interaccionan entre sí, y el estado electrónico del sistema, considerando ambas especies, podría ser un estado triplete o pasar a un estado singlete. Las superficies de energía potencial de los estados triplete y singlete se cruzan en un punto llamado Punto de Cruce de Energía Mínima (MECP, por sus siglas en inglés) [377–379]. Este enfoque se representa en la figura 5.7.

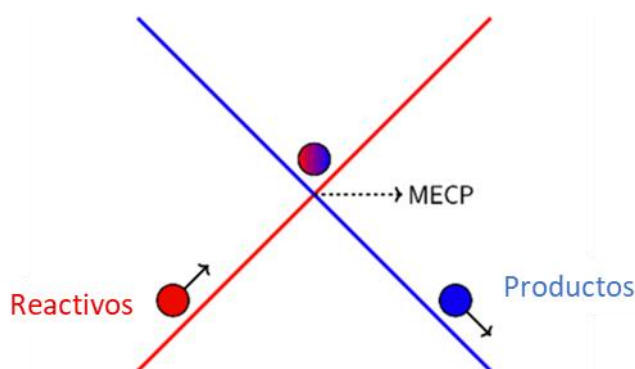


Figura 5.7 Representación esquemática del MECP. La línea roja representa el estado triplete y la línea azul el estado singlete.

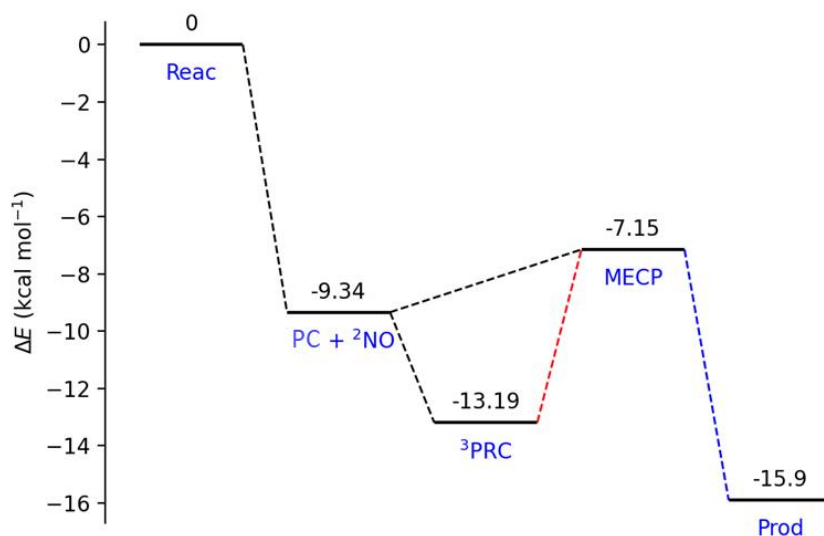


Figura 5.8 Perfil de energía electrónica de reacción para el segundo paso de la reacción de formación de HNO.

El Diagrama de energía desde los reactivos aislados (NH_3 , $[\text{HSN}(\text{H})\text{O}]^\bullet$, y $\bullet\text{NO}$) hasta el MECP se muestra en la Figura 5.8. Dado que el MECP actúa como un estado de transición, realizamos una optimización geométrica (ahora en el estado singlete) para obtener el producto de la reacción. La optimización geométrica del producto dio lugar a las estructuras representadas en la Figura 5.9, A. La estructura del producto (Prod) es unas 16 kcal mol⁻¹ más estable que la de los reactivos, como se muestra en la Figura 5.9, B, que ahora además contiene el segundo paso completo de la reacción.

Sin embargo, en MECP se observan 4 especies interaccionando, por lo que parece probable que se separen liberando $\text{HNO} + \text{NH}_3 + \text{SNO}^\bullet$. Además, la observación de N_2O (producto de la dimerización de HNO) como producto de la reacción, nos permite sugerir que ambas vías podrían estar ocurriendo al mismo tiempo.

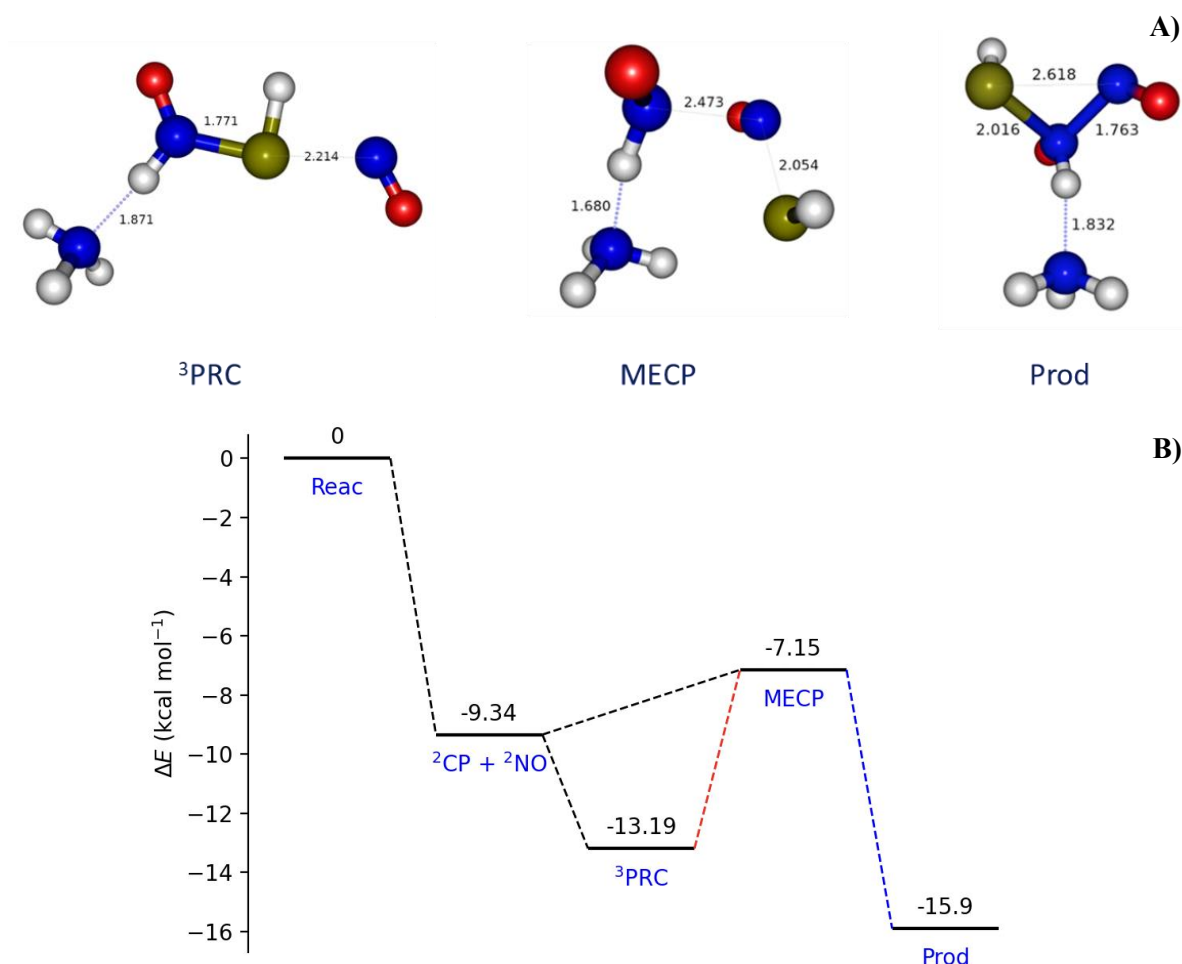


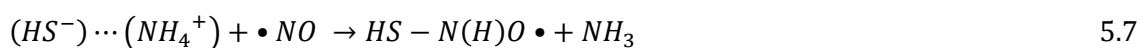
Figura 5.9 A) Optimización de la geometría del ^3PRC , punto de cruce de energía mínimo optimizado (MECP) y Prod en el nivel de teoría $r^2\text{SCAN(D4)-Def2-TZVPP}$, para obtener el producto de la reacción. B) Perfil de Energía Electrónica de Reacción para el segundo paso de la reacción de formación de HNO incluyendo el producto para la reacción.

5.4.4 Mecanismo propuesto

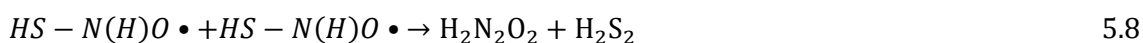
El mecanismo propuesto para la formación de HNO comenzaría con la reacción ácido-base descrita por la Ecuación 5.6. En agua ambos iones están solvatados, o sea, rodeados por varias moléculas de H_2O . En la fase gaseosa, sin agua, HS^- y NH_4^+ formarán el complejo descrito CP (Figura 5.5, C).



Este complejo reaccionará con $\bullet\text{NO}$ vía ataque nucleofílico del S localizado en HS^- al N en $\bullet\text{NO}$ (Ecuación 5.7). Entonces se podría obtener $\text{H-S-NO}\bullet$, que en el mismo paso o en un paso siguiente podría tomar un H^+ del NH_4^+ para producir $\text{HS-N(H)O}\bullet$ (PC + NH_3):



Además, como se muestra en la Ecuación 5.8, HS-N(H)O• podría reaccionar con otro HS-N(H)O• para producir H₂N₂O₂ (HO-N=N-OH, el dímero de HNO, que luego forma N₂O) + H₂S₂ (HS-SH). Pero, HS-N(H)O• reaccionará más rápidamente con •NO (que está en una concentración mucho mayor y también es un radical libre) para producir SNO⁻ + HNO, o HSNO + HNO si toma un H⁺ de NH₄⁺ (Ecuaciones. 5.9 y 5.10). Además, HSNO/SNO⁻ es una especie muy reactiva, por lo que podría continuar reaccionando con H₂S para generar otra molécula de HNO y HSSH (ecuación 5.4).



5.5 Conclusiones

El aspecto más relevante de este capítulo de tesis es la falta de reactividad entre H₂S y •NO, dos gasotransmisores, cuando se encuentran en estado puro, seco y no disuelto. Además, los cálculos de energía electrónica para las geometrías optimizadas de la interacción entre estas dos especies, indican la necesidad de superar barreras energéticas muy altas. Sin embargo, esto cambia considerablemente al incluir al NH₃ en esa interacción, situación en la cual se observa la generación de N₂O, muy probablemente a través del intermediario HNO. Sin embargo, los espectros FTIR revelaron diversas señales no identificadas en las mezclas H₂S-NH₃, •NO-NH₃ y en la combinación de los tres gases H₂S-NH₃-•NO, lo que sugiere la posible existencia de reacciones paralelas cuyo producto nitrogenado final no es N₂O.

Los resultados contrastan con la amplia evidencia en la literatura que señala la reactividad entre H₂S y •NO en solución. Sin embargo, la presencia de una especie básica que atraiga H⁺ (en este caso NH₃) parece ser un requisito fundamental, en línea con las evidencias que indican un aumento de la reactividad a pHs elevados. Aunque esta reactividad en fase gaseosa puede diferir ligeramente debido a la ausencia de solvatación y equilibrios ácido-base, se destaca un rasgo esencial de esta reacción. La necesidad de una carga negativa sobre

el azufre (HS^- en solución) o de un enlace de uno de sus hidrógenos con otra especie parece ser crucial para que la reacción tenga lugar. Esta observación sustenta las propuestas previas de que el azufre efectúa un ataque nucleofílico sobre el nitrógeno del $\bullet\text{NO}$.

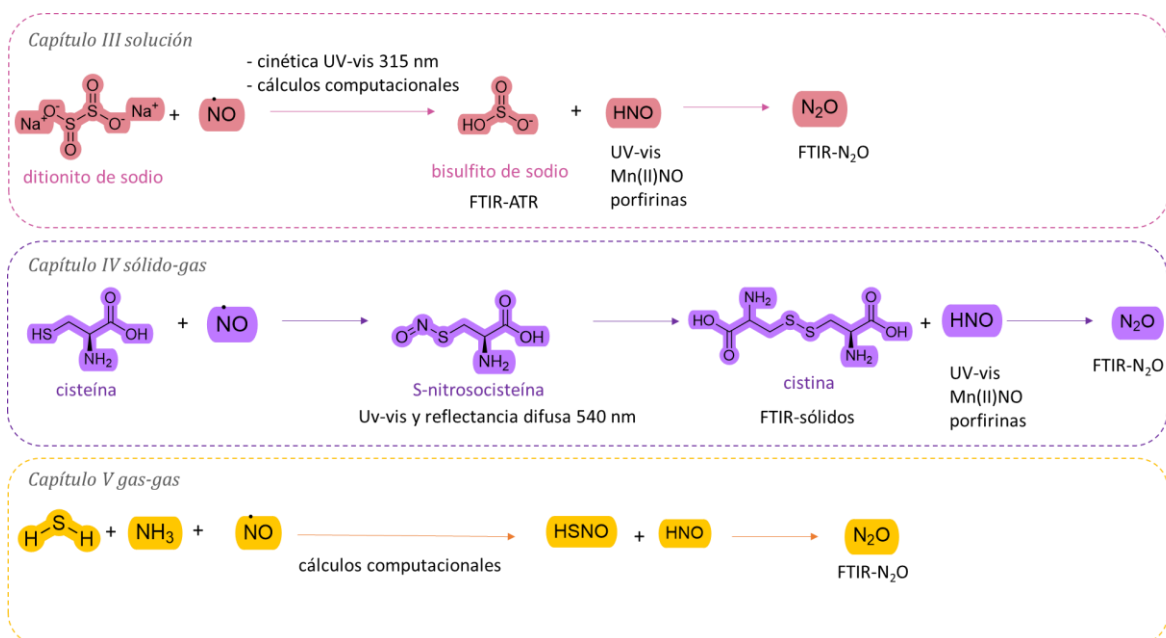
Las geometrías optimizadas revelan etapas de reacción que requieren superar pequeñas barreras energéticas. Si bien una reacción entre tres especies resulta poco probable, el mecanismo comenzaría con la reacción ácido-base descrita por la Ecuación 5.6. En solución los iones están solvatados, o sea, rodeados por varias moléculas de H_2O y la especie HS^- reaccionaría con el dímero de $\bullet\text{NO}$, $(\text{NO})_2$. Por el contrario, en fase gaseosa, sin agua, HS^- y NH_4^+ formarían el complejo CP, descrita por la Ecuación 5.7. En conclusión, ambos sistemas tienen la necesidad de una etapa inicial en la que dos moléculas de los reactivos se combinan, seguida por la reacción de la nueva especie transitoria con una tercera.

