

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ALEXSANDRA CRISTINA SCALFO

**Geração de Oxigênio Molecular Singlete:
Termólise de Endoperóxidos Naftalênicos e
Reações de Hidroperóxidos Lipídicos com Íon
Nitrônio**

Versão Corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
06/03/2014

ALEXSANDRA CRISTINA SCALFO

**Geração de Oxigênio Molecular Singlete:
Termólise de Endoperóxidos Naftalênicos e
Reações de Hidroperóxidos Lipídicos com Íon
Nitrônio**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica).*

Orientador: Prof. Dr. Paolo Di Mascio

São Paulo
2014

*Dedico esta tese aos meus
queridos pais Maria e Osvaldo
e a minha irmã Adriana*

AGRADECIMENTOS

Eu quero agradecer a todos que contribuíram de uma forma ou de outra para realização dessa tese. Agradeço a todos aqueles que acreditaram em mim, que me apoiaram, tornando essa jornada única. Dividimos momentos bons e ruins, mas nunca perdemos a esperança em dias melhores.

Inicialmente, agradeço ao professor Paolo Di Mascio pelos projetos confiados a mim e por me receber em seu grupo.

À professora Marisa Medeiros pelas discussões e contribuições ao longo do trabalho.

À professora Sayuri Miyamoto pelas ricas discussões e encorajamento.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas de laboratório nesses anos de doutorado: José Pedro, Tatiana, Camila, Fernanda Sena, Flávia, Fernanda, Graziella, Marilene, Emérson, Letícia, Kerolyn, Gabriel, Kátia, Doris, Ivone, Simone, Gabriela, Tereza, Agda, Izaura, e ao amigo mexicano Miguel pela convivência, amizade e aprendizado de vida.

Agradeço ao pessoal do laboratório da professora Marisa: Angélica, Florêncio, Camila Carrião, Vanderson, Adriana, Guilherme, Enrique, Maitê, Osmar, Henrique, Alexandre, Thais, Alessandra e ao pessoal do laboratório da professora Sayuri: Priscilla, Patricia, Thiaguito, Silvio, Miriam Uemi (agregada), Daniela, Tatiana, Rafaela, Zilda e os recém-chegados Lucas e Adriano pela convivência e amizade.

Ao professor Luiz Fernando e o pessoal do seu laboratório, em especial ao Joaquim, que sempre mantiveram as portas abertas do seu laboratório, cujo apoio material foi fundamental para realização desse trabalho. Muito obrigado pelos empréstimos, que em poucas oportunidades eu pude devolver.

Em especial a minha família, minha mãe Maria, meu pai Osvaldo, minha irmã Adriana e ao meu cunhado Cláudio por todo apoio nessa empreitada e ao Felipe por me deixar apertá-lo de vez em quando.

Agradeço as pessoas que me ensinaram no início da minha vida científica, pois seu empenho foi fundamental para eu poder chegar até aqui: Myrian Sano e professora Helena Ferraz.

Aos amigos do IQ Dani Beton, Dani Gonzales, Cecília Midori, Rita, Júlio, Raphael, Chrislaine e tantos outros amigos e colegas do IQ.

Aos funcionários do IQ.

A CAPES pela bolsa concedida.

Muito obrigada!!!!

“Sua visão se tornará clara somente quando você puder olhar para seu próprio coração. Quem olha para fora sonha. Quem olha para dentro desperta.”

Carl Gustav Jung

RESUMO

Scalfo, A.C. **Geração de oxigênio molecular singlete: termólise de endoperóxidos naftalênicos e reação de hidroperóxidos lipídicos com íon nitrônio**. 2014. 178p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Oxigênio molecular singlete [$O_2(^1\Delta_g)$], uma espécie excitada, desempenha um papel importante em sistemas químicos e biológicos. É um poderoso eletrófilo, que reage com moléculas ricas em elétrons através de cicloadições [2+2], [4+2] e reações tipo ene. Ácidos graxos poliinsaturados, proteínas e DNA são alvos vulneráveis para o ataque de $O_2(^1\Delta_g)$. Os endoperóxidos derivados de naftaleno são muito úteis e versáteis como fontes limpas de $O_2(^1\Delta_g)$, uma vez que são quase quimicamente inertes. Por outro lado, o desenvolvimento de novas fontes de $O_2(^1\Delta_g)$ ainda é uma tarefa desafiadora. Os derivados de naftaleno são capazes de armazenar $O_2(^1\Delta_g)$ por reação de cicloadição [4+2] e liberá-lo em temperaturas amenas, o que os torna muito adequados para uso em estudos biológicos. A síntese destes compostos está baseada em modificações nos substituintes ligados nas posições 1 e 4 da estrutura do naftaleno. Na primeira parte deste trabalho, a síntese de três endoperóxidos derivados do naftaleno solúveis em água foi realizada. DHPNO₂ e NDPO₂ foram preparados de acordo com métodos similares descritos na literatura. A síntese de um novo endoperóxido dicatiônico derivado do naftaleno (NBTEO₂) foi desenvolvida, contendo dois grupos de cloreto de amônio quaternário nas posições 1,4 do anel aromático. O intermediário chave na síntese dos três endoperóxidos é o BBMN, o qual foi preparado a partir da bromação radicalar do 1,4-dimetilnaftaleno. Nossos resultados têm indicado que este composto dicatiônico pode ser uma fonte química de $O_2(^1\Delta_g)$ em potencial, e pode ser explorado em estudos com

mitocôndrias, onde o papel biológico de $O_2(^1\Delta_g)$ é investigado. A segunda parte deste trabalho foi dedicada a investigar a geração de $O_2(^1\Delta_g)$ através das reações entre hidroperóxidos de lipídeos (ácido oleico, linoleico e colesterol), hidroperóxidos orgânicos (cumeno e *t*-butila), bem como peróxido de hidrogênio com NO_2^+ , utilizando o composto NO_2BF_4 . Evidências da geração de $O_2(^1\Delta_g)$ foram obtidas através de medidas de emissão de luz na região do infravermelho próximo, no comprimento de onda de 1270 nm. Além disso, a prova inequívoca da presença de $O_2(^1\Delta_g)$ foi demonstrada através da caracterização espectral direta da emissão de luz no infravermelho próximo. O uso de azida de sódio como captador físico de $O_2(^1\Delta_g)$, juntamente com as medidas da quimiluminescência, contribuíram para identificar a geração desta espécie na reação entre hidroperóxidos de lipídeos e NO_2BF_4 . Embora seja uma abordagem química, nossos resultados adicionaram informações importantes sobre a peroxidação lipídica, principalmente quando espécies reativas de nitrogênio estão envolvidas. O $O_2(^1\Delta_g)$ poderia ser gerado como um subproduto da peroxidação lipídica em condições onde espécies reativas de nitrogênio interagem com hidroperóxidos lipídicos. Isto pode contribuir para um melhor entendimento deste evento complexo com implicações fisiológicas ou fisiopatológicas.