Un experimento pertinente para continuar esta línea de investigación consistiría en modificar las condiciones, ya sea por medio de cambios de temperatura, volumen o presión que favorezcan la formación del dímero de $\bullet\text{NO}$ y evaluar así la reactividad sin la incorporación otras especies. Además, para extender el tiempo de observación y detectar otras posibles especies, como HNO , será necesario optimizar la manipulación de los gases o vapores a introducir. Es fundamental realizar estos procedimientos con extremo cuidado debido a la alta sensibilidad de las especies empleadas frente al oxígeno. A partir de estos resultados, investigaciones futuras sobre esta reactividad podrían enfocarse en la detección de HNO , así como en la identificación de los otros productos generados durante la reacción. Además, sería relevante explorar otras especies atractoras de H^+ que puedan estar presentes en ambientes biológicos y que presenten una menor toxicidad que el NH_3 .

6 Conclusiones generales y perspectivas

El HNO es la forma reducida del $\bullet\text{NO}$. Posee propiedades únicas, como sus efectos sobre el sistema cardiovascular y su resistencia a la degradación por especies reactivas de oxígeno, en particular al radical superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$). Estas características fisiológicas han despertado un gran interés en su estudio. Sin embargo, su naturaleza elusiva, debido a su alta reactividad con O_2 , $\bullet\text{NO}$, tioles, H_2S y consigo mismo, con constantes de velocidad de segundo orden con valores entre $\sim 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, dificulta el estudio de su formación y reactividad, especialmente por los desafíos en su detección inequívoca. En los últimos 20 años se han recopilado numerosos estudios que evidencian la formación de HNO a partir de la reducción de $\bullet\text{NO}$ por especies biológicamente relevantes, como alcoholes (por ejemplo, ácido ascórbico) y tioles, como la cisteína. Además, HNO puede ser generado mediante catálisis enzimática.

El hilo conductor de esta tesis fue la evaluación de la viabilidad de generar HNO mediante la interacción entre $\bullet\text{NO}$ y especies azufradas biológicamente relevantes, considerando distintos entornos: solución (ditionito de sodio- $\bullet\text{NO}$), interacción sólido-gas (cisteína- $\bullet\text{NO}$) y fase gaseosa (H_2S - $\bullet\text{NO}$).



En las tres condiciones evaluadas se buscó dilucidar los mecanismos subyacentes a la reactividad. En este arduo recorrido se presentaron numerosos obstáculos, siendo el principal de ellos evitar el ingreso de oxígeno durante todo el desarrollo de los experimentos. Ante esta exigencia, se implementaron diversas estrategias que dependían

tanto de las condiciones experimentales como del estado del reactivo de partida (sólido, disuelto o gaseoso). En ocasiones, fue necesario modificar y adaptar elementos, cuya función original era diferente, con el propósito de mantener una anaerobiosis estricta desde el inicio (síntesis, almacenamiento y manipulación de los reactivos) hasta el final de las mediciones. Un ejemplo de estas adaptaciones fue la modificación de una cubeta de cuarzo, a la cual se le incorporó una precámara para la inyección controlada de argón. De esta forma, se logró impedir el ingreso de O_2 durante 6 horas de mediciones que pretendían medir la descomposición anaeróbica de ditionito.

Por otro lado, se planificaron estratégicamente cada una de las mediciones de HNO, puesto que el mismo puede “perdersé” en el camino y no llegar hasta el detector. Debido a su alta reactividad, presentando una constante de dimerización de aproximadamente 10^6 , la cuantificación directa resulta sumamente complicada. Por ello, se ha optado por emplear un método indirecto basado en la medición del N_2O , producto de su dimerización. Se aplicó este enfoque en los tres capítulos experimentales; sin embargo, en dos de ellos se logró detectar HNO de manera directa mediante una estrategia experimental específica.

En el Capítulo 3 se estudió la reacción entre ditionito de sodio y $\bullet NO$ en solución a un pH de 7,4. Aunque el ditionito no se halla de forma natural en los sistemas biológicos, puede introducirse como contaminación, dada su amplia utilización en las industrias alimenticia, textil, papelera, en la síntesis orgánica y en investigación científica como reductor enzimático. Por otro lado, la relevancia de estudiar esta reactividad no reside únicamente en explicar los efectos observados en experimentos donde ditionito y $\bullet NO$ coexisten en solución, sino también en explotar su potencial como herramienta para producir HNO a partir de $\bullet NO$ (capítulo III). La detección directa de HNO mediante un sensor electroquímico basado en porfirinas de Co resultó inviable, ya que el ditionito, debido a su potencial de reducción negativo, alteraba las porfirinas, deteriorando el funcionamiento del sensor. Por ello, se optó por una alternativa que consistió en separar físicamente el HNO generado en la solución mediante la aplicación de un flujo de N_2 gaseoso. Este método de desplazamiento de gases se utiliza ampliamente en los procesos de desgasado de solventes, en los que se aplica un flujo de un gas inerte, como el nitrógeno o el argón, para desplazar el O_2 disuelto. De este modo, se logró desplazar el HNO hacia el dispositivo de detección, donde fue atrapado en complejos formados con las porfirinas de Mn(III). En estudios previos se había detectado HNO gaseoso por espectrometría de masas, aprovechando que a presiones mínimas se evitan los choques moleculares que llevan a su dimerización. Siguiendo esta lógica, se utilizó N_2 para diluir la mezcla gaseosa. Cabe destacar que el flujo de N_2 desempeña una doble función, mientras impulsa la extracción de los gases de la solución, actúa como

diluyente de los mismos. Así, ajustando progresivamente la velocidad de flujo, se logró acumular adecuada cantidad de HNO “atrapado” mediante la formación de complejos con porfirinas de manganeso (III). La misma estrategia se aplicó en el sistema sólido-gas (Capítulo 4), aunque no fue factible implementarla en las reacciones entre los dos gases, H₂S y NO, debido a que el HNO quedaría inmerso en una mezcla de reactivos gaseosos de la que resulta imposible separarse.

El potencial de reducción negativo del ditionito lo hace extremadamente sensible al oxígeno; de hecho, se ha aprovechado esta característica cuando es necesario eliminar el oxígeno del medio. Además, se descompone de manera anaeróbica y puede actuar como reductor con otras especies presentes en el medio. Debido a estas características, no es de extrañar que su reactividad con el •NO se haya mostrado tan compleja. Al evaluar el consumo de ditionito mediante espectroscopia UV-visible ante la adición de •NO, se observó una cinética que no se ajustaba a ecuaciones lineales ni exponenciales integradas que indicaran órdenes de reacción 0, 1 y 2. Luego de adquirir una importante cantidad de datos experimentales que mostraron el mismo comportamiento, consideramos la posibilidad de que la cinética fuera más compleja e incluyera reacciones en serie, en paralelo, ordenes fraccionarios o mixtos. Entonces, se exploraron otras ecuaciones matemáticas más complejas y, tras innumerables intentos, se logró dar con una ecuación con un buen ajuste ($R^2 = 0,99$). Sin embargo, la interpretación química indicaba la necesidad de considerar reacciones que regeneraran ditionito y reacciones que lo consuman de manera constante. Dado el nivel de complejidad observado, recurrir a los cálculos computacionales fue imprescindible para sustentar todas las propuestas y dar una explicación química a la cinética observada. En todos los casos, el estado de transición requería superar barreras energéticas de alrededor de 10 kcal, lo suficientemente bajas como para permitir que la reacción ocurriese de manera espontánea o a una velocidad razonable a temperatura y presión normales (25 °C y 1 atm). Por ejemplo, el giro de silla del ciclohexano, procede a temperatura normal superando una barrera energética inicial de 10 kcal/mol. A pesar de los desafíos que nos enfrentamos a lo largo de todo el análisis, la identificación de los productos finales e intermedios (incluido el HNO) y el apoyo de cálculos computacionales, nos permitió arrojar luz sobre la reactividad entre ditionito y •NO. Si bien el objetivo principal del estudio fue la generación de HNO, la complejidad observada en todo el proceso justifica el detallado enfoque adoptado. Estos resultados evidencian una forma de obtención de HNO a partir de la acción entre un reductor fuerte y el •NO, motivando estudios futuros en este campo desconocido hasta el momento. Al mismo tiempo, dejan un llamado de atención para la utilización de ditionito para la reducción de enzimas, cuando se quiera estudiar sistemas que involucren RNOS.

En el Capítulo 4 se estudió la generación de HNO gaseoso a partir de cisteína en estado sólido y $\bullet\text{NO}$ gaseoso, motivado por evidencia previa que confirma su formación en solución acuosa. En este medio, la interacción entre cisteína y $\bullet\text{NO}$ genera HNO como intermediario, mediante un ataque nucleofílico acoplado a protones. La exploración de esta reacción en condiciones sólido-gas, sin la presencia de agua como medio, abre nuevas posibilidades para la aplicación del HNO en tratamientos médicos. Esta alternativa podría permitir el desarrollo de terapias inhalatorias de HNO, similares a las implementadas recientemente con $\bullet\text{NO}$ inhalado en pacientes con COVID-19, neonatos con hipertensión pulmonar y adultos con insuficiencia respiratoria.

En este contexto, recientemente, en el grupo de trabajo hemos presentado el desarrollo de un método para generar HNO gaseoso, aunque este se basa en la reacción de reactivos tóxicos para el ser humano, como el NH_3 . En contraste, la presente tesis propone un enfoque alternativo que utiliza especies biológicamente compatibles: cisteína y $\bullet\text{NO}$. Este método arrojó un rendimiento aproximado del 11% de N_2O (equivalente al 22% de HNO) después de 6 horas de reacción. No obstante, debido a ciertas condiciones experimentales, particularmente al uso de septums que pueden provocar la fuga de gases con el tiempo, es posible que el rendimiento real esté siendo subestimado.

La detección de HNO en el Capítulo 4 se logró mediante un experimento similar al del Capítulo 3, con la diferencia de que en este caso el $\bullet\text{NO}$ gaseoso es dirigido a través de un sólido donde ocurre la formación de HNO. El hecho de que se pueda detectar HNO en un entorno en el que coexisten reacciones que podrían generar productos secundarios no deseados, como N_2O , resulta prometedor para su administración como tratamiento inhalatorio. Esto sugiere que, pese a las posibles transformaciones durante su transporte, el HNO podría llegar al sitio de acción. Sin ir más lejos, pese a la conocida reactividad del $\bullet\text{NO}$ con O_2 , que produce $\bullet\text{NO}_2$, ha sido posible aplicar $\bullet\text{NO}$ exitosamente mediante respiradores, operando a concentraciones que minimizan la formación de estos subproductos. Este precedente indica que el HNO también podría administrarse por esta vía, siempre y cuando se controlen estrictamente las presiones de los gases involucrados, tanto del reactivo ($\bullet\text{NO}$) como de los posibles productos. Entre los subproductos más probables se encuentran el N_2O y el peroxinitrito (ONOO^-), formados a partir de la reacción del HNO consigo mismo y con O_2 , respectivamente.

Esta reacción entre cisteína y $\bullet\text{NO}$ fue patentada en 2024, junto con un método de generación de HNO mediante la reacción entre ácido de Piloty sólido y NH_3 por su potencial para la obtención de HNO gaseoso para ser aplicado por vía inhalatoria. Por ello, futuros experimentos pertinentes podrían centrarse en optimizar el rendimiento del HNO

producido y en evaluar otros reactivos que faciliten este tipo de reacciones. En esta tesis se presentaron estudios preliminares de la acción de fenoles derivados de la naringina, que generalmente se obtienen como subproductos en la producción de jugos de frutas, los cuales mostraron que generan N_2O . Si bien, los rendimientos fueron mucho más bajos que la cisteína, no deberían ser ignorados.

Finalmente, en el capítulo 5 se abordó el estudio de gasotransmisores como el H_2S y $\bullet NO$, los cuales desempeñan funciones clave en la señalización celular. Aunque el H_2S ha sido inicialmente considerado tóxico, investigaciones recientes destacaron su papel en el sistema cardiovascular. Además, otros estudios han sugerido que el HNO podría ser un intermediario en la interacción entre H_2S y $\bullet NO$, potenciando efectos biológicos específicos. Desde un enfoque químico, la reacción entre H_2S y $\bullet NO$ depende del pH, alcanzando su mayor velocidad cuando la especie predominante es HS^- . Se ha propuesto que el mecanismo más probable involucra la reacción de HS^- con el dímero de $\bullet NO$ $((NO)_2)$, con formación de HNO y SNO^- . No obstante, la mayoría de los estudios se han realizado en fase acuosa, dejando abierta la necesidad de investigar su comportamiento en fase gaseosa.

El resultado más relevante del capítulo 5 es que la reacción entre H_2S y $\bullet NO$ en fase gaseosa no produce N_2O . De hecho, se observó que no reaccionan entre sí en estas condiciones. No obstante, se requiere la adición de otra especie básica para que la reacción pueda producirse, lo que concuerda con los resultados anteriores que demuestran que esta se produce a pH más altos, particularmente debido a la formación de la especie HS^- . Estos resultados se respaldan con los cálculos computacionales para obtener las geometrías optimizadas. Sin embargo, la formación de HNO solo se confirmó experimentalmente de manera indirecta debido a las dificultades que se fueron presentando en el camino. La síntesis de los gases, $\bullet NO$ y H_2S , requirió la puesta a punto del método de generación más adecuado en el que la contaminación con humedad y oxígeno sean mínimas. Tras su generación y mantenimiento, fue necesaria una puesta a punto de su manipulación y, por último, de las mediciones. Si bien la generación de los gases secos y puros se puede lograr de manera reproducible, aún es necesario poner a punto la manipulación de los gases en un equipo que permita detectar HNO, como un espectrómetro de masas. Por lo tanto, aún nos encontramos a mitad de camino de la detección de HNO como intermediario de esta reacción, cuya contraparte en solución confirmó que la generación ocurre de una manera dependiente del pH. Las principales complicaciones de estas mediciones surgen de la necesidad de manipular, mezclar y medir juntos gases que no es posible separar como en los capítulos 3 y 4. En este escenario, los esfuerzos futuros deberían centrarse principalmente en lograr la detección directa de HNO. Posteriormente, podrían evaluarse

otras formas de reacción, por ejemplo, eliminar el NH_3 y probar con otras especies atractoras de H^+ o condiciones que favorezcan la dimerización de $\bullet\text{NO}$ a $(\text{NO})_2$, tal como presiones elevadas o bajas temperaturas.

Este trabajo de tesis, al ampliar las posibles condiciones experimentales en las que el HNO puede generarse y detectarse, abre la puerta a nuevos estudios para conseguir una generación de HNO más específica, con menos productos secundarios y un rendimiento del proceso más alto. Además, este trabajo marca el comienzo de una exploración más profunda sobre el HNO , dejando múltiples aspectos aún por descubrir.

7 Bibliografia

1. Suarez SA (2024) Decoding the enigmatic last gasotransmitter. The intriguing journey of HNO: From hidden origins to clues on reactivity and detection. *Redox Biochemistry and Chemistry* 8:100024. <https://doi.org/10.1016/j.rbc.2024.100024>
2. Feelisch M, Olson KR (2013) Embracing sulfide and CO to understand nitric oxide biology. *Nitric Oxide* 35:2–4
3. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH (2009) Signaling by Gasotransmitters. *Sci Signal* 2:1–8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.268re2>
4. Kuhn H, Saam J, Eibach S, et al (2005) Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* 338:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.238>
5. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237:527–531. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
6. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:9265–9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
7. Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16:1792–1798. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
8. Wang R (2003) The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *Antioxid Redox Signal* 5:493–501. <https://doi.org/10.1089/152308603768295249>
9. Bianco CL, Toscano JP, Fukuto JM (2017) An Integrated View of the Chemical Biology of NO, CO, H₂S, and O₂. In: *Nitric Oxide*. pp 9–21
10. Priestley J (1772) Observations on different kinds of air. *Philos Trans R Soc Lond* 62:147–264. <https://doi.org/10.1098/rstl.1772.0021>
11. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:3203–3207. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3203>
12. Katsuki S, Arnold WP, Murad F (1977) Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* 3:239–249
13. Adams AF, Haslam RJ (1978) Factors affecting the activity of guanylate cyclase in lysates of human blood platelets. *Biochemical Journal* 174:23–35. <https://doi.org/10.1042/bj1740023>
14. Fukuto J, Gulati P, Nagasawa HT (1994) Involvement of nitroxyl (HNO) in the cyanamide-induced vasorelaxation of rabbit aorta. *Biochem Pharmacol* 47:922–924. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90495-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90495-2)
15. Väänänen AJ, Salmenperä P, Hukkanen M, et al (2006) Cathepsin B is a differentiation-resistant target for nitroxyl (HNO) in THP-1 monocyte/macrophages. *Free Radic Biol Med* 41:120–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.016>
16. Furchgott RF, Zawadzki J V (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>
17. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84:9265–9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
18. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1989) Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine. *Biochem Pharmacol* 38:1709–1715. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90403-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90403-6)
19. Koshland D (1992) The molecule of the year. *Science* (1979) 258:1861. <https://doi.org/10.1126/science.1470903>
20. Raju TNK (2000) The Nobel Chronicles. *The Lancet* 356:346. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)73635-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)73635-7)
21. McCleverty JA (2004) Chemistry of nitric oxide relevant to biology. *Chem Rev* 104:403–418. <https://doi.org/10.1021/cr020623q>
22. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* (1979) 258:1898–1902. <https://doi.org/10.1126/science.1281928>
23. Stuehr DJ, Haque MM (2019) Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *Br J Pharmacol* 176:177–188. <https://doi.org/10.1111/bph.14533>
24. Cheng J, He K, Shen Z, et al (2019) Nitric Oxide (NO)-Releasing Macromolecules: Rational Design and Biomedical Applications. *Front Chem* 7:. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00530>
25. Emmerling ST, Maschita J, Lotsch B V. (2023) Nitric Oxide (NO) as a Reagent for Topochemical Framework Transformation and Controlled NO Release in Covalent Organic Frameworks. *J Am Chem Soc* 145:7800–7809. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c11967>

26. Navale GR, Singh S, Ghosh K (2023) NO donors as the wonder molecules with therapeutic potential: Recent trends and future perspectives. *Coord Chem Rev* 481:215052. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215052>
27. Ahmed R, Augustine R, Chaudhry M, et al (2022) Nitric oxide-releasing biomaterials for promoting wound healing in impaired diabetic wounds: State of the art and recent trends. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 149:112707. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112707>
28. Harbeck P (1933) Die Darstellung von HNO bzw. [HNO] n . *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* 66:423–426. <https://doi.org/10.1002/cber.19330660325>
29. Miranda KM, Dutton AS, Ridnour L a, et al (2005) Mechanism of aerobic decomposition of Angeli's salt (sodium trioxodinitrate) at physiological pH. *J Am Chem Soc* 127:722–731. <https://doi.org/10.1021/ja045480z>
30. Bonner FTFT, Ravid B (1975) Thermal decomposition of oxyhyponitrite (sodium trioxodinitrate (II)) in aqueous solution. *Inorg Chem* 14:558–563
31. Dalby FW (1958) THE SPECTRUM AND STRUCTURE OF THE HNO MOLECULE. *Can J Phys* 36:1336–1371. <https://doi.org/10.1139/p58-138>
32. Brown HW, Pimentel GC (1958) Photolysis of Nitromethane and of Methyl Nitrite in an Argon Matrix; Infrared Detection of Nitroxyl, HNO. *J Chem Phys* 29:883–888. <https://doi.org/10.1063/1.1744605>
33. Shafirovich V, Lyman S V (2002) Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7340–7345. <https://doi.org/10.1073/pnas.112202099>
34. Fehling C, Friedrichs G (2011) Dimerization of HNO in Aqueous Solution: An Interplay of Solvation Effects, Fast Acid–Base Equilibria, and Intramolecular Hydrogen Bonding? *J Am Chem Soc* 133:17912–17922. <https://doi.org/10.1021/ja2075949>
35. DeMaster EG, Redfern B, Nagasawa HT (1998) Mechanisms of Inhibition of Aldehyde Dehydrogenase by Nitroxyl, the Active Metabolite of the Alcohol Deterrent Agent Cyanamide. *Biochem Pharmacol* 55:2007–2015. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00080-X)
36. DeMaster ECG, Shiota FN, Nagasawa HT, Shiota FN (1984) The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. *Pharmacol Biochem Behav* 18:273–277. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90185-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90185-5)
37. Miranda K (2005) The chemistry of nitroxyl (HNO) and implications in biology. *Coord Chem Rev* 249:433–455. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.08.010>
38. Fukuto JM (2019) A recent history of nitroxyl chemistry, pharmacology and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 176:135–146. <https://doi.org/10.1111/bph.14384>
39. Miao Z, King SB (2016) Recent advances in the chemical biology of nitroxyl (HNO) detection and generation. *Nitric Oxide* 57:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.04.006>
40. Gallego CM, Mazzeo A, Vargas P, et al (2021) Azanone (HNO): generation, stabilization and detection. *Chem Sci* 12:10410–10425. <https://doi.org/10.1039/d1sc02236a>
41. Suarez SA, Vargas P, Doctorovich FA (2021) Updating NO•/HNO interconversion under physiological conditions: A biological implication overview. *J Inorg Biochem* 216:111333. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111333>
42. Vargas P, Doctorovich FA, Suarez SA (2024) Update on Endogenous HNO Production: An Exploration of Unanswered Questions and Challenges. *Eur J Inorg Chem* 27:1–15. <https://doi.org/10.1002/ejic.202400190>
43. Suarez S, Floryszak-Wieczorek J, Sobieszczuk-Nowicka E, et al (2025) Searching for nitroxyl modulators in *Arabidopsis thaliana* : a new paradigm of redox signaling in plants. *J Exp Bot*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae494>
44. Orgel LE (1953) The electronic structures and spectra of some molecules related to oxygen. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 1276. <https://doi.org/10.1039/jr9530001276>
45. Walsh AD (1953) The electronic orbitals, shapes, and spectra of polyatomic molecules. Part III. HAB and HAAH molecules. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 2288. <https://doi.org/10.1039/jr9530002288>
46. Maier G, Reisenauer HP, De Marco M (1999) Isonitroso Hydrogen (Hydroxy Nitrene, HON). *Angewandte Chemie International Edition* 38:108–110. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990115\)38:1/2<108::AID-ANIE108>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990115)38:1/2<108::AID-ANIE108>3.0.CO;2-U)
47. Shi J, Li P, Bu Y, et al (2008) Isomerization of HNO to HON in the singlet state assisted by amino acid residues and/or water molecules. *Int J Quantum Chem* 108:1246–1256. <https://doi.org/10.1002/qua.21634>
48. Li Z, Bu Y, Ai H (2004) Water-Assisting Proton Transfer Isomerization of the HNO/HON System in the Singlet State: On the Number of the Effective Water Molecules. *J Phys Chem B* 108:11732–11743. <https://doi.org/10.1021/jp049636t>
49. Bartberger MD, Liu W, Ford E, et al (2002) The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10958–10963. <https://doi.org/10.1073/pnas.162095599>
50. M Tronc, A Huetz, M Landau, et al (1975) Resonant vibrational excitation of the NO ground state by electron impact in the 0.1–3 eV energy range. *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics* 8:1160–1169. <https://doi.org/10.1088/0022-3700/8/7/021>
51. Tennyson J, Noble CJ (1986) Low-energy electron scattering by the NO molecule. *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics* 19:4025

52. Szmytkowski C, Maciag K (1991) Total cross section for electron impact on nitrogen monoxide. *Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics* 4273
53. Lü L, Wang X, Wang Y, Dai G (2008) A theoretical study of the proton transfer process in the spin-forbidden reaction $1\text{HNO}(1\text{A}') + \text{OH}^- \rightarrow 3\text{NO}^-(3\Sigma^-) + \text{H}_2\text{O}$. *Sci Bull (Beijing)* 53:1489–1496. <https://doi.org/10.1007/s11434-008-0094-y>
54. Flores-Santana W, Salmon DJ, Donzelli S, et al (2011) The Specificity of Nitroxyl Chemistry Is Unique Among Nitrogen Oxides in Biological Systems. *Antioxid Redox Signal* 14:1659–1674. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3841>
55. Venâncio M, Doctorovich F, Rocha W (2017) On the Solvation and Proton Coupled Electron Transfer Reduction Potential of $2\text{NO}^\bullet$ to 1HNO in Aqueous Solution: A Theoretical Investigation. *J Phys Chem B* 121:6618–6625. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03552>
56. Armstrong DA, Huie RE, Lyman S V, et al (2013) Standard electrode potentials involving radicals in aqueous solution: inorganic radicals. *Bioinorg React Mech* 9:59–61. <https://doi.org/10.1515/irm-2013-0005>
57. Suarez SA, Neuman NI, Muñoz M, et al (2015) Nitric Oxide Is Reduced to HNO by Proton-Coupled Nucleophilic Attack by Ascorbate, Tyrosine, and Other Alcohols. A New Route to HNO in Biological Media? *J Am Chem Soc* 137:4720–4727. <https://doi.org/10.1021/ja512343w>
58. Suarez SA, Muñoz M, Alvarez L, et al (2017) HNO Is Produced by the Reaction of NO with Thiols. *J Am Chem Soc* 139:14483–14487. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06968>
59. Eberhardt M, Dux M, Namer B, et al (2014) H_2S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun* 5:. <https://doi.org/10.1038/ncomms5381>
60. Filipovic MR, Eberhardt M, Prokopovic V, et al (2013) Beyond H_2S and NO Interplay: Hydrogen Sulfide and Nitroprusside React Directly to Give Nitroxyl (HNO). A New Pharmacological Source of HNO. *J Med Chem* 56:1499–1508. <https://doi.org/10.1021/jm3012036>
61. Liochev SI, Fridovich I (2003) The mode of decomposition of Angeli's salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) and the effects thereon of oxygen, nitrite, superoxide dismutase, and glutathione. *Free Radic Biol Med* 34:1399–1404. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00111-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00111-4)
62. McIntyre SM, Ennis C, Garden AL (2023) A Computational Investigation into the Hydrogenation of NO on Water Ice Surfaces to Rationalize the $\text{NO}:\text{HNO}:\text{NOH}$ Disparity in Space. *ACS Earth Space Chem* 7:1195–1206. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.2c00391>
63. Gomes JRB, Ribeiro da Silva MDMC, Ribeiro da Silva MA V. (2004) Solvent and Structural Effects in the N–H Bond Homolytic Dissociation Energy. *J Phys Chem A* 108:2119–2130. <https://doi.org/10.1021/jp037996v>
64. LOPEZ B, SHINYASHIKI M, HAN T, FUKUTO J (2007) Antioxidant actions of nitroxyl (HNO). *Free Radic Biol Med* 42:482–491. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.015>
65. Lind J, Merényi G (2006) Kinetic and Thermodynamic Properties of the Aminoxyl ($\text{NH}_2\text{O}^\bullet$) Radical. *J Phys Chem A* 110:192–197. <https://doi.org/10.1021/jp054747t>
66. Kohout FC, Lampe FW (1965) On the Role of the Nitroxyl Molecule in the Reaction of Hydrogen Atoms with Nitric Oxide. *J Am Chem Soc* 87:5795
67. Smith PAS, Hein GE (1960) The Alleged Role of Nitroxyl in Certain Reactions of Aldehydes and Alkyl Halides1. *J Am Chem Soc* 82:5731–5740
68. Zhang K, Thynell ST (2017) Examination of the Mechanism of the Yield of N_2O from Nitroxyl (HNO) in the Solution Phase by Theoretical Calculations. *J Phys Chem A* 121:4505–4516. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b01152>
69. Bringas M, Semelak J, Zeida A, Estrin DA (2016) Theoretical investigation of the mechanism of nitroxyl decomposition in aqueous solution. *J Inorg Biochem* 162:102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.06.016>
70. Zhao Y-L, Bartberger MD, Goto K, et al (2005) Theoretical Evidence for Enhanced NO Dimerization in Aromatic Hosts: Implications for the Role of the Electrophile (NO) $_2$ in Nitric Oxide Chemistry. *J Am Chem Soc* 127:7964–7965. <https://doi.org/10.1021/ja042247s>
71. Kukolich SG (1982) The structure of the nitric oxide dimer. *J Am Chem Soc* 104:4715–4716. <https://doi.org/10.1021/ja00381a052>
72. Dinerman CE, Ewing GE (1970) Infrared Spectrum, Structure, and Heat of Formation of Gaseous (NO) $_2$. *J Chem Phys* 53:626–631. <https://doi.org/10.1063/1.1674038>
73. Billingsley J, Callear AB (1971) Investigation of the 2050 Å system of the nitric oxide dimer. *Trans Faraday Soc* 67:589–597. <https://doi.org/10.1039/TF9716700589>
74. East ALL, McKellar ARW, Watson JKG (1998) The intermolecular vibrations of the NO dimer. *J Chem Phys* 109:4378–4383. <https://doi.org/10.1063/1.477040>
75. Forte E, Van Den Bergh H (1978) The heat of formation of the nitric oxide dimer and its UV spectrum. *Chem Phys* 30:325–331. [https://doi.org/10.1016/0301-0104\(78\)87004-9](https://doi.org/10.1016/0301-0104(78)87004-9)
76. Poskrebyshev G a, Shafirovich V, Lyman S V (2004) Hyponitrite radical, a stable adduct of nitric oxide and nitroxyl. *J Am Chem Soc* 126:891–899. <https://doi.org/10.1021/ja0380421>