Palavras-chave: oxigênio molecular singlete, hidroperóxidos do naftaleno, hidroperóxidos de lipídeos, íon nitrônio, emissão de luz, peroxidação.

ABSTRACT

Scalfo, A.C. **Generation of singlet molecular oxygen: thermolysis of naphthalene endoperoxides and reaction of lipid hydroperoxides with nitronium ion.** 2014.178p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$], an excited species, plays an important role in chemical and biological systems. It is a powerful electrophile, reacting with electron rich molecules through [2+2] cycloadditions, [4+2] cycloadditions and ene reactions. Polyunsaturated fatty acids, proteins and DNA are vulnerable targets for $O_2(^1\Delta_g)$ reaction. Naphthalene derivatives endoperoxides are very useful and versatile as a clean source of $O_2(^1\Delta_g)$, once they are almost chemically inert. On the other hand, developing new sources of $O_2(^1\Delta_g)$ are still a challenging task. Naphthalene derivatives are able to trap $O_2(^1\Delta_g)$ by [4+2] cycloaddition and release it in mild temperatures, which make them very suitable for biological studies. The synthesis of these compounds is based on modifications in substituents bonded in 1,4 positions of naphthalene backbone. In the first part of present work, the synthesis of three water soluble naphthalene derivatives endoperoxides was performed. DHPNO₂, NDPO₂ were prepared according to similar methods described in the literature. A new di-cationic naphthalene derivative endoperoxide (NBTEO₂) synthesis was developed, containing two quaternary ammonium chloride groups in 1,4-positions of aromatic ring. The key intermediate: for the synthesis of the three endoperoxides is the compound BBMN, which was prepared from radical bromination of 1,4-dimethylnaphthalene. Our results have indicated that this di-cationic compound can be a potential chemical source of $O_2(^1\Delta_g)$ and may be explored in mitochondrial studies where $O_2(^1\Delta_g)$ biological role is investigated. The second part of this work is dedicated to the investigation of generation of $O_2(^1\Delta_g)$ through reaction of lipid hydroperoxides (oleic acid, linoleic

acids and cholesterol), organic hydroperoxides (cumene and *t*-butyl), as well as hydrogen peroxide with NO_2^+ , using the compound NO_2BF_4 . Evidences of generation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ were obtained recording the monomol light emission measurement in near infrared region at wavelength of 1270 nm. Moreover, the proof of the presence of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ was unequivocally demonstrated by the direct spectral characterization of near-infrared light emission. The use of sodium azide as a physical quencher of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, associated to chemiluminescence measurements, contributed to identify the generation of this species in the reaction of lipid hydroperoxides and NO_2BF_4 . Although, it is a chemical approach, our results add important information about lipid peroxidation, mainly when reactive species of nitrogen are involved. $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ might be generate as a byproduct of lipid peroxidation, in conditions where reactive nitrogen species interact with lipid hydroperoxides. This might contribute to a better understand of this complex event and physiological or physiopathological implications.

Keywords: singlet molecular oxygen, naphthalene endoperoxide, lipid hydroperoxides, nitronium ion, light emission, peroxidation.

Lista de Abreviaturas

AANO ₂	ácido araquidônico nitrado
ADP	9,10-antraceno dipropanoato de sódio
AM	azul de metileno
ANDP	ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico
APCI	ionização química à pressão atmosférica
ATP	adenosina trifosfato
BBMN	1,4-bis(bromometil)naftaleno
Br [•]	radical bromo
<i>t</i> -BuOOH	hidroperóxido de <i>t</i> -butila
<i>t</i> -BuOO [•]	radical <i>t</i> -butila
ChOOH	hidroperóxidos do colesterol
Cl [•]	radical cloro
COX	ciclooxigenase
CuOOH	hidroperóxido de cumeno
CuOO [•]	radical cumil
DHPN	<i>N,N'</i> -(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
DHPNO ₂	endoperóxido de <i>N,N'</i> -(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
DMF	dimetilformamida
DMN	1,4-dimetilnaftaleno
DMNO ₂	endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno
DMSO	dimetilsulfóxido
D ₂ O	óxido de deutério/ água deuterada
DPA	9,10-difenilantraceno
EAS	sulfato mono-2[(10-sulfoxi-etil)-antracen-9-il] ester de sódio
ER	espécies reativas
ERB	espécies reativas de bromo
ERC	espécies reativas de cloro
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
ESR	electron spin resonance
Et ₃ N	triethylamina

EtOH	etanol
EtOAc	acetato de etila
Et ₂ O	éter dimetílico
Et ₃ N	trietilamina
ESI	ionização por eletrospray
FMN	flavina mononucleotídeo
GSH	Gama-L-glutamil-L-cisteínil-L-glicina (glutathiona reduzida)
GSSG	glutathiona dissulfeto
GPx	glutathiona peroxidase
HO ₂ [•]	radical hidroperoxila
HMN	1,4-dihidroximetil-naftaleno
HPLC	high performance liquid chromatography
L [•]	radical lipídico
LAOOH	hidroperóxidos do ácido linoleico
LOOH	hidroperóxidos de lipídeos
LO [•]	radical hidroxila lipídico
LOO [•]	radical peroxila lipídico
LOX	lipoxigenases
MeCN	acetonitrila
MeI	iodo metano
MeOH	metanol
MeO ⁻ Na ⁺	metóxido de sódio
Me ₂ SO ₄	dimetilsulfato
miniSOG	mini singlet oxygen generator
MNEA	cloreto de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio
MNP	3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio
MS	espectrometria de massas
NaN ₃	azida de sódio
NBTE	2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio)
NBTEO ₂	endoperóxido de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio)
NDDA	2,2'-(naftalen-1,4-dil) diacetoneitrila
NDDE	2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina
NDP	3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

NDPE	3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila
NDPO ₂	endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio
NO [•]	óxido nítrico
NO ₂ [•]	dióxido de nitrogênio
NOS	óxido nítrico sintases (do inglês)
O ₂ ^{•-}	ânion superóxido
OAOOH	hidroperóxidos do ácido oleico
•OH	radical hidroxila
ONOO ⁻	peroxinitrito
PGHS	prostaglandinas endoperóxido H sintase
PGG ₂	prostaglandina G ₂
PGH ₂	prostaglandina endoperóxido H ₂
PLA	fosfolipase A
PLC	fosfolipase C
PKC	proteína quinase C
POX	atividade catalítica peroxidase da enzima PGHS
RO [•]	radical hidroxila
ROO [•]	radical peroxila
ROOH	hidroperóxidos
SOD	superóxido dismutase
ta	temperatura ambiente
TMS	tetrametilsilano
TxA ₂	tromboxano A ₂
TxB ₂	tromboxano B ₂
UV	ultravioleta
λ	comprimento de onda
$h\nu$	luz
ϵ	coeficiente de absorvidade molar
m/z	relação massa carga
O ₂ (³ Σ _g ⁻)	oxigênio molecular no estado triplete (estado fundamental)
O ₂ (¹ Σ _g ⁺)	oxigênio molecular no estado singlete
O ₂ (¹ Δ _g)	oxigênio molecular no estado singlete