77. Lymar S V, Shafirovich V, Poskrebyshv GA (2005) One-electron reduction of aqueous nitric oxide: a mechanistic revision. *Inorg Chem* 44:5212–5221. <https://doi.org/10.1021/ic0501317>
78. Van Stappen C, Goodrich LE, Lehnert N (2017) The Interaction of HNO With Transition Metal Centers and Its Biological Significance. Insight Into Electronic Structure From Theoretical Calculations. In: *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Elsevier, pp 155–192
79. Ford PCPCPC, Lorkovic IMIM (2002) Mechanistic Aspects of the Reactions of Nitric Oxide with Transition-Metal Complexes. *Chem Rev* 102:993–1018. <https://doi.org/10.1021/cr0000271>
80. Doctorovich F, Bikiel DEE, Pellegrino J, et al (2012) Azanone (HNO) interaction with Hemeproteins and metalloporphyrins
81. Khade RL, Yang Y, Shi Y, Zhang Y (2016) HNO-Binding in Heme Proteins: Effects of Iron Oxidation State, Axial Ligand, and Protein Environment. *Angewandte Chemie* 128:15282–15285. <https://doi.org/10.1002/ange.201608539>
82. Paolocci N, Jackson MI, Lopez BE, et al (2007) The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: not just the Janus face of NO. *Pharmacol Ther* 113:442–458. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.002>
83. Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ (1982) Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: Effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys* 218:187–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(82\)90335-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90335-6)
84. Bazylnski DA, Hollocher TC (1985) Metmyoglobin and methemoglobin as efficient traps for nitrosyl hydride (nitroxyl) in neutral aqueous solution. *J Am Chem Soc* 107:7982–7986. <https://doi.org/10.1021/ja00312a031>
85. Bazylnski DA, Hollocher TC (1985) Evidence from the reaction between trioxodinitrate (II) and 15NO that trioxodinitrate (II) decomposes into nitrosyl hydride and nitrite in neutral aqueous solution. *Inorg Chem* 24:4285–4288
86. Marti MA, Capece L, Bidon-Chanal A, et al (2008) Nitric Oxide Reactivity with Globins as Investigated Through Computer Simulation. pp 477–498
87. Milani M, Pesce A, Nardini M, et al (2005) Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *J Inorg Biochem* 99:97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.10.035>
88. Kumar MR, Pervitsky D, Chen L, et al (2009) Nitrosyl Hydride (HNO) as an O₂ Analogue: Long-Lived HNO Adducts of Ferrous Globins. *Biochemistry* 48:5018–5025. <https://doi.org/10.1021/bi900122r>
89. Hoshino M, Laverman L, Ford PCPC (1999) Nitric oxide complexes of metalloporphyrins: an overview of some mechanistic studies. *Coord Chem Rev* 187:75–102. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(98\)00228-8](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(98)00228-8)
90. Doctorovich F, Bikiel DE, Pellegrino J, et al (2014) Reactions of HNO with metal porphyrins: Underscoring the biological relevance of HNO. *Acc Chem Res* 47:2907–2916. <https://doi.org/10.1021/ar500153c>
91. Conradie J, Ghosh A (2016) Metalloporphyrin–Nitroxyl Interactions: The Low-Energy States of Reduced Manganese, Iron, and Cobalt Porphyrin Nitrosyls. *J Phys Chem B* 120:4972–4979. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b04983>
92. Yang L, Fang W, Zhang Y (2012) Metal centre effects on HNO binding in porphyrins and the electronic origin: metal's electronic configuration, position in the periodic table, and oxidation state. *Chem Commun (Camb)* 48:3842–3844. <https://doi.org/10.1039/c2cc31016c>
93. Basudhar D, Ridnour LA, Cheng R, et al (2016) Biological signaling by small inorganic molecules. *Coord Chem Rev* 306:708–723. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.001>
94. Bryukov MG, Kachanov AA, Timonnen R, et al (1993) Kinetics of HNO reactions with O₂ and HNO. *Chem Phys Lett* 208:392–398. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(93\)87161-U](https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)87161-U)
95. Fukuto JM, Hobbs AJ, Ignarro LJ (1993) Conversion of Nitroxyl (HNO) to Nitric Oxide (NO) in Biological Systems: The Role of Physiological Oxidants and Relevance to the Biological Activity of HNO. *Biochem Biophys Res Commun* 196:707–713. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2307>
96. Wink DA, Miranda KM, Katori T, et al (2003) Orthogonal properties of the redox siblings nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system: a novel redox paradigm. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285:H2264–H2276. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00531.2003>
97. Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B (2010) Peroxynitrite Is the Major Species Formed from Different Flux Ratios of Co-generated Nitric Oxide and Superoxide. *Journal of Biological Chemistry* 285:14210–14216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110080>
98. Smulik R, Dębski D, Zielonka J, et al (2014) Nitroxyl (HNO) Reacts with Molecular Oxygen and Forms Peroxynitrite at Physiological pH. *Journal of Biological Chemistry* 289:35570–35581. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597740>
99. Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, et al (1998) The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch Biochem Biophys* 351:66–74. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0565>
100. Ford PC, Miranda KM (2020) The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* 103:31–46. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.07.004>
101. Katori T, Donzelli S, Tocchetti CG, et al (2006) Peroxynitrite and myocardial contractility: In vivo versus in vitro effects. *Free Radic Biol Med* 41:1606–1618. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.08.023>

102. Chazotte-Aubert L, Oikawa S, Gilibert I, et al (1999) Cytotoxicity and Site-specific DNA Damage Induced by Nitroxyl Anion (NO⁻) in the Presence of Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry* 274:20909–20915. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20909>
103. Guardia CMA, González Lebrero MC, Bari SE, Estrin DA (2008) QM–MM investigation of the reaction products between nitroxyl and O₂ in aqueous solution. *Chem Phys Lett* 463:112–116. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.08.064>
104. Kirsch M, de Groot H (2002) Formation of Peroxynitrite from Reaction of Nitroxyl Anion with Molecular Oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 277:13379–13388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108079200>
105. Goldstein S, Czapski G (1995) THE REACTION OF NO WITH O₂^{*}- AND HO₂^{*}: A PULSE RADIOLYSIS STUDY. *Free Radic Biol Med* 19:505–510
106. Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18:195–199
107. Goldstein S, Czapski G (1996) Mechanism of the Nitrosation of Thiols and Amines by Oxygenated • NO Solutions: the Nature of the Nitrosating Intermediates. *J Am Chem Soc* 118:3419–3425. <https://doi.org/10.1021/ja9536680>
108. Möller MN, Li Q, Vitturi DA, et al (2007) Membrane “Lens” Effect: Focusing the Formation of Reactive Nitrogen Oxides from the • NO/O₂ Reaction. *Chem Res Toxicol* 20:709–714. <https://doi.org/10.1021/tx700010h>
109. Möller M, Botti H, Batthyany C, et al (2005) Direct Measurement of Nitric Oxide and Oxygen Partitioning into Liposomes and Low Density Lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 280:8850–8854. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413699200>
110. Doyle MP, Mahapatro SN, Broene RD, Guy JK (1988) Oxidation and reduction of hemoproteins by trioxodinitrate (II). The role of nitrosyl hydride and nitrite. *J Am Chem Soc* 110:593–599. <https://doi.org/10.1021/ja00210a047>
111. Keceli G, Majumdar A, Thorpe CN, et al (2019) Nitroxyl (HNO) targets phospholamban cysteines 41 and 46 to enhance cardiac function. *Journal of General Physiology* 151:758–770. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812208>
112. Wong PSY, Hyun J, Fukuto JM (1998) Reaction between S-nitrosothiols and thiols: generation of nitroxyl (HNO) and subsequent chemistry. *Biochemistry* 37:5362–5371
113. Donzelli S, Espey MG, Thomas DD, et al (2006) Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med* 40:1056–1066. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.058>
114. Donzelli S, Espey MG, Flores-Santana W, et al (2008) Generation of nitroxyl by heme protein-mediated peroxidation of hydroxylamine but not N-hydroxy-L-arginine. *Free Radic Biol Med* 45:578–584. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.036>
115. Fukuto JM, Carrington SJ (2011) HNO signaling mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 14:1649–1657. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3855>
116. Sherman MP, Grither WR, McCulla RD (2010) Computational investigation of the reaction mechanisms of nitroxyl and thiols. *J Org Chem* 75:4014–4024. <https://doi.org/10.1021/jo100172t>
117. Smulik-Izydorczyk R, Dębowska K, Rostkowski M, et al (2021) Kinetics of Azanone (HNO) Reactions with Thiols: Effect of pH. *Cell Biochem Biophys* 79:845–856. <https://doi.org/10.1007/s12013-021-00986-x>
118. Zarenkiewicz J, Khodade VS, Toscano JP (2021) Reaction of Nitroxyl (HNO) with Hydrogen Sulfide and Hydropersulfides. *J Org Chem* 86:868–877. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02412>
119. Shaikh N, Valiev M, Lymar S V (2014) Decomposition of amino diazeniumdiolates (NONOates): Molecular mechanisms. *J Inorg Biochem* 141:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.08.008>
120. Doctorovich F, Bikiel DE, Pellegrino J, et al (2012) Azanone (HNO) interaction with Heme proteins and metalloporphyrins. pp 97–139
121. Rosenthal J, Lippard SJ (2010) Direct detection of nitroxyl in aqueous solution using a tripodal copper (II) BODIPY complex. *J Am Chem Soc* 132:5536–5537
122. Michael MA, Pizzella G, Yang L, et al (2014) HNO/NO Conversion Mechanisms of Cu-Based HNO Probes with Implications for Cu,Zn-SOD. *J Phys Chem Lett* 5:1022–1026. <https://doi.org/10.1021/jz5002902>
123. Shi Y, Michael MA, Zhang Y (2021) HNO to NO Conversion Mechanism with Copper Zinc Superoxide Dismutase, Comparison with Heme Protein Mediated Conversions, and the Origin of Questionable Reversibility. *Chemistry – A European Journal* 27:5019–5027. <https://doi.org/10.1002/chem.202100015>
124. Keceli G, Moore CD, Toscano JP (2014) Comparison of HNO reactivity with tryptophan and cysteine in small peptides. *Bioorg Med Chem Lett* 24:3710–3713. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.014>
125. Peyrot F, Fernandez BO, Bryan NS, et al (2006) N-Nitroso Products from the Reaction of Indoles with Angeli’s Salt. *Society* 58–67
126. Smulik-Izydorczyk R, Mesjasz A, Gerbich A, et al (2017) A kinetic study on the reactivity of azanone (HNO) toward its selected scavengers: Insight into its chemistry and detection. *Nitric Oxide* 69:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.05.003>
127. Jackson MI, Han TH, Serbulea L, et al (2009) Kinetic feasibility of nitroxyl reduction by physiological reductants and biological implications. *Free Radic Biol Med* 47:1130–1139. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.034>
128. Martí MA, Bari SE, Estrin DA, Doctorovich F (2005) Discrimination of nitroxyl and nitric oxide by water-soluble Mn(III) porphyrins. *J Am Chem Soc* 127:4680–4684. <https://doi.org/10.1021/ja044632n>