Δ	aquecimento
J	constante de acoplamento
dd	duplo dubleto
m	multipleteo
q	quarteto
s	singleto
sl	singleto largo
t	tripleto

Lista de Figuras

- Figura 1.1.** *Representação da cadeia de transporte de elétrons e formação do ânion* 30
- Figura 1.2.** Representação da redução sequencial do oxigênio à água e a ação das defesas enzimáticas contra algumas das espécies geradas. SOD – superóxido dismutase, GPx – glutathiona peroxidase (Adaptado de Fridovich, 1978). 31
- Figura 1.3.** Resumo das vias principais para formação de ER. NOS – óxido nítrico sintetase, SOD – superóxido dismutase, MPO – mieloperoxidase, CAT – catalase, GPx – glutathiona peroxidase, M – metais de transição (Adaptado de Kalyanamaran, 2013). 32
- Figura 1.4.** Distribuição eletrônica do oxigênio nos orbitais atômicos e molecular. 33
- Figura 1.5.** Exemplos de hidroperóxidos alílicos obtidos a partir da reação de olefinas com hidrogênio alílico com $^1\text{O}_2$. (A) Reação com 2,3-dimetil-2-buteno, fornecendo 2,3-dimetil-1-buteno-3-hidroperóxido. (B) Reação com 1,2,3,4,5,6,7,8-octaidronaftaleno, fornecendo 1,2,3,4,4a,5,6,7,8-octaidronaftaleno-4a-hidroperóxido (C) Reação com 2-metil-2-penteno, fornecendo 2-metil-1-penteno-3-hidroperóxido e 2-metil-3-penteno-2-hidroperóxido. 36
- Figura 1.6.** Exemplo de reação de cicloadição [2 + 2] entre $^1\text{O}_2$ e olefinas para formação de dioxetano. O composto (*E*)-1,2-dietoxietano reage com $^1\text{O}_2$, gerando o intermediário 3,4-dietoxi-1,2-dioxetano, o qual se decompõe termicamente fornecendo formiato de etila. 37
- Figura 1.7.** Exemplo de reação de cicloadição [4 + 2]. Reação do $^1\text{O}_2$ com 1,4-dimetilnaftaleno (DMN), gerando o endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO₂). 38

Figura 1.8. Estrutura dos captadores químicos do 1O_2 derivados do antraceno. DPA (9,10-difenilantraceno), ADP (9,10-antraceno dipropanoato de sódio) e EAS (sulfato mono-2[(10-sulfoxi-etil)-antraceno-9-il] ester de sódio).	40
Figura 1.9. Métodos diretos e indiretos utilizados para detecção de 1O_2 .	41
Figura 1.10. Mecanismos tipo I e tipo II da fotossensibilização (S= substrato, FS= fotossensibilizador, ISC= cruzamento intersistemas).	46
Figura 1.11. Derivados naftalênicos com substituintes hidrofílicos. MNP (3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio), NDP (3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio), MNEA (cloreto de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio), HMN (1,4-dihidroximetil-naftaleno), e DHPN N,N'-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida.	51
Figura 1.12. Representação geral das etapas da peroxidação lipídica.	55
Figura 1.13. Estruturas de alguns aldeídos formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados (adaptado de Salvayre et al., 2008)	56
Figura 1.14. Esquema do mecanismo de Russell (1957).	57
Figura 1.15. Biossíntese de prostanóides derivados do ácido araquidônico. Mecanismo de catálise da ciclooxigenase (COX) com formação de PGG ₂ e peroxidase com formação de PGH ₂ (Adaptado de Schneider et al., 2007 e Smith et al., 2000).	60
Figura 1.16. Mecanismo de catálise de lipoxigenases. (adaptado de Brash, 1999).	61

Figura 1.17. Oxidação do ácido linoleico mediada por NO_2^\bullet (adaptado de Cadet e Di Mascio, 2006).	63
Figura 1.18. A administração de AANO_2 a plaquetas humanas ativadas inibiu a enzima PGHS-1, além de diminuir a agregação plaquetária. A estimulação de plaquetas ativa a fosfolipase C (PLC), com liberação de diacilglicerol e Ca^{2+} . A fosfolipase A (PLA) promove a liberação do ácido araquidônico dos fosfolídeos da membrana, que então na via de PGHS-1 forma prostaglandina endoperóxido H_2 (PGH_2), que por sua vez é transformada no pró-agregante tromboxano A_2 (TxA_2) pela enzima tromboxano A_2 sintase (TxA_2). O diacilglicerol ativa a PKC, levando a ativação de uma cascata enzimática até agregação plaquetária. (Adaptado de Trostchansky <i>et al.</i> , 2013).	65
Figura 3.1. Representação esquemática do sistema reacional para preparação de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$.	79
Figura 3.2. Representação esquemática de uma reação de fotossensibilização.	87
Figura 4.1. Preparação dos endoperóxidos derivados do naftaleno DHPNO_2 e NDPO_2 .	95
Figura 4.2. Espectro de ESI^+ -MS do DHPNO_2 (A) e de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ (B).	97
Figura 4.3. (A) Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm gerado pela termólise de DHPNO_2 a 37°C . (B) Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ liberado pela termólise de DHPNO_2 a 37°C (25 mM em D_2O).	98
Figura 4.4. Preparação dos endoperóxidos derivados do naftaleno NDPO_2 .	98

Figura 4.5. Espectro de ESI ⁻ /MS do endoperóxido NDPO ₂ .	99
Figura 4.6. (A) Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm gerado pela termólise de NDPO ₂ a 37°C (10 mM em D ₂ O). (B) Espectro de emissão de ¹ O ₂ liberado pela termólise de NDPO ₂ a 37°C (10 mM em D ₂ O).	100
Figura 4.7. Síntese dos derivados naftalênicos para obtenção do endoperóxido de NBTEO ₂ .	100
Figura 4.8. Espectro de ESI ⁺ /MS do endoperóxido NBTEO ₂ .	101
Figura 4.9. (A) Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm gerado pela termólise do endoperóxido NBTEO ₂ a 37°C (8 mM em D ₂ O). (B) Espectro de emissão de ¹ O ₂ liberado pela termólise do endoperóxido de NBTEO ₂ a 50°C (8 mM em D ₂ O).	102
Figura 4.10. Preparação dos hidroperóxidos 9-OLOOH e 10-OLOOH por fotooxidação.	103
Figura 4.11. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido oleico (OAOOH).	104
Figura 4.12. Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃ , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido oléico (OAOOH).	105
Figura 4.13. Espectro de ESI ⁻ dos hidroperóxidos do ácido oleico. (A) Espectro de massas de m/z 100 a 500. (B) Íons m/z 113 e m/z 155 característicos da fragmentação dos isômeros 9-OAOOH e 10-OAOOH, respectivamente.	106
Figura 4.14. Esquema da formação dos hidroperóxidos 9-LAOOH, 10-LAOOH, 12-LAOOH e 13-LAOOH.	107
Figura 4.15. Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido linoléico (LAOOH).	108

- Figura 4.16.** Espectro de ESI⁻ dos hidroperóxidos do ácido linoleico. 109
(A) Espectro de massas de m/z 100 a 500, (B) Íons m/z 113, 153, 183 e 223 característicos da fragmentação dos isômeros 13-LAOOH, 10-LAOOH, 9-LAOOH e 12-LAOOH, respectivamente.
- Figura 4.17.** Principais produtos gerados pela reação de 110
fotossensibilização do colesterol (Adaptado de Kulig e Smith, 1973, Girotti, 1985 e Osada e Sevanian, 2000).
- Figura 4.18.** Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, δ ppm, TMS) 111
dos hidroperóxidos do colesterol.
- Figura 4.19.** Espectro APCI⁺/MS dos hidroperóxidos de colesterol 112
(ChOOH).
- Figura 4.20.** Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre 113
os hidroperóxidos do ácido oleico OAOOH e NO₂BF₄ em (A) MeOH, (B) CHCl₃, (C) MeCN e (D) mistura de solventes CHCl₃/MeOH (4:1).
- Figura 4.21.** Termólise de DMNO₂ a 37°C. 114
- Figura 4.22.** Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre 115
os hidroperóxidos de (A) ácido oleico, (B) ácido linoleico, (C) colesterol e NO₂BF₄. Reações controle (a) CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) e NO₂BF₄ (b) L/CHCl₃/MeOH/NO₂BF₄ (c) LOOH/CHCl₃/MeOH sem NO₂BF₄ foram realizadas. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos e/ou lipídeos em CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) para as reações.
- Figura 4.23.** Espectro de emissão de luz no infravermelho para as 116
reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH, (B) LAOOH, (C) ChOOH e NO₂BF₄. Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) com NO₂BF₄. (D) O espectro de emissão

de luz do DMNO₂ foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO₂ em CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) a 37°C.

Figura 4.24. Representação das estruturas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hidroperóxido de cumeno (CuOOH) e hidroperóxido de *t*-butila (*t*-BuOOH). 117

Figura 4.25. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre (A) H₂O₂, (B) CuOOH, (C) *t*-BuOOH e NO₂BF₄. Reações controle (a) CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) e NO₂BF₄ (b) H₂O₂ e/ou ROOH/CHCl₃/MeOH sem NO₂BF₄ foram realizadas. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM de H₂O₂ e dos hidroperóxidos em CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) para as reações. 118

Figura 4.26. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre (A) H₂O₂ e os hidroperóxidos de (B) CuOOH e (C) *t*-BuOOH com NO₂BF₄. Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM de H₂O₂ e dos hidroperóxidos orgânicos em CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) com NO₂BF₄. (D) O espectro de emissão de luz do DMNO₂ foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO₂ em CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) a 37°C. 119

Figura 4.27. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre os hidroperóxidos de (A) ácido oleico, (B) ácido linoleico, (C) ChOOH e NO₂BF₄ em meio acidificado. Reações controle (a) CHCl₃/MeOH (4:1; v/v) e NO₂BF₄, (b) L/CHCl₃/MeOH/NO₂BF₄, (c) LOOH/CHCl₃/MeOH sem NO₂BF₄ foram realizadas, em meio acidificado. Preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos e/ou lipídeos em CHCl₃/MeOH (4:1, v/v), com adição de 1 μ L de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) para as reações. 120

Figura 4.28. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH, (B) 121

LAOOH, (C) ChOOH e NO_2BF_4 em meio acidificado. Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v), contendo 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) com NO_2BF_4 . (D) O espectro de emissão de luz do DMNO_2 foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) a 37°C .

Figura 4.29. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre (A) H_2O_2 , (B) CuOOH , (C) $t\text{-BuOOH}$ e NO_2BF_4 . Reações controle (a) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) e NO_2BF_4 (b) H_2O_2 e/ou $\text{ROOH}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ sem NO_2BF_4 foram realizadas em meio acidificado. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 e dos hidroperóxidos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) com adição de 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) para as reações. 122

Figura 4.30. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre (A) H_2O_2 e os hidroperóxidos de (B) CuOOH e (C) $t\text{-BuOOH}$, em meio acidificado, com NO_2BF_4 . Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 e dos hidroperóxidos orgânicos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v), contendo 1 μL de HCl concentrado, com NO_2BF_4 . O espectro de emissão de luz do DMNO_2 foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v). 123

Figura 4.31. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH , (B) LAOOH e NO_2BF_4 . Para verificar o efeito de supressão de NaN_3 , preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em MeOH e reagiu-se com NO_2BF_4 (a) na presença de NaN_3 e (b) sem NaN_3 . Para OAOOH foram injetados 200 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 (concentração final de 1,56 mM) e para LAOOH foram injetados 500 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 (concentração final de 3,57 mM). 124

Figura 4.32. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reação entre os 125

hidroperóxidos de lipídeos ChOOH e NO_2BF_4 . Para verificar o efeito de supressão produzido por NaN_3 , preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM de ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) e reagiu-se com NO_2BF_4 (a) na presença de 500 μL de uma solução 25mM de NaN_3 (concentração total 3,57 mM) e (b) sem NaN_3 .

Figura 4.33. Análise por ESI⁻/MS da reação de OAOOH e NO_2BF_4 . 126
(A) cromatograma do monitoramento do íon de m/z 359, (B) espectro de massa de m/z 50-500, (C) espectro de fragmentação do íon m/z 359 (representado para o isômero 9-OAOOH).

Figura 5.1. Preparação dos endoperóxidos derivados do naftaleno. 129
As reações partem do composto comercial 1,4-dimetilnaftaleno e tem um intermediário, o BBMN (em vermelho), comum à síntese do DHPNO₂ (em verde), NDPO₂ (em roxo) e NBTEO₂ (em azul). Diretamente do DMN se obtém o endoperóxido derivado DMNO₂ (em laranja).