129. Bari SE, Martí MA, Amorebieta VT, et al (2003) Fast Nitroxyl Trapping by Ferric Porphyrins. *J Am Chem Soc* 125:15272–15273. <https://doi.org/10.1021/ja036370f>
130. Álvarez L, Suarez SAASASA, Bikiel DEEDE, et al (2014) Redox potential determines the reaction mechanism of HNO donors with Mn and Fe porphyrins: defining the better traps. *Inorg Chem* 53:7351–7360. <https://doi.org/10.1021/ic5007082>
131. Suárez SA, Bikiel DE, Wetzler DE, et al (2013) Time-Resolved Electrochemical Quantification of Azanone (HNO) at Low Nanomolar Level. *Anal Chem* 85:10262–10269. <https://doi.org/10.1021/ac402134b>
132. Doctorovich FSSMM& BF (2018) International Patent HNO Biosensor
133. Reisz JA, Zink CN, King SB (2011) Rapid and Selective Nitroxyl (HNO) Trapping by Phosphines: Kinetics and New Aqueous Ligations for HNO Detection and Quantitation. *J Am Chem Soc* 133:11675–11685. <https://doi.org/10.1021/ja203652z>
134. Miao Z, Reisz JA, Mitroka SM, et al (2015) A selective phosphine-based fluorescent probe for nitroxyl in living cells. *Bioorg Med Chem Lett* 25:16–19. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.041>
135. Iverson N, Hofferber E, Stapleton J (2018) Nitric Oxide Sensors for Biological Applications. *Chemosensors* 6:8. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6010008>
136. Brown MD, Schoenfish MH (2019) Electrochemical Nitric Oxide Sensors: Principles of Design and Characterization. *Chem Rev* 119:11551–11575. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00797>
137. Alday J, Mazzeo A, Suarez S (2020) Selective detection of gasotransmitters using fluorescent probes based on transition metal complexes. *Inorganica Chim Acta* 510:119696. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119696>
138. Luo F, Zhang Y, Zhang S, et al (2024) Rational design of Near-Infrared fluorescent probe for monitoring HNO in plants. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 321:124672. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124672>
139. Fukuto JM, Bartberger MD, Dutton AS, et al (2005) The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): the neglected, misunderstood, and enigmatic nitrogen oxide. *Chem Res Toxicol* 18:790–801. <https://doi.org/10.1021/tx0496800>
140. Smulik-Izydorczyk R, Dębowska K, Pięta J, et al (2018) Fluorescent probes for the detection of nitroxyl (HNO). *Free Radic Biol Med* 128:69–83. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.564>
141. Pino RZ, Feelisch M (1994) Bioassay discrimination between nitric oxide (NO.) and nitroxyl (NO-) using L-cysteine. *Biochem Biophys Res Commun* 201:54–62. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1668>
142. Shoeman DW, Shirota FN, DeMaster EG, Nagasawa HT (2000) Reaction of Nitroxyl, an Aldehyde Dehydrogenase Inhibitor, with N-Acetyl-L-Cysteine. *Alcohol* 20:55–59. [https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(99\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(99)00056-7)
143. Amarakoon TN, Ke N, Aspinwall CA, Miranda KM (2022) Quantification of intracellular HNO delivery with capillary zone electrophoresis. *Nitric Oxide* 118:49–58. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2021.10.005>
144. Samuni U, Samuni Y, Goldstein S (2010) On the distinction between nitroxyl and nitric oxide using nitronyl nitroxides. *J Am Chem Soc* 132:8428–8432. <https://doi.org/10.1021/ja101945j>
145. Bobko AA, Ivanov A, Khramtsov V V (2013) Discriminative EPR detection of NO and HNO by encapsulated nitronyl nitroxides. *Free Radic Res* 47:74–81
146. Chavez TA, Toscano JP (2017) Detection of HNO by membrane inlet mass spectrometry. In: Doctorovich F, Farmer PJ, Martí MA (eds) *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Elsevier, pp 255–267
147. Ren M, Dong B, Lin W (2017) Fluorescent Probes for HNO Detection. In: *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Elsevier, pp 207–224
148. Pschepiurca MER, Vadra N, Suarez SA (2023) Versatile Metalloporphyrin-Based Electrochemical Sensing Applications: From Small Gasotransmitters to Macromolecules. *Eur J Inorg Chem* 26:. <https://doi.org/10.1002/ejic.202300005>
149. Suárez SA, Fonticelli MH, Rubert AA, et al (2010) A surface effect allows HNO/NO discrimination by a cobalt porphyrin bound to gold. *Inorg Chem* 49:. <https://doi.org/10.1021/ic1007022>
150. Hoch G, Kok B (1963) A mass spectrometer inlet system for sampling gases dissolved in liquid phases. *Arch Biochem Biophys* 101:160–170. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90546-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90546-0)
151. TU C, SWENSON E, SILVERMAN D (2007) Membrane inlet for mass spectrometric measurement of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 43:1453–1457. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.026>
152. Cline MR, Tu C, Silverman DN, Toscano JP (2011) Detection of nitroxyl (HNO) by membrane inlet mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 50:1274–1279. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.008>
153. Lambert RM (1966) Mass-spectrometric study of the system H + NO. *Chemical Communications (London)* 850. <https://doi.org/10.1039/c19660000850>
154. Han R, Yu J, Wang Y, et al (2024) A lysosome-targeting ratiometric fluorescent probe used to detect Nitroxyl (HNO) in a Parkinson's disease model. *Sens Actuators B Chem* 398:134455. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134455>
155. Wu C, Wu KJ, Kang TS, et al (2018) Iridium-based probe for luminescent nitric oxide monitoring in live cells. *Sci Rep* 8:8–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30991-9>
156. Kang H, Shu W, Yu J, et al (2023) Endoplasmic Reticulum-Targeted Two-Photon Fluorescent Probe for the Detection of Nitroxyl in a Parkinson's Disease Model. *Anal Chem* 95:6295–6302. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05127>

157. Huang Y, Zhang X, He N, et al (2019) Imaging of anti-inflammatory effects of HNO via a near-infrared fluorescent probe in cells and in rat gouty arthritis model. *J Mater Chem B* 7:305–313. <https://doi.org/10.1039/C8TB02494D>
158. Wei C, Wang X, Li XX, et al (2020) An isophorone-fused near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for imaging endogenous nitroxyl in living cells and zebrafish. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 227:117765. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117765>
159. Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Suarez S, et al (2023) Discovery of endogenous nitroxyl as a new redox player in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Plants* 9:36–44. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01301-z>
160. Miranda KM, Paolocci N, Katori T, et al (2003) A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:9196–9201. <https://doi.org/10.1073/pnas.1430507100>
161. Cline MR, Toscano JP (2011) Detection of nitroxyl (HNO) by a prefluorescent probe. *J Phys Org Chem* 24:993–998. <https://doi.org/10.1002/poc.1871>
162. Allen DW (2003) Phosphines and Phosphonium Salts. *ChemInform* 34:. <https://doi.org/10.1002/chin.200321242>
163. Miao J, Huo Y, Lv X, et al (2016) Fast-response and highly selective fluorescent probes for biological signaling molecule NO based on N-nitrosation of electron-rich aromatic secondary amines. *Biomaterials* 78:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.011>
164. Maiti D, Islam ASM, Dutta A, et al (2019) Dansyl-appended Cu II -complex-based nitroxyl (HNO) sensing with living cell imaging application and DFT studies. *Dalton Transactions* 48:2760–2771. <https://doi.org/10.1039/C8DT04564J>
165. Au-Yeung HY, Chan CY, Tong KY, Yu ZH (2017) Copper-based reactions in analyte-responsive fluorescent probes for biological applications. *J Inorg Biochem* 177:300–312. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.001>
166. Apfel U-P, Buccella D, Wilson JJ, Lippard SJ (2013) Detection of Nitric Oxide and Nitroxyl with Benzoesorufin-Based Fluorescent Sensors. *Inorg Chem* 52:3285–3294. <https://doi.org/10.1021/ic302793w>
167. Sun X, Kim G, Xu Y, et al (2016) A Water-Soluble Copper(II) Complex for the Selective Fluorescence Detection of Nitric Oxide/Nitroxyl and Imaging in Living Cells. *Chempluschem* 81:30–34. <https://doi.org/10.1002/cplu.201500436>
168. Wrobel AT, Johnstone TC, Deliz Liang A, et al (2014) A Fast and Selective Near-Infrared Fluorescent Sensor for Multicolor Imaging of Biological Nitroxyl (HNO). *J Am Chem Soc* 136:4697–4705. <https://doi.org/10.1021/ja500315x>
169. DeMaster EC, Shirota FN, Nagasawa HT (1985) Catalase mediated conversion of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 2:117–121. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(85\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0741-8329(85)90027-8)
170. Norris AJ, Sartippour MR, Lu M, et al (2007) Nitroxyl inhibits breast tumor growth and angiogenesis. *Int J Cancer* 122:1905–1910. <https://doi.org/10.1002/ijc.23305>
171. Shoman ME, Aly OM (2016) Nitroxyl (HNO): A Reduced Form of Nitric Oxide with Distinct Chemical, Pharmacological, and Therapeutic Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/4867124>
172. E. Shoman M, M. Aly O (2016) Nitroxyl (HNO): A Possible Strategy for Fighting Cancer. *Curr Top Med Chem* 16:2464–2470. <https://doi.org/10.2174/1568026616666160212123006>
173. Sun H-J, Lee W-T, Leng B, et al (2020) Nitroxyl as a Potential Theranostic in the Cancer Arena. *Antioxid Redox Signal* 32:331–349. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7904>
174. Switzer CH, Flores-Santana W, Mancardi D, et al (2009) The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent. *Biochim Biophys Acta* 1787:835–840. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.04.015>
175. Gastreich-Seelig M, Jimenez M, Pouokam E (2020) Mechanisms Associated to Nitroxyl (HNO)-Induced Relaxation in the Intestinal Smooth Muscle. *Front Physiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00438>
176. Pouokam E (2023) Effects of the gaseous signalling molecule nitroxyl (HNO) on myenteric neurons governing intestinal motility. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 34:683–687. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2022-0233>
177. Qin CX, Anthonisz J, Leo CH, et al (2020) Nitric Oxide Resistance, Induced in the Myocardium by Diabetes, Is Circumvented by the Nitric Oxide Redox Sibling, Nitroxyl. *Antioxid Redox Signal* 32:60–77. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7706>
178. Li JC, Velagic A, Qin CX, et al (2021) Diabetes Attenuates the Contribution of Endogenous Nitric Oxide but Not Nitroxyl to Endothelium Dependent Relaxation of Rat Carotid Arteries. *Front Pharmacol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.585740>
179. Pagliaro P, Mancardi D, Rastaldo R, et al (2003) Nitroxyl affords thiol-sensitive myocardial protective effects akin to early preconditioning. *Free Radic Biol Med* 34:33–43. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01179-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01179-6)
180. Väänänen AJ, Salmenperä P, Hukkanen M, et al (2008) Persistent susceptibility of cathepsin B to irreversible inhibition by nitroxyl (HNO) in the presence of endogenous nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 45:749–755. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.025>
181. Kim W-K, Choi Y-B, Rayudu P V., et al (1999) Attenuation of NMDA Receptor Activity and Neurotoxicity by Nitroxyl Anion, NO⁻. *Neuron* 24:461–469. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80859-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80859-4)
182. Hoffman MD, Walsh GM, Rogalski JC, Kast J (2009) Identification of Nitroxyl-induced Modifications in Human Platelet Proteins Using a Novel Mass Spectrometric Detection Method. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:887–903. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800230-MCP200>

183. Fukuto JM, Chiang K, Hsieh R, et al (1992) The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 263:546–551
184. Arrigo E, Comità S, Pagliaro P, et al (2023) Clinical Applications for Gasotransmitters in the Cardiovascular System: Are We There Yet? *Int J Mol Sci* 24:12480. <https://doi.org/10.3390/ijms241512480>
185. Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, et al (2007) Nitroxyl Improves Cellular Heart Function by Directly Enhancing Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Cycling. *Circ Res* 100:96–104. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000253904.53601.c9>
186. Sun HJ, Wu ZY, Cao L, et al (2020) Role of nitroxyl (HNO) in cardiovascular system: From biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Res* 159:104961. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104961>
187. Tocchetti CG, Mercurio V, Maack C (2021) The multifaceted mechanisms of nitroxyl in heart failure: inodilator or ‘only’ vasodilator? *Eur J Heart Fail* 23:1156–1159. <https://doi.org/10.1002/ejhf.2204>
188. Solaro RJ (2007) Nitroxyl effects on myocardium provide new insights into the significance of altered myofilament response to calcium in the regulation of contractility. *J Physiol* 580:697–697. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.131649>
189. Felker GM, Borentain M, Cleland JG, et al (2019) Rationale and design for the development of a novel nitroxyl donor in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 21:1022–1031. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1504>
190. Kamynina A, Guttzeit S, Eaton P, Cuellar F (2022) Nitroxyl Donor CXL-1020 Lowers Blood Pressure by Targeting C195 in Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase I. *Hypertension* 79:946–956. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.18756>
191. Huerta (1992) Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics (Review). *Int J Oncol.* https://doi.org/10.3892/ijo_00000079
192. Keefer LK, Nims RW, Davies KM, Wink DA (1996) “NONOates”(1-substituted diazen-1-ium-1, 2-diols) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 268:281
193. Naghavi N, de Mel A, Alavijeh OS, et al (2013) Nitric Oxide Donors for Cardiovascular Implant Applications. *Small* 9:22–35. <https://doi.org/10.1002/smll.201200458>
194. Muniz Carvalho E, Silva Sousa EH, Bernardes-Génisson V, Gonzaga de França Lopes L (2021) When NO. Is not Enough: Chemical Systems, Advances and Challenges in the Development of NO. and HNO Donors for Old and Current Medical Issues. *Eur J Inorg Chem* 2021:4316–4348. <https://doi.org/10.1002/ejic.202100527>
195. Smulik-Izydorczyk R, Pięta J, Michalski R, et al (2024) The chemistry of HNO-releasing compounds. *Redox Biochemistry and Chemistry* 8:100031. <https://doi.org/10.1016/j.rbc.2024.100031>
196. Hughes MN, Cammack R (1999) Synthesis, chemistry, and applications of nitroxyl ion releasers sodium trioxodinitrate or Angeli's salt and piloty's acid. *Methods Enzymol* 301:279–287
197. Carrone G, Pellegrino J, Doctorovich F (2017) Rapid generation of HNO induced by visible light. *Chemical Communications* 53:. <https://doi.org/10.1039/c7cc02186k>
198. Carrone G, Mazzeo A, Marceca E, et al (2021) Solid-gas reactions for nitroxyl (HNO) generation in the gas phase. *J Inorg Biochem* 223:. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111535>
199. Hartman JC, del Rio CL, Reardon JE, et al (2018) Intravenous Infusion of the Novel HNO Donor BMS-986231 Is Associated With Beneficial Inotropic, Lusitropic, and Vasodilatory Properties in 2 Canine Models of Heart Failure. *JACC Basic Transl Sci* 3:625–638. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.07.003>
200. Puglisi MP, Bradaric MJ, Pontikis J, et al (2018) Novel primary amine diazeniumdiolates—Chemical and biological characterization. *Drug Dev Res* 79:136–143. <https://doi.org/10.1002/ddr.21428>
201. Miranda KM, Nagasawa HT, Toscano JP (2005) Donors of HNO. *Curr Top Med Chem* 5:649–664
202. Maragos CM, Morley D, Wink DA, et al (1991) Complexes of. NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34:3242–3247
203. Guthrie D a, Kim NY, Siegler M a, et al (2012) Development of N-substituted hydroxylamines as efficient nitroxyl (HNO) donors. *J Am Chem Soc* 134:1962–1965. <https://doi.org/10.1021/ja2103923>
204. Guthrie DA, Nourian S, Takahashi CG, Toscano JP (2015) Curtailing the Hydroxylaminobarbituric Acid–Hydantoin Rearrangement To Favor HNO Generation. *J Org Chem* 80:1349–1356. <https://doi.org/10.1021/jo5023316>
205. Guthrie DA, Ho A, Takahashi CG, et al (2015) “Catch-and-Release” of HNO with Pyrazolones. *J Org Chem* 80:1338–1348. <https://doi.org/10.1021/jo502330w>
206. Nourian S, Zilber ZA, Toscano JP (2016) Development of N-Substituted Hydroxamic Acids with Pyrazolone Leaving Groups as Nitrosocarbonyl Precursors. *J Org Chem* 81:9138–9146. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b01705>
207. Nourian S, Lesko RP, Guthrie DA, Toscano JP (2016) Nitrosocarbonyl release from O-substituted hydroxamic acids with pyrazolone leaving groups. *Tetrahedron* 72:6037–6042. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.08.016>
208. Adachi Y, Nakagawa H, Matsuo K, et al (2008) Photoactivatable HNO-releasing compounds using the retro-Diels-Alder reaction. *Chem Commun (Camb)* 5149–5151. <https://doi.org/10.1039/b811985f>