Figura 5.2. Mecanismo proposto para formação de ¹O₂ gerado na 136
reação entre os hidroperóxidos de lipídeos e NO_2BF_4 .

Figura 5.3. Mecanismo proposto para formação do produto nitrado 137
de m/z 359 (representado para o isômero 9-OAOOH).

Figura 5.4. Mecanismo proposto para geração de ¹O₂ na reação 139
entre os hidroperóxidos terciários e NO_2BF_4 (exemplificado para *t*-BuOOH).

Figura 5.5. Formação do super eletrófilo NO_2^+ (Adaptado de Klump, 140
2009).

Figura 5.6. Propostas para formação de ¹O₂ gerado na reação entre 141
os hidroperóxidos e NO_2BF_4 em meio acidificado.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares π^* do oxigênio molecular no estado excitado singleto ($^1\Sigma_g^+$ e $^1\Delta_g$) e no estado fundamental tripleto $^3\Sigma_g^-$.	34
Tabela 2. Tempo de vida do 1O_2 em diferentes solventes (Wilkinson <i>et al.</i> , 1995).	35
Tabela 3. Fontes químicas e biológicas de 1O_2 .	43
Tabela 4. Exemplos de fotossensibilizadores e seus parâmetros fotofísicos (Kochegar <i>et al.</i> , 2000).	48
Tabela 5. Termólise de endoperóxidos de derivados naftalênicos (Martinez <i>et al.</i> , 2000a).	53
Tabela 6. Íons produto obtidos a partir da fragmentação de m/z 166.	101

Sumário

1-Introdução	28
1.1 – Aspecto Geral sobre Espécies Reativas	28
1.2 – Oxigênio Molecular Singlete	33
1.2.1 - Reações do Oxigênio Singlete	36
1.2.2 - Métodos de Detecção do Oxigênio Molecular Singlete	38
1.2.3 – Fontes de Oxigênio Molecular Singlete	42
1.2.3.1 – Oxidação e Desproporcionamento do Peróxido de Hidrogênio	45
1.2.3.2 – Fotossensibilização	45
1.2.3.3 - Endoperóxidos Como Fonte de $^1\text{O}_2$	49
1.3 - Peroxidação Lipídica	53
1.3.1 – Óxido Nítrico e Peroxidação Lipídica	61
2 - Objetivos	66
3 – Materiais e Métodos	67
3.1- Reagentes	67
3.2 – Equipamentos	69
3.3 - Síntese dos Endoperóxidos Derivados Naftalênicos 1,4-Substituídos	71
3.3.1- Síntese de DHPN, DHPNO ₂ e NDP, NDPO ₂	71
3.3.1.1 - Preparação do 1,4-Bis(bromometil)naftaleno (BBMN)	71
3.3.1.2 - Preparação do Éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de Etila	72
3.3.1.3 - Preparação do Ácido 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanóico (ANDP)	73
3.3.1.4 - Preparação do 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Sódio (NDP)	74
3.3.1.5 - Preparação do 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Etila (NDPE)	75
3.3.1.6 - Preparação de <i>N,N'</i> -(2,3-Dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN)	76
3.3.1.7 - Preparação do Endoperóxido de <i>N,N'</i> -(2,3-Dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO ₂)	77
3.3.1.8 - Preparação do Endoperóxido de <i>N,N'</i> -(2,3-Dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida Marcado Isotopicamente com Oxigênio 18 (DHPN ¹⁸ O ₂)	78
3.3.1.9 – Síntese do Endoperóxido de 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Sódio (NDPO ₂)	80
3.3.2 - Preparação do Endoperóxido de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetil Etanaminio) (NBTEO ₂)	81
3.3.2.1 - Preparação do 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)diacetoneitrila (NDDA)	81
3.3.2.2 - Preparação de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)dietanamina (NDDE)	82
3.3.2.3 - Preparação de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetil Etanaminio) (NBTE)	83
3.3.2.4 - Preparação do Endoperóxido de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetil Etanaminio) (NBTEO ₂)	85
3.3.3 – Medida da Concentração dos Endoperóxidos	86

3.4 - Preparação de Hidroperóxidos de Lipídeos	86
3.4.1 - Preparação dos Hidroperóxidos dos Ácidos Graxos Linoleico e Oleico	87
3.4.2 - Preparação dos Hidroperóxidos do Colesterol	87
3.4.3 - Purificação e Quantificação dos Hidroperóxidos dos Ácidos Graxos Linoleico e Oleico e Colesterol	88
3.4.4 - Análise dos Hidroperóxidos por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas	89
3.5 - Medidas de Emissão de Luz no Infravermelho: Cinética e Espectro	90
3.5.1 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre o Ácido Oleico com NO_2BF_4	90
3.5.2 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos do Ácido Oleico, Linoleico e do Colesterol com NO_2BF_4	90
3.5.3 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Peróxido de Hidrogênio Hidroperóxidos do Cumeno e <i>t</i> -Butila com NO_2BF_4	91
3.5.4 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos do Ácido Oleico, Linoleico e do Colesterol com NO_2BF_4 em Meio Acidificado	91
3.5.5 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Peróxido de Hidrogênio Hidroperóxidos do Cumeno e <i>t</i> -Butila com NO_2BF_4 em Meio Acidificado	92
3.5.6 - Efeito da Azida de Sódio na Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Ácido Oleico e Ácido Linoleico com NO_2BF_4	92
3.5.7 - Efeito da Azida de Sódio na Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Colesterol com NO_2BF_4	93
3.5.8 - Cálculo do Rendimento de Oxigênio Singlete	93
3.5.9 - Reação entre os Hidroperóxidos de Ácido Oleico e NO_2BF_4	94
4 – Resultados	95
4.1 - Síntese e Caracterização dos Endoperóxidos Derivados do Naftaleno Utilizados como Fonte de Oxigênio Singlete	95
4.1.1 - Síntese do Endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-Dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanamida Não Marcada (DHPNO ₂) e Marcada com Oxigênio-18 (DHPN ¹⁸ O ₂)	95
4.1.2 - Síntese do Endoperóxido de 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Sódio (NDPO ₂)	98
4.1.3 - Síntese do Endoperóxido de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetil Etanaminio) (NBTEO ₂)	100
4.2 2 – Síntese e Caracterização dos Hidroperóxidos de Lipídeos	102
4.2.1 – Hidroperóxidos do Ácido Oleico	102
4.2.2- Hidroperóxidos do Ácido Linoleico	106
4.2.3- Hidroperóxidos do Colesterol	109
4.3 – Medidas de Emissão de Luz	112
4.3.1 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos, Orgânicos e Peróxido de Hidrogênio com NO_2BF_4 no Infravermelho	112
4.3.2 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos, Orgânicos e Peróxido de Hidrogênio em Meio Acidificado	119
4.3.3 – Efeito da Azida nas Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos e NO_2BF_4	124
4.3.4 – Análise dos Produtos da Reação entre OAOOH e NO_2BF_4	125

5 – Discussão	127
5.1 – Síntese dos Endoperóxidos Derivados do Naftaleno	127
5.2 - Síntese dos Hidroperóxidos de Lipídeos	132
5.3 - Geração de Oxigênio Singlete na Reação entre os Hidroperóxidos de Lipídeos e NO₂BF₄	134
6- Conclusão	143
7 – Perspectivas	144
8 – Referências	145
Apêndice I	158
Apêndice II	177

1 – Introdução

1.1 – Aspecto Geral sobre Espécies Reativas

Espécies “reativas” de oxigênio (ERO) é um termo coletivo, que engloba espécies radicalares e não radicalares derivadas do oxigênio molecular (O_2). Estas espécies possuem diferentes propriedades quanto a sua reatividade, tempo de vida e capacidade de difusão. Como exemplo de espécies radicalares podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), o radical alcóxila (RO^{\bullet}), o radical peróxila (ROO^{\bullet}), e como espécies não radicalares, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3). A disseminação do termo espécies “reativas” (ER) representa uma expansão, uma vez que este inclui espécies reativas de nitrogênio (ERN), de cloro (ERC) e bromo (ERB). Dentre as ERN podemos citar três principais: óxido nítrico NO^{\bullet} , dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Exemplos de ERC são o ácido hipocloroso ($HOCl$) e radical cloro (Cl^{\bullet}) e de ERB são ácido hipobromoso ($HOBr$) e radical bromo (Br^{\bullet}) (Halliwell, 2006, Halliwell e Gutteridge, 2007).

Durante o curso da evolução, a produção de energia foi eficientemente aumentada com emprego de O_2 como aceptor final pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A escolha do O_2 reside em suas características eletrônicas, com dois elétrons desemparelhados de mesmo spin em orbitais moleculares de mesma energia, as quais contribuem para que esta molécula seja cineticamente inerte e, portanto adequada para exercer o papel de aceptor de elétrons (Naqui *et al.*, 1986). Entretanto, apesar do seu papel contundente na produção de energia a partir da oxidação de nutrientes, uma parcela deste O_2 transforma-se em ERO, que por sua vez reagem com biomoléculas e provocam

diversas modificações. Desse modo, o metabolismo aeróbico leva a formação de ERO e a própria evolução tratou de produzir mecanismos de defesa, que são capazes de manter ERO em níveis basais, e reparar as modificações celulares causados por estas espécies (Ji, 1999, Halliwell e Gutteridge, 2007). Por outro lado, há outras condições fisiológicas, além da produção de energia, tais como a fagocitose, a ação de enzimas oxidases e sinalização celular que contribuem para a produção de tais espécies e que não possuem um papel deletério (Valko *et al.*, 2007, Winterbourn, 2008).

A mitocôndria é o local de maior produção de radicais livres, uma vez que na cadeia de transporte de elétrons O_2 é reduzido à água pela transferência sequencial de quatro elétrons, através de complexos enzimáticos. Assim, na cadeia há uma alternância de reações de oxidação e redução dos seus componentes, o que possibilita um “vazamento” de elétrons, o qual pode ocorrer nos complexos II e III (Figura 1.1). A reação de um elétron diretamente com oxigênio molecular, produz o ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$. Estima-se que 1-2% do oxigênio consumido pela mitocôndria seja convertido em $O_2^{\bullet-}$ (Cadenas e Davies, 2000, Turrens, 2003, Valko *et al.*, 2007). Esta espécie, embora não seja muito reativa frente a muitas biomoléculas, pode reagir rapidamente com outros radicais como NO^{\bullet} e produzir $ONOO^-$, uma espécie altamente oxidante (reação 1).



Em pH muito baixo encontra-se como radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), que é mais redutor que $O_2^{\bullet-}$ com potencial padrão de redução (E°) de -0,46V e -0,33 V, respectivamente (reação 2).



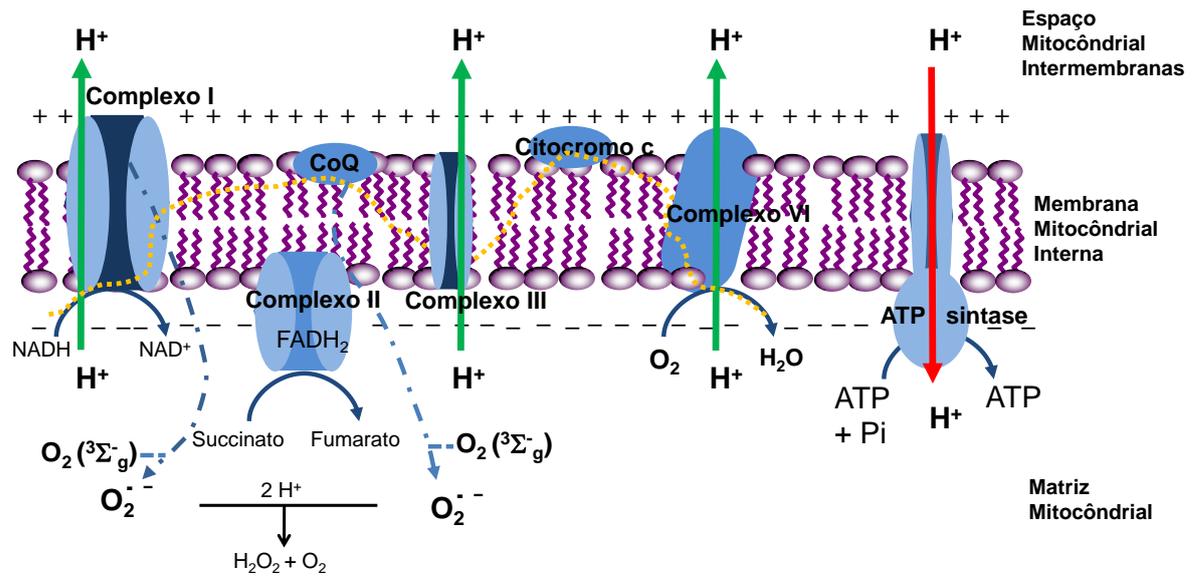
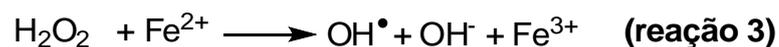


Figura 1.1. Representação da cadeia de transporte de elétrons e formação do ânion $O_2^{\bullet-}$.