209. Matsuo K, Nakagawa H, Adachi Y, et al (2010) Alternative photoinduced release of HNO or NO from an acyl nitroso compound, depending on environmental polarity. *Chem Commun (Camb)* 46:3788–3790. <https://doi.org/10.1039/c001502d>
210. Sha X, Isbell TS, Patel RP, et al (2006) Hydrolysis of acyloxy nitroso compounds yields nitroxyl (HNO). *J Am Chem Soc* 128:9687–9692. <https://doi.org/10.1021/ja062365a>
211. Zhou Y, Cink RB, Dassanayake RS, et al (2016) Rapid Photoactivated Generation of Nitroxyl (HNO) under Neutral pH Conditions. *Angewandte Chemie* 128:13423–13426. <https://doi.org/10.1002/ange.201605160>
212. Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.339>
213. Li H, Poulos TL (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* 99:293–305. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.10.016>
214. Adak S, Wang Q, Stuehr DJ (2000) Arginine conversion to nitroxide by tetrahydrobiopterin-free neuronal nitric-oxide synthase. Implications for mechanism. *J Biol Chem* 275:33554–33561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004337200>
215. Schmidt HHHW, Hofmann H, Schindler U, et al (1996) No .NO from NO synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:14492–14497. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14492>
216. Feelisch M, Te Poel M, Zamora R, et al (1994) Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 368:62–65. <https://doi.org/10.1038/368062a0>
217. Ishimura Y, Gao YT, Panda SP, et al (2005) Detection of nitrous oxide in the neuronal nitric oxide synthase reaction by gas chromatography–mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 338:543–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.202>
218. Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ (1994) Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10992–10996
219. Murphy ME, Sies H (1991) Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:10860–10864. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10860>
220. Álvarez L, Suárez SA, González PJ, et al (2020) The Underlying Mechanism of HNO Production by the Myoglobin-Mediated Oxidation of Hydroxylamine. *Inorg Chem* 59:7939–7952. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b02750>
221. Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Wink DA (2002) Ingress and reactive chemistry of nitroxyl-derived species within human cells. *Free Radic Biol Med* 33:827–834. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00978-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00978-4)
222. Miranda KM, Nims RW, Thomas DD, et al (2003) Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins: A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS. *J Inorg Biochem* 93:52–60. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00498-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00498-1)
223. Reisz JA, Bechtold E, King SB (2010) Oxidative heme protein-mediated nitroxyl (HNO) generation. *Dalton Trans* 39:5203–5212
224. Zeng B-B, Huang J, Wright MW, King SB (2004) Nitroxyl (HNO) release from new functionalized N-hydroxyurea-derived acyl nitroso-9,10-dimethylantracene cycloadducts. *Bioorg Med Chem Lett* 14:5565–5568. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.062>
225. Niketić V, Stojanović S, Nikolić A, et al (1999) Exposure of Mn and FeSODs, but not Cu/ZnSOD, to NO leads to nitrosonium and nitroxyl ions generation which cause enzyme modification and inactivation: an in vitro study. *Free Radic Biol Med* 27:992–996. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00256-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00256-1)
226. Ivanović-Burmazović I (2017) HNO Generation From NO, Nitrite, Inorganic or Organic Nitrosyls, and Crosstalk With H₂S. In: *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Elsevier, pp 67–104
227. Bykov D, Neese FJ (2012) Reductive activation of the heme iron-nitrosyl intermediate in the reaction mechanism of cytochrome c nitrite reductase: a theoretical study. *J Biol Inorg Chem* 17:741–760
228. Bykov D, Plog M, Neese F (2014) Heme-bound nitroxyl, hydroxylamine, and ammonia ligands as intermediates in the reaction cycle of cytochrome c nitrite reductase: a theoretical study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19:97–112. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1065-6>
229. Einsle O, Messerschmidt A, Huber R, et al (2002) Mechanism of the six-electron reduction of nitrite to ammonia by cytochrome c nitrite reductase. *J Am Chem Soc* 124:11737–11745
230. Hamer M, Suarez SA, Neuman NI, et al (2015) Discussing Endogenous NO•/HNO Interconversion Aided by Phenolic Drugs and Vitamins. *Inorg Chem* 54:9342–9350. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01347>
231. Mariana Hamer, Sebastián Suarez, Martina Muñoz, Lucía Álvarez MM and FD (2020) Reaction of Amines with NO at room temperature and atmospheric pressure: is nitroxyl a reaction intermediate? *Pure and Applied Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/pac-2020-0601>
232. Pryor W, Church D, Govindan C (1982) Oxidation of thiols by nitric oxide and nitrogen dioxide: synthetic utility and toxicological implications. *The Journal of Organic V*:156–159. <https://doi.org/10.1021/jo00340a038>
233. Michalski R, Smulik-Izydorszyk R, Pięta J, et al (2022) The Chemistry of HNO: Mechanisms and Reaction Kinetics. *Front Chem* 10:1–24. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.930657>

234. DeMaster EG, Quast BJ, Redfern B, Nagasawa HT (1995) Reaction of Nitric Oxide with the Free Sulfhydryl Group of Human Serum Albumin Yields a Sulfenic Acid and Nitrous Oxide. *Biochemistry* 34:11494–11499. <https://doi.org/10.1021/bi00036a023>
235. Suarez SAA, Muñoz M, Bikiel DEE, et al (2016) Electrochemical Detection of Azanone
236. Aravindakumar CT, Ley M De, Ceulemans J (2002) Kinetics of the anaerobic reaction of nitric oxide with cysteine, glutathione and cysteine-containing proteins: implications for in vivo S-nitrosation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 663–669. <https://doi.org/10.1039/b107273k>
237. Neuman NI, Venâncio MF, Rocha WR, et al (2021) Nitric Oxide Reacts Very Fast with Hydrogen Sulfide, Alcohols, and Thiols to Produce HNO: Revised Rate Constants. *Inorg Chem* 60:15997–16007. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01061>
238. Carlsson DJ, Brousseau R, Zhang C, Wiles DM (1987) Polyolefin oxidation: Quantification of alcohol and hydroperoxide products by nitric oxide reactions. *Polym Degrad Stab* 17:303–318
239. J L, J CE (2002) Oxidation of DOPAC by nitric oxide: effect of superoxide dismutase. *Neurochem* 81(4):892–900
240. Carreras M (2004) Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med* 25:125–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.014>
241. Poderoso JJ, Carreras MC, Schöpfer F, et al (1999) The reaction of nitric oxide with ubiquinol: kinetic properties and biological significance. *Free Radic Biol Med* 26:925–935. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00277-9)
242. Drago RS, Paulik FE (1960) The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Diethylamine. *J Am Chem Soc* 82:96–98. <https://doi.org/10.1021/ja01486a021>
243. Drago RS, Karstetter BR (1961) The Reaction of Nitrogen(II) Oxide with Various Primary and Secondary Amines. *J Am Chem Soc* 83:1819–1822. <https://doi.org/10.1021/ja01469a012>
244. Turjanski AG, Leonik F, Estrin DA, et al (2000) Scavenging of NO by Melatonin. *J Am Chem Soc* 122:10468–10469. <https://doi.org/10.1021/ja002006u>
245. Itoh T, Nagata K, Matsuya Y, et al (1997) Reaction of Nitric Oxide with Amines. *J Org Chem* 62:3582–3585. <https://doi.org/10.1021/jo962101e>
246. ITOH T, MATSUYA Y, MAETA H, et al (1999) Reaction of Secondary and Tertiary Amines with Nitric Oxide in the Presence of Oxygen. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47:819–823. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.819>
247. Yong QC, Lee SW, Foo CS, et al (2008) Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295:H1330–H1340. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00244.2008>
248. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:15560–15565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705891104>
249. Kumar MR, Clover T, Olaitan AD, et al (2018) The reaction between GSNO and H₂S: On the generation of NO, HNO and N₂O. *Nitric Oxide* 77:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.04.012>
250. Cao X, Bian J-S (2018) The Interaction of NO and H₂S Signaling Systems in Biology and Medicine. In: *Gasotransmitters*. The Royal Society of Chemistry, pp 145–160
251. Kadlec M, Pintus E, Ros-Santaella JL (2022) The Interaction of NO and H₂S in Boar Spermatozoa under Oxidative Stress. *Animals* 12:602. <https://doi.org/10.3390/ani12050602>
252. Prime TA, Blaikie FH, Evans C, et al (2009) A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:10764–10769. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903250106>
253. Angelo M, Singel DJ, Stamler JS (2006) An S-nitrosothiol (SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:8366–8371. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600942103>
254. Arnette DR, Stamler JS (1995) NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys* 318:279–285. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1231>
255. Berenyiova A, Grman M, Mijuskovic A, et al (2015) The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide* 46:123–130. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.12.008>
256. Ivanova L V., Cibich D, Deye G, et al (2017) Modeling of S-Nitrosothiol-Thiol Reactions of Biological Significance: HNO Production by S-Thiolation Requires a Proton Shuttle and Stabilization of Polar Intermediates. *ChemBioChem* 18:726–738. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600556>
257. Konorev EA, Kalyanaraman B, Hogg N (2000) Modification of creatine kinase by S-nitrosothiols: S-nitrosation vs. S-thiolation. *Free Radic Biol Med* 28:1671–1678. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00281-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00281-1)
258. Smith BC, Marletta MA (2012) Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Curr Opin Chem Biol* 16:498–506. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.016>