O $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer dismutação rápida e espontânea, em solução aquosa, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por sua vez, o H_2O_2 é um oxidante e redutor fraco e pouco reativo, podendo ser reduzido à água pelas enzimas catalase ou glutathione peroxidase. Entretanto, na presença de metais de transição como Fe^{2+} , ocorre a formação do $\bullet OH$ via reação de Fenton (reação 3) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Este radical é extremamente reativo, apresentando um tempo de meia vida de 10^{-9} s *in vivo*, reagindo com várias biomoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA (Ashan *et al.*, 2003, Valko *et al.*, 2007).



A Figura 1.2 mostra a representação da redução sequencial do oxigênio à água e a ação de defesas enzimáticas.

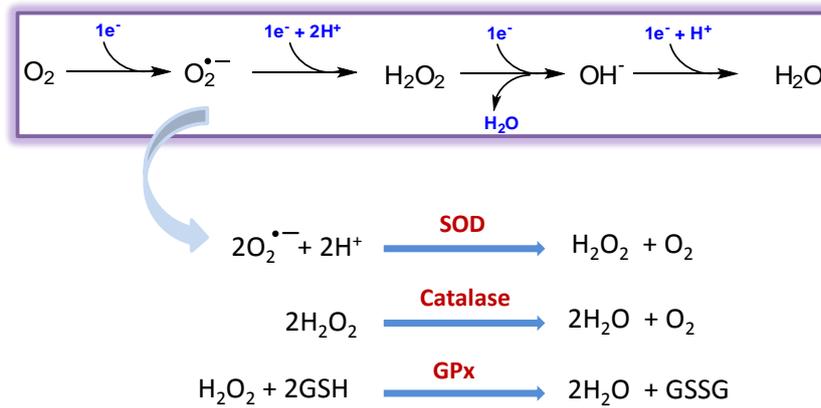
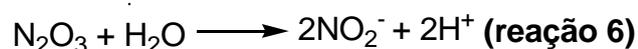


Figura 1.2. Representação da redução sequencial do oxigênio à água e a ação das defesas enzimáticas contra algumas das espécies geradas. SOD – superóxido dismutase, GPx – glutathione peroxidase (Adaptado de Fridovich, 1978).

Também desempenham papel importante em sistemas biológicos ERN. O NO^\bullet foi a primeira espécie gasosa descoberta que é produzida endogenamente, e atua como sinalizadora celular. Esta espécie é gerada por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina, que é convertido a NO^\bullet e L-citrulina. Em sistemas biológicos, o NO^\bullet pode interagir com outras espécies, levando a formação de derivados mais reativos. Além de produzir ONOO^- pela reação com $\text{O}_2^{\bullet -}$, ele reage com oxigênio molecular gerando o NO_2^\bullet , e a combinação deste radical com NO^\bullet produz o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), (reações 4 e 5, respectivamente), este último é um agente nitrosante de proteínas, e tende a hidrolisar em meio aquoso a nitrito NO_2^- (reação 6) (Fukuto *et al.*, 2000, Pryor *et al.*, 2006).



Outra ER relevante é o HOCl produzida por células fagocitárias, a partir da reação entre H_2O_2 e íons cloreto (Cl^-), catalisada pela enzima mieloperoxidase

(MPO) (reação 7). Esta espécie não radicalar, se decompõe rapidamente em Cl_2 gasoso e água (reação 8), principalmente em pH baixo. O HOCl é muito reativo e capaz de oxidar muitas biomoléculas de forma direta ou indireta (Halliwell e Gutteridge, 2007).



Na Figura 1.3 se encontram resumidamente as vias para a formação de ER.

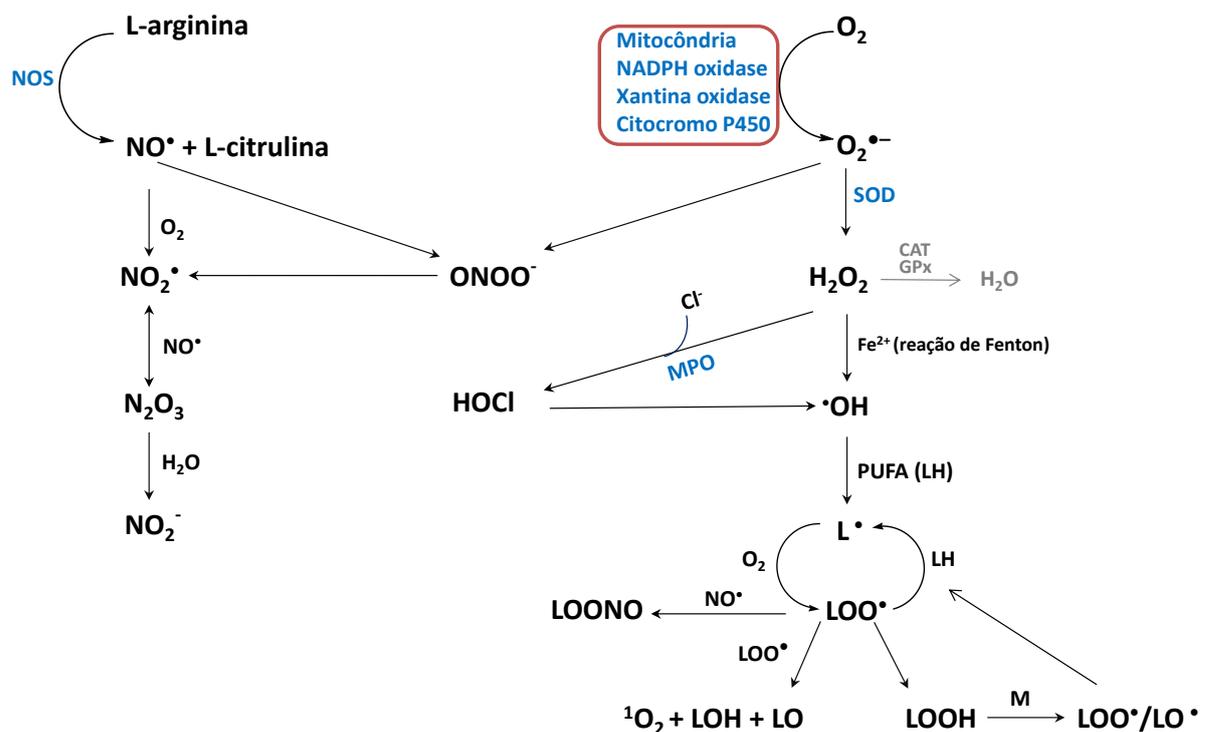


Figura 1.3. Resumo das vias principais para formação de ER. NOS – óxido nítrico sintase, SOD – superóxido dismutase, MPO – mieloperoxidase, CAT – catalase, GPx – glutathiona peroxidase, M – metais de transição, LH – lipídeo, L^\bullet – radical lipídico, LOO^\bullet – radical peroxila lipídico. (Adaptado de Kalyanamaran, 2013).