259. DeMartino AW, Poudel L, Dent MR, et al (2023) Thiol-catalyzed formation of NO-ferroheme regulates intravascular NO signaling. *Nat Chem Biol* 19:1256–1266. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01413-3>
260. Broniowska KA, Hogg N (2012) The Chemical Biology of S-Nitrosothiols. *Antioxid Redox Signal* 17:969–980. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4590>
261. Hogg N (1999) The Kinetics of S-Transnitrosation—A Reversible Second-Order Reaction. *Anal Biochem* 272:257–262. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4199>
262. Ruiz F, Corrales FJ, Miqueo C, Mato JM (1998) Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-nitrosylation. *Hepatology* 28:1051–1057. <https://doi.org/10.1002/hep.510280420>
263. Ye H, Wu J, Liang Z, et al (2022) Protein S -Nitrosation: Biochemistry, Identification, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Applications. *J Med Chem* 65:5902–5925. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02194>
264. Sougrakpam Y, Babuta P, Deswal R (2023) Nitric oxide (NO) modulates low temperature-stress signaling via S-nitrosation, a NO PTM, inducing ethylene biosynthesis inhibition leading to enhanced post-harvest shelf-life of agricultural produce. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. <https://doi.org/10.1007/s12298-023-01371-z>
265. Schonhoff CM, Gaston B, Mannick JB (2003) Nitrosylation of Cytochrome c during Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278:18265–18270. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212459200>
266. Stomberski CT, Hess DT, Stamler JS (2019) Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxid Redox Signal* 30:1331–1351. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7403>
267. Tsikas D, Böhmer A (2017) S-Transnitrosation reactions of hydrogen sulfide (H₂S/HS⁻/S₂⁻) with S-nitrosated cysteinyl thiols in phosphate buffer of pH 7.4: Results and review of the literature. *Nitric Oxide* 65:22–36. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.02.001>
268. Kumar MR, Farmer PJ (2019) Characterization of Polysulfides, Polysulfanes, and Other Unique Species in the Reaction between GSNO and H₂S. *Molecules* 24:3090. <https://doi.org/10.3390/molecules24173090>
269. Kirsch M, Büscher A-M, Aker S, et al (2009) New insights into the S-nitrosothiol-ascorbate reaction. The formation of nitroxyl. *Org Biomol Chem* 7:1954–1962. <https://doi.org/10.1039/b901046g>
270. Kytzia A, Korth H, Sustmann R, et al (2006) On the Mechanism of the Ascorbic Acid-Induced Release of Nitric Oxide from N -Nitrosated Tryptophan Derivatives: Scavenging of NO by Ascorbyl Radicals. *Chemistry – A European Journal* 12:8786–8797. <https://doi.org/10.1002/chem.200600405>
271. Huges MN, Wimbeldon PE (1976) The chemistry of trioxodinitrates. Part I. Decomposition of sodium trioxodinitrate (Angeli's salt) in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* 703. <https://doi.org/10.1039/dt9760000703>
272. Suryaraman MG, Viswanathan Argot (1949) Preparation of nitric oxide: some laboratory methods. *J Chem Educ* 26:594. <https://doi.org/10.1021/ed026p594>
273. Lim MD, Lorković IM, Ford PC (2005) The Preparation of Anaerobic Nitric Oxide Solutions for the Study of Heme Model Systems in Aqueous and Nonaqueous Media: Some Consequences of NOx Impurities. 3–17. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)96001-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)96001-1)
274. Zacharia IG, Deen WM (2005) Diffusivity and Solubility of Nitric Oxide in Water and Saline. *Ann Biomed Eng* 33:214–222. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-8980-9>
275. Weigend F (2006) Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. *Phys Chem Chem Phys* 8:1057–65
276. Caldeweyher E, Ehlert S, Hansen A, et al (2019) A generally applicable atomic-charge dependent London dispersion correction. 150:154122
277. Marenich A, Cramer C, Truhlar D (2009) Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J Phys Chem B* 113:6378–6396
278. Neese F (2012) The ORCA Program System. *Wiley Interdiscip Rev: Comput Mol Sci* 2:73–78
279. HOUSECROFT CASA (2012) INORGANIC CHEMISTRY, 4th ed
280. de Carvalho LM, Schwedt G (2005) Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 1099:185–190. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.084>
281. Yoe JH, Edgar G (1923) The Reduction of an Indanthrene Dye by Means of Sodium Hydrosulfite. *J Phys Chem* 27:65–73. <https://doi.org/10.1021/j150226a003>
282. Carter HA (1996) The Chemistry of Paper Preservation: Part 2. The Yellowing of Paper and Conservation Bleaching. *J Chem Educ* 73:1068. <https://doi.org/10.1021/ed073p1068>
283. Ignatowska J, Dmowski W (2006) Sodium dithionite initiated addition of 1-bromo-1-chloro-2,2,2-trifluoroethane to allyl aromatics. *J Fluor Chem* 127:720–729. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2006.01.007>
284. Plenkiewicz H, Dmowski W, Lipiński M (2001) Sodium dithionite initiated reactions of Halothane® with enol ethers. *J Fluor Chem* 111:227–232. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00459-6)
285. Li Y, Liu T, Qiu G, Wu J (2019) Catalyst-Free Sulfonylation of (Hetero)aryl Iodides with Sodium Dithionite. *Adv Synth Catal* 361:1154–1159. <https://doi.org/10.1002/adsc.201801445>

286. Seidmohammadi A, Asgari G, Sharifi Z, et al (2017) Study of the residual Sodium Hydrosulfite (Dithionite) levels in produced industrial breads: case study in Hamadan. *Pajouhan Scientific Journal* 15:23–28. <https://doi.org/10.21859/psj-15034>
287. Tabata S, Kamimura H, Ibe A, et al (1994) Degradation of Aflatoxins by Food Additives. *J Food Prot* 57:42–47. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.1.42>
288. Wang S, Wu W, Lv J, et al (2024) Fast detection of sodium dithionite in sugar using a xanthylum-based fluorescent probe. *Food Chem* 452:139547. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139547>
289. Li H-X, Han S-Y, Ma X, et al (2012) The saponin of red ginseng protects the cardiac myocytes against ischemic injury in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 19:477–483. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.01.002>
290. Sun J, Li Y, Ding Y, et al (2014) Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions in vitro and cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo. *Brain Res* 1589:126–139. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.039>
291. Wilkins RG (1991) Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes. Wiley
292. Worthington P, Hambright P (1980) Kinetics of the oxidation of dithionite by dicyanoporphyrinato ferrate(III) complexes. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 42:1651–1654. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(80\)80334-4](https://doi.org/10.1016/0022-1902(80)80334-4)
293. Tsukahara K, Wilkins RG (1985) Kinetics of reduction of eight viologens by dithionite ion. *J Am Chem Soc* 107:2632–2635. <https://doi.org/10.1021/ja00295a013>
294. James TH, Cannon C, Ablett A, Materer NF (2015) Sodium Dithionite Purity and Decomposition Products in Solid Samples Spanning 50 Years. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 190:158–169. <https://doi.org/10.1080/10426507.2014.914939>
295. Littlejohn D, Hu KY, Chang SG (1986) Kinetics of the reaction of nitric oxide with sulfite and bisulfite ions in aqueous solution. *Inorg Chem* 25:3131–3135. <https://doi.org/10.1021/ic00238a007>
296. McKenna CE, Gutheil WG, Song W (1991) A method for preparing analytically pure sodium dithionite. Dithionite quality and observed nitrogenase-specific activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1075:109–117. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90082-R](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90082-R)
297. Burlamacchi L, Guarini G, Tiezzi E (1969) Mechanism of decomposition of sodium dithionite in aqueous solution. *Transactions of the Faraday Society* 65:496. <https://doi.org/10.1039/tf9696500496>
298. Jellinek K. (1911) Über die Leitfähigkeit und Dissociation von Natriumhydrosulfit und hydroschwefliger Säure im Vergleich zu analogen Schwefelsauerstoffverbindungen. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie* 76U(1): <https://doi.org/doi:10.1515/zpch-1911-7624>
299. K. Jellinek EJ (1919) No Title. *Z Phys Chem* 93:325
300. Munchow V, Steudel R (1994) The Decomposition of Aqueous Dithionite and its reactions with polythionates SnO6²⁻ (n = 3-5) studied by ion-pair chromatography. *Z Anorg Allg Chem* 620:121–126. <https://doi.org/10.1002/zaac.19946200120>
301. Lem WJ, Wayman M (1970) Decomposition of aqueous dithionite. Part I. Kinetics of decomposition of aqueous sodium dithionite. *Can J Chem* 48:776–781. <https://doi.org/10.1139/v70-126>
302. Lister MW, Garvie RC (1959) SODIUM DITHIONITE, DECOMPOSITION IN AQUEOUS SOLUTION AND IN THE SOLID STATE. *Can J Chem* 37:1567–1574. <https://doi.org/10.1139/v59-228>
303. Veguta VL, Stevanic JS, Lindström M, Salmén L (2017) Thermal and alkali stability of sodium dithionite studied using ATR-FTIR spectroscopy. *Bioresources* 12:2496–2506. <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.2496-2506>
304. Telfeyan K, Migdisov AA, Pandey S, et al (2019) Long-term stability of dithionite in alkaline anaerobic aqueous solution. *Applied Geochemistry* 101:160–169. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2018.12.015>
305. Milićević B, Eigenmann G (1963) Potentiometrische, polarographische und Elektronenspinresonanz Untersuchungen alkalischer Lösungen von Natriumdithionit. *Helv Chim Acta* 46:192–197. <https://doi.org/10.1002/hlca.19630460119>
306. Lambeth D, Palmers G (1973) The Kinetics and Mechanism of Reduction of Electron Transfer Proteins and Other Compounds of Biological Interest by Dithionite. *J Biol Chem* 248:6095–6103
307. MAYHEW SG (1978) The Redox Potential of Dithionite and SO₂ from Equilibrium Reactions with Flavodoxins, Methyl Viologen and Hydrogen plus Hydrogenase. *Eur J Biochem* 85:535–547. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12269.x>
308. Rinker RG, Gordon TP, Mason DM, et al (1959) KINETICS AND MECHANISM OF THE AIR OXIDATION OF THE DITHIONITE ION (S₂O₄²⁻) IN AQUEOUS SOLUTION. *J Phys Chem* 64:573–581. <https://doi.org/10.1021/j100834a015>
309. Creutz C., Sutin N (1974) Kinetics of the Reactions of Sodium Dithionite with Dioxygen and Hydrogen Peroxide. *Inorg Chem* 13:2041–2043
310. Dereven'kov IA, Salnikov DS, Makarov S V., et al (2013) Kinetics and mechanism of oxidation of super-reduced cobalamin and cobinamide species by thiosulfate, sulfite and dithionite. *Dalton Transactions* 42:15307. <https://doi.org/10.1039/c3dt51714d>
311. Dereven'kov IA, Makarov S V. (2020) Catalytic effect of tetrasulfonated cobalt phthalocyanine on selenite reduction by dithionite. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* 129:7–16. <https://doi.org/10.1007/s11144-019-01687-6>

312. Sen Gupta KK, Bhattacharjee N, Pal B (2016) Oxidative Cleavage of S–S Bond During the Reduction of Tris(pyridine-2-carboxylato)manganese(III) by Dithionite in Sodium Picolinate–Picolinic Acid Buffer Medium. *Int J Chem Kinet* 48:635–643. <https://doi.org/10.1002/kin.21022>
313. Wolak M, Zahl A, Schnepfensieper T, et al (2001) Kinetics and Mechanism of the Reversible Binding of Nitric Oxide to Reduced Cobalamin B 12r (Cob(II)alamin). *J Am Chem Soc* 123:9780–9791. <https://doi.org/10.1021/ja010530a>
314. Quillin ML, Li T, Olson JS, et al (1995) Structural and Functional Effects of Apolar Mutations of the Distal Valine in Myoglobin. *J Mol Biol* 245:416–436. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0034>
315. Ascenzi P, De Simone G, Tundo GR, et al (2020) Ferric nitrosylated myoglobin catalyzes peroxynitrite scavenging. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 25:361–370. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01767-2>
316. Nys K, Cuypers B, Berghmans H, et al (2020) Surprising differences in the respiratory protein of insects: A spectroscopic study of haemoglobin from the European honeybee and the malaria mosquito. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1868:140413. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140413>
317. Ascenzi P, De Simone G, Pasquadibisceglie A, et al (2021) Kinetic inequivalence between α and β subunits of ligand dissociation from ferrous nitrosylated human haptoglobin:hemoglobin complexes. A comparison with O₂ and CO dissociation. *J Inorg Biochem* 214:. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111272>
318. Moore EG, Gibson QH (1976) Cooperativity in the dissociation of nitric oxide from hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 251:2788–2794. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33557-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33557-3)
319. Van Doorslaer S, Dewilde S, Kiger L, et al (2003) Nitric Oxide Binding Properties of Neuroglobin. *Journal of Biological Chemistry* 278:4919–4925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210617200>
320. Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, et al (2005) Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: Functional pathways and conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:8483–8488. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408766102>
321. Carballal S, Cuevasanta E, Yadav PK, et al (2016) Kinetics of nitrite reduction and peroxynitrite formation by ferrous heme in human cystathionine β -synthase. *Journal of Biological Chemistry* 291:8004–8013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718734>
322. Grubina R, Basu S, Tiso M, et al (2008) Nitrite reductase activity of hemoglobin S (sickle) provides insight into contributions of heme redox potential versus ligand affinity. *Journal of Biological Chemistry* 283:3628–3638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705222200>
323. Smulik-Izydorczyk R, Dębowska K, Rostkowski M, et al (2021) Kinetics of Azanone (HNO) Reactions with Thiols: Effect of pH. *Cell Biochem Biophys* 79:845–856. <https://doi.org/10.1007/s12013-021-00986-x>
324. Shoman ME, Dumond JF, Isbell TS, et al (2011) Acyloxy nitroso compounds as nitroxyl (HNO) donors: Kinetics, reactions with thiols, and vasodilation properties. *J Med Chem* 54:1059–1070. <https://doi.org/10.1021/jm101432z>
325. Miller TW, Cherney MM, Lee AJ, et al (2009) The effects of nitroxyl (HNO) on soluble guanylate cyclase activity: interactions at ferrous heme and cysteine thiols. *J Biol Chem* 284:21788–21796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014282>
326. Camacho F, Pfiez MP, Jimhnez MC, Fern M (1997) Application of the sodium dithionite oxidation to measure oxygen transfer parameters
327. Morello JA, Craw MR, Constantine HP, Forster RE (1964) Rate of reaction of dithionite ion with oxygen in aqueous solution. *J Appl Physiol* 19:522–525. <https://doi.org/10.1152/jappl.1964.19.3.522>
328. Sing DK, Sharm RN, Srvastavi RD Kinetics of Oxidation of Sodium Dithionite by Flow Thermal Method
329. Shaw AW, Vosper AJ (1977) Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 73:1239. <https://doi.org/10.1039/f19777301239>
330. Doctorovich F, Farmer PJ, Marti MA (2016) *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Elsevier
331. Johns JWC, McKellar ARW, Weinberger E (1983) The infrared spectrum of HNO. *Can J Phys* 61:1106–1119. <https://doi.org/10.1139/p83-142>
332. Takahashi H, Kaneko N, Miwa K (1982) Raman and infrared studies of the structure of the dithionite ion in aqueous solution and force-constants of S₂O₄²⁻ type ions. *Spectrochim Acta A* 38:1147–1153. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(82\)80155-4](https://doi.org/10.1016/0584-8539(82)80155-4)
333. Golding RM (1960) 741. Ultraviolet absorption studies of the bisulphite–pyrosulphite equilibrium. *J Chem Soc* 0:3711–3716. <https://doi.org/10.1039/JR9600003711>
334. Corte L, Roscini L, Zadra C, et al (2012) Effect of pH on potassium metabisulphite biocidal activity against yeast and human cell cultures. *Food Chem* 134:1327–1336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.025>
335. N.N. GREENWOOD, A. EARNSHAW (1997) *Chemistry of the Elements*, Second Edition
336. James E. House KAH (2016) *Descriptive Inorganic Chemistry*, Third Edition. Elsevier
337. Scaife CWJ, Wilkins RG (1980) Kinetics of the reduction of hexacyanoferrate(III) ion by dithionite ion. *Inorg Chem* 19:3244–3247. <https://doi.org/10.1021/ic50213a008>

338. Doctorovich F, Bikiel DE, Pellegrino J, et al (2014) How to Find an HNO Needle in a (Bio)-Chemical Haystack. In: Progress in Inorganic Chemistry. pp 145–184
339. Kobayashi J, Murata I (2020) Nitric oxide inhalation as an interventional rescue therapy for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care* 10:61. <https://doi.org/10.1186/s13613-020-00681-9>
340. Martel J, Ko Y-F, Young JD, Ojcius DM (2020) Could nasal nitric oxide help to mitigate the severity of COVID-19? *Microbes Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.002>
341. Adusumilli NC, Zhang D, Friedman JM, Friedman AJ (2020) Harnessing nitric oxide for preventing, limiting and treating the severe pulmonary consequences of COVID-19. *Nitric Oxide* 103:4–8. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.07.003>
342. Mitra S, Altit G (2023) Inhaled nitric oxide use in newborns. *Paediatr Child Health* 28:119–122. <https://doi.org/10.1093/pch/pxac107>
343. Van Meurs KP, Wright LL, Ehrenkranz RA, et al (2005) Inhaled Nitric Oxide for Premature Infants with Severe Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine* 353:13–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043927>
344. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, et al (1993) Inhaled Nitric Oxide for the Adult Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine* 328:399–405. <https://doi.org/10.1056/NEJM199302113280605>
345. John Pasquale Toscano, Jessica Zarenkiewicz, Guillermo Carrone, Agostina Mazzeo, Ernesto Marceca, Juan Pellegrino, Sebastián Suárez, Paola Elizabeth Vargas FD (2021) A solid gas reaction to generate nitroxyl (HNO) in the gas phase, U.S. Prov Patent Appl 63/189,534; Submission date: May-17-2021, Applicant: The Johns Hopkins University, agreement with UBA and CONICET.
346. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, et al (1991) Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83:2038–2047. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.83.6.2038>
347. Frostell CG, Blomqvist H, Hedenstierna G, et al (1993) Inhaled Nitric Oxide Selectively Reverses Human Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction without Causing Systemic Vasodilation. *Anesthesiology* 78:427–435. <https://doi.org/10.1097/00000542-199303000-00005>
348. Ozturk E (2016) Use of inhaled nitric oxide in pediatric cardiac intensive care unit. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi-Archives of the Turkish Society of Cardiology.* <https://doi.org/10.5543/tkda.2015.23255>
349. Cockrill BA, Kacmarek RM, Fifer MA, et al (2001) Comparison of the Effects of Nitric Oxide, Nitroprusside, and Nifedipine on Hemodynamics and Right Ventricular Contractility in Patients With Chronic Pulmonary Hypertension. *Chest* 119:128–136. <https://doi.org/10.1378/chest.119.1.128>
350. Krasuski RA, Warner JJ, Wang A, et al (2000) Inhaled nitric oxide selectively dilates pulmonary vasculature in adult patients with pulmonary hypertension, irrespective of etiology. *J Am Coll Cardiol* 36:2204–2211. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00994-3](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00994-3)
351. ROBERTS J (1992) Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *The Lancet* 340:818–819. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92686-A](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92686-A)
352. KINSELLA J (1992) Low-dose inhalational nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *The Lancet* 340:819–820. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92687-B](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92687-B)
353. Lei C, Berra L, Rezoagli E, et al (2018) Nitric Oxide Decreases Acute Kidney Injury and Stage 3 Chronic Kidney Disease after Cardiac Surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 198:1279–1287. <https://doi.org/10.1164/rccm.201710-2150OC>
354. Yu B, Ichinose F, Bloch DB, Zapol WM (2019) Inhaled nitric oxide. *Br J Pharmacol* 176:246–255. <https://doi.org/10.1111/bph.14512>
355. Mancardi D, Pagliaro P, Ridnour LA, et al (2022) HNO Protects the Myocardium against Reperfusion Injury, Inhibiting the mPTP Opening via PKC ϵ Activation. *Antioxidants* 11:1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox11020382>
356. Porcheddu A, De Luca L, Giacomelli G (2009) A Straightforward Route to Piloty's Acid Derivatives: A Class of Potential Nitroxyl-Generating Prodrugs. *Synlett* 2009:2149–2153. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1217565>
357. Smulik-Izydorczyk R, Rostkowski M, Gerbich A, et al (2019) Decomposition of Piloty's acid derivatives – Toward the understanding of factors controlling HNO release. *Arch Biochem Biophys* 661:132–144. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.012>
358. Adas SK, Bharadwaj V, Zhou Y, et al (2018) Synthesis and HNO Donating Properties of the Piloty's Acid Analogue Trifluoromethanesulphonylhydroxamic Acid: Evidence for Quantitative Release of HNO at Neutral pH Conditions. *Chemistry – A European Journal* 24:7330–7334. <https://doi.org/10.1002/chem.201800662>
359. Sirsalmath K, Suárez SA, Bikiel DE, Doctorovich F (2013) The pH of HNO donation is modulated by ring substituents in Piloty's acid derivatives: azanone donors at biological pH. *J Inorg Biochem* 118:134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.10.008>
360. Benon HJ, Bielski A, Allen O, Schwarz HA (1981) Mechanism of Disproportionation of Ascorbate Radicals. *J Am Chem Soc* 103:3516–3518
361. Heinecke JL, Khin C, Pereira JCM, et al (2013) Nitrite reduction mediated by heme models. Routes to NO and HNO? *J Am Chem Soc* 135:4007–4017. <https://doi.org/10.1021/ja312092x>

362. Bartberger MD, Houk KN, Powell SC, et al (2000) Theory , Spectroscopy , and Crystallographic Analysis of S-Nitrosothiols : Conformational Distribution Dictates Spectroscopic Behavior. *Society* 5889–5890
363. GIANNUZZO AN, NAZARENO MA, MISHIMA HT, LÓPEZ DE MISHIMA BA (2000) Extracción de naringina de Citrus paradisi L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20:257–261. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612000000200022>
364. Celiz G, Suarez SA, Arias A, et al (2019) Synthesis, structural elucidation and antiradical activity of a copper (II) naringenin complex. *BioMetals* 32:595–610. <https://doi.org/10.1007/s10534-019-00187-3>
365. Lippard SJ, & BJM (1994) Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books
366. Sahoo SC, Dubey M, Alam MdA, Ray M (2010) Effect of metal coordination and intra-molecular H-bond on the acidity of phenolic proton in a set of structurally characterized octahedral Ni(II) complexes of l-histidine derivative. *Inorganica Chim Acta* 363:3055–3060. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2010.03.051>
367. Dobmeier KP, Riccio DA, Schoenfisch MH (2008) Xerogel optical sensor films for quantitative detection of nitroxyl. *Anal Chem* 80:1247–1254. <https://doi.org/10.1021/ac702024t>
368. Boron I, Suárez SA, Doctorovich F, et al (2011) A protective protein matrix improves the discrimination of nitroxyl from nitric oxide by MnIII protoporphyrinate IX in aerobic media. *J Inorg Biochem* 105:1044–1049. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.05.002>
369. Khan AA, Schuler MM, Prior MG, et al (1990) Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103:482–490. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(90\)90321-K](https://doi.org/10.1016/0041-008X(90)90321-K)
370. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:15560–15565. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705891104>
371. Yong Q-C, Hu L-F, Wang S, et al (2010) Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxyl. *Cardiovasc Res* 88:482–491. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq248>
372. Cortese-Krott MM, Kuhnle GGC, Dyson A, et al (2015) Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509277112>
373. Ivanovic-Burmazovic I, Filipovic MR (2019) Saying NO to H₂S: A Story of HNO, HSNO, and SSNO -. *Inorg Chem* 58:4039–4051. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02592>
374. Marcolongo JP, Venâncio MF, Rocha WR, et al (2019) NO/H₂S “Crosstalk” Reactions. The Role of Thionitrites (SNO –) and Perthionitrites (SSNO –). *Inorg Chem* 58:14981–14997. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01978>
375. Pavlovich MJ, Ono T, Galleher C, et al (2014) Air spark-like plasma source for antimicrobial NO_x generation. *J Phys D Appl Phys* 47:. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/50/505202>
376. Nava M, Martin-Drumel M-A, Lopez CA, et al (2016) Spontaneous and Selective Formation of HSNO, a Crucial Intermediate Linking H₂S and Nitroso Chemistries. *J Am Chem Soc* 138:11441–11444. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05886>
377. Koga N, Morokuma K (1985) Determination of the lowest energy point on the crossing seam between two potential surfaces using the energy gradient. *Chem Phys Lett* 119:371–374. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(85\)80436-X](https://doi.org/10.1016/0009-2614(85)80436-X)
378. Bearpark MJ, Robb MA, Bernhard Schlegel H (1994) A direct method for the location of the lowest energy point on a potential surface crossing. *Chem Phys Lett* 223:269–274. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(94\)00433-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(94)00433-1)
379. Harvey JN, Aschi M, Schwarz H, Koch W (1998) The singlet and triplet states of phenyl cation. A hybrid approach for locating minimum energy crossing points between non-interacting potential energy surfaces. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)* 99:95–99. <https://doi.org/10.1007/s002140050309>

8. Publicaciones realizadas a lo largo de la presente tesis

1. **Vargas P**, Doctorovich FA, Suarez SA (2024) Update on Endogenous HNO Production: An Exploration of Unanswered Questions and Challenges. *Eur J Inorg Chem* 27:1–15.
2. **Vargas P**, Gallego CM, Mazzeo A, et al (2021) Azanone (HNO): generation, stabilization and detection. *Chem Sci* 12:10410–10425.
3. Suarez SA, **Vargas P**, Doctorovich FA (2021) Updating NO•/HNO interconversion under physiological conditions: A biological implication overview. *J Inorg Biochem* 216:111333.

Patentes

4. Toscano, J. P., Zarenkiewicz, J., Carrone, G. A., Mazzeo, A. M., Marceca, E. J., Pellegrino, J., ... & **Vargas, P. E.** (2024). U.S. Patent Application No. 18/560,588.

Manuscritos en preparación

5. **Paola Vargas**, Mateus F. Venâncio, Willian R. Rocha, Sebastián A. Suarez, Fabio A. Doctorovich. Unravelling the kinetics of dithionite decomposition and its reactivity towards nitric oxide: formation of HNO under physiological conditions. Pendiente de reenvío a *Inorganic Chemistry*.
6. **Paola Vargas**, Sebastian A. Suarez, Fabio Doctorovich. Heterogenous HNO gas generation from nitric oxide and reducing solids. En preparación.
7. **Paola Vargas**, Mateus F. Venâncio, Silvina Bieza, Fabio Doctorovich, Sebastian A. Suarez. Insights into the reaction between H₂S and NO• in the gas phase: effects of oxygen, water vapor, and acid-based species on HNO formation. En preparación.

9. Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los jurados Daniel, Adriana y Ari por dedicar su tiempo a la lectura y evaluación de mi tesis, aportando comentarios valiosos que me han permitido perfeccionarla de manera constructiva. También a Luciana y Mauricio por su buena predisposición a participar como jurados suplentes. Gracias a mi consejera Maria Ana Castro por tomarse el tiempo de revisar los informes de avance.

Al Conicet y la agencia I+D+i por aportar el financiamiento durante el desarrollo de la tesis.

Muchas gracias a Fabio y Sebas por dirigir mi tesis, no solo desde el ámbito académico y de investigación, sino también desde lo humano. El acompañamiento brindado durante todos estos años fue fundamental para no caer ante las dificultades y desafíos diarios que el doctorado propone.

Gracias infinitas a mis compañeros de laboratorio. A Ceci, Andrea y Fede, porque estuvieron dispuestos a darme una mano con el manejo del laboratorio siempre que lo necesitaba. Gracias Agos por transmitirme sus conocimientos y experiencias en el manejo de la línea y todo lo que un trabajo en atmósfera inerte requiere. A Silvina, por su enorme optimismo y por haber sido una buena compañía durante los meses que trabajamos juntas. A Rosario, Juanma, Nati, Teo, Juli y Nacho por su buena compañía, cafés y charlas en la oficina. También a Milu que se unió este último tiempo. Gracias a Flor por toda su ayuda, así como a Maricel e Ivette, con quienes compartí la oficina.

Gracias a Juan por su apoyo y sus valiosos consejos sobre los experimentos. A Eli por su disposición para gestionar la obtención de reactivos esenciales, además de su apoyo en los trámites administrativos. Su colaboración ha sido fundamental en todo este proceso.

Quiero mencionar especialmente a mi compañera Sol Santalla, quien siempre mostró una disposición incondicional para ayudarme. Su generosidad al ajustar sus propios experimentos para facilitar el uso compartido de la línea de Schlenk, junto con su apoyo en muchas otras áreas, ha sido muy importante.

Agradezco al personal de apoyo de Conicet por los servicios prestados, las capacitaciones y las colaboraciones. A Gabriela y Adriana por enseñarme a usar el espectrómetro FTIR. A Horacio por su ayuda y su activa participación en las mediciones por cromatografía iónica y CG-masa. Ernesto Marceca por su entusiasmo y dedicación en los intentos de medir HNO por espectrometría de masas.

Gracias al DQIAQF, al Inquimae y a la UBA por proporcionarme el espacio donde desarrollé mi tesis, así como al personal del instituto y la facultad por su apoyo constante. Un agradecimiento especial a Ale por su ayuda con los trámites relacionados con el doctorado, y al equipo docente que impartió las materias que cursé durante este proceso.

Gracias a mis compañeros de cursada de la licenciatura, Romi, Karina, Mariana y Juan Pablo, y a los del doctorado, especialmente a Oscar y Lore. Su apoyo y compañía a lo largo de este camino fueron fundamentales para enfrentar los desafíos del estudio. Más allá de la cursada, sé que seguirán formando parte de mi vida. A mis dos amigas del colegio secundario, Maru y Mar, por su apoyo, sus consejos y por darme el impulso necesario para seguir adelante.

Por último, y no menos importante, quiero expresar mi infinita gratitud a mi familia de sangre y familia política por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de estos años. Especialmente, gracias a mamá, papá, mi hermano, sobrinos y a mis hermanas, por su confianza en mí. A mi compañero Matias, por ser mi pilar fundamental y acompañarme en cada paso de este camino. Y, por encima de todo, a mis dos bebés, Benjamin y Benicio, lo más valioso y significativo en mi vida.