1.2 – Oxigênio Molecular Singlete

O oxigênio molecular apresenta uma estrutura eletrônica peculiar, conferindo o seu paramagnetismo (Figura 1.4). No estado fundamental o O_2 contém dois elétrons desemparelhados e com spins paralelos, ocupando orbitais degenerados π^* (orbitais diferentes com a mesma energia), constituindo um estado tripleto ($^3\Sigma_g^-$). Estes dois elétrons apresentam, portanto, um mesmo número quântico de spin, e assim, se o oxigênio tentar oxidar um átomo ou molécula aceitando um par de elétrons, o mesmo deverá apresentar spins paralelos para preencher os orbitais π^* . Em geral, os elétrons em um orbital atômico ou molecular apresentam spins antiparalelos, em acordo com o princípio de exclusão de Pauli. Portanto, a redução direta do O_2 por dois elétrons com spins antiparalelos é proibida. Esta restrição de spin faz com que o O_2 aceite apenas um elétron de cada vez, sendo mais reativo com radicais livres e moléculas excitadas no estado tripleto que com outras moléculas orgânicas (Halliwell e Gutteridge, 2007, Cadenas, 1989, Di Mascio *et al.*, 1995).

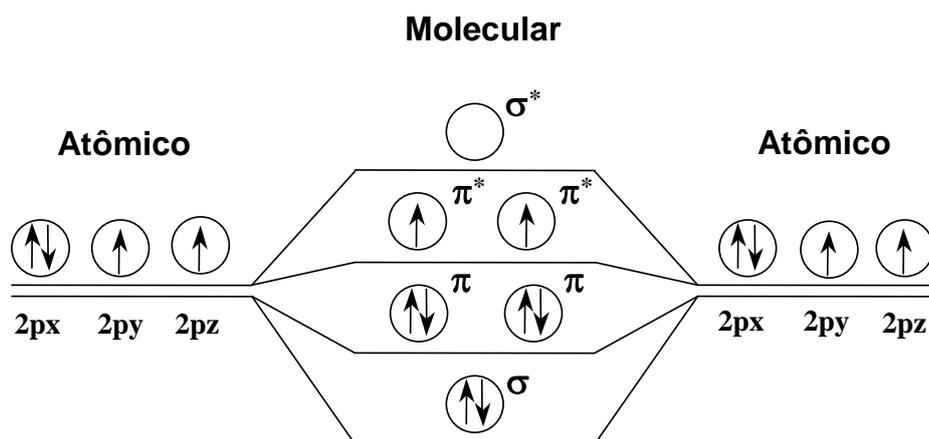


Figura 1.4. Distribuição eletrônica do oxigênio nos orbitais atômicos e molecular.

Para retirada desta restrição de spin é necessário que ocorra absorção de energia pelo oxigênio molecular, o que pode levar a uma alteração na distribuição

eletrônica por meio da inversão do spin do elétron. O oxigênio eletronicamente excitado pode apresentar-se em dois estados distintos o ${}^1\Delta_g$ e ${}^1\Sigma_g^+$, ambas com capacidade de oxidação aumentada em relação ao oxigênio molecular. O primeiro estado (${}^1\Delta_g$) tem uma energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental e uma vida-média alta em torno de 2-4 μ s em H_2O . Já o estado ${}^1\Sigma_g^+$, possui uma energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida média muito menor, decaindo rapidamente para o estado ${}^1\Delta_g$ (Tabela 1). Após estas considerações, podemos dizer de modo geral, que a forma relevante em sistema biológico é a forma ${}^1\Delta_g$ que será denotada no texto como ${}^1\text{O}_2$.

Tabela 1. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares π^* do oxigênio molecular no estado excitado singlete (${}^1\Sigma_g^+$ e ${}^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ${}^3\Sigma_g^-$.

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal / mol)	Tempo de vida (s)
${}^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	10^{-11}
${}^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow \quad \text{—}$	22,5	10^{-6}
${}^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		

O tempo de vida do ${}^1\text{O}_2$ é menor em solução (na ordem de μ s), que em fase gasosa (45 min a pressão zero), em razão da sua desativação por colisão com as moléculas do solvente. Além disso, o seu tempo de vida difere consideravelmente em função do solvente utilizado. Isto se deve ao fato de que a energia de excitação eletrônica proveniente do ${}^1\text{O}_2$ é transformada em energia vibracional do O_2 e do solvente (Schmidt e Afshari, 1992), contribuindo para este

processo, solventes que têm ligações C-H e O-H. Na Tabela 2 (Wilkinson *et al.*, 1995), são listados o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em alguns solventes.

Tabela 2. Tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em diferentes solventes (Wilkinson *et al.*, 1995).

Solvente	Tempo de vida (μs)
Água	4,2
Metanol	11
Etanol	13
Tolueno	27
Benzeno	30
Hexano	31
Acetonitrila	71
Clorofórmio	230
Tetracloroeto de carbono	87000

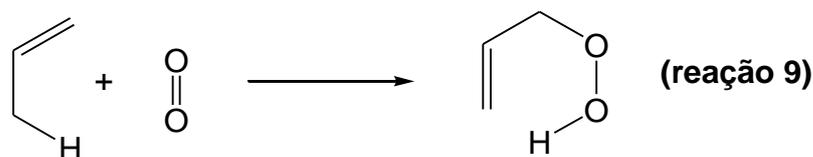
A substituição de átomos de hidrogênio por átomos de deutério aumenta o tempo de vida do $^1\text{O}_2$, já que o átomo de deutério impõe uma restrição vibracional, diminuindo a eficiência de transferência de energia do $^1\text{O}_2$ para o solvente (Monroe, 1985). Esse efeito foi observado pela primeira vez por Kearns que verificou um aumento no tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em água deuterada (Kajiwara e Kearns, 1973).

Outra característica peculiar do $^1\text{O}_2$ é sua capacidade de difusão por distâncias apreciáveis. Em um estudo com uso de células humanas incubadas com dois tipos diferentes de fotossensibilizadores, com propriedades espectroscópicas distintas e capazes de gerar $^1\text{O}_2$, foi observado que a distância de difusão do $^1\text{O}_2$ estava em torno de 10 a 20 nm (Moan e Berg, 1991).

1.2.1 - Reações do Oxigênio Singlete

Uma vez que $^1\text{O}_2$ tem caráter eletrofílico, ele reage com compostos insaturados levando a formação de hidroperóxidos alílicos, dioxetanos e endoperóxidos.

A formação de hidroperóxidos alílicos ocorre via reação do tipo ene. Nesta reação, o $^1\text{O}_2$ reage com uma olefina contendo hidrogênio alílico, promovendo o deslocamento da ligação dupla (reação 9).



Alguns exemplos deste tipo de reação são apresentados na Figura 1.5 (Kearns, 1971).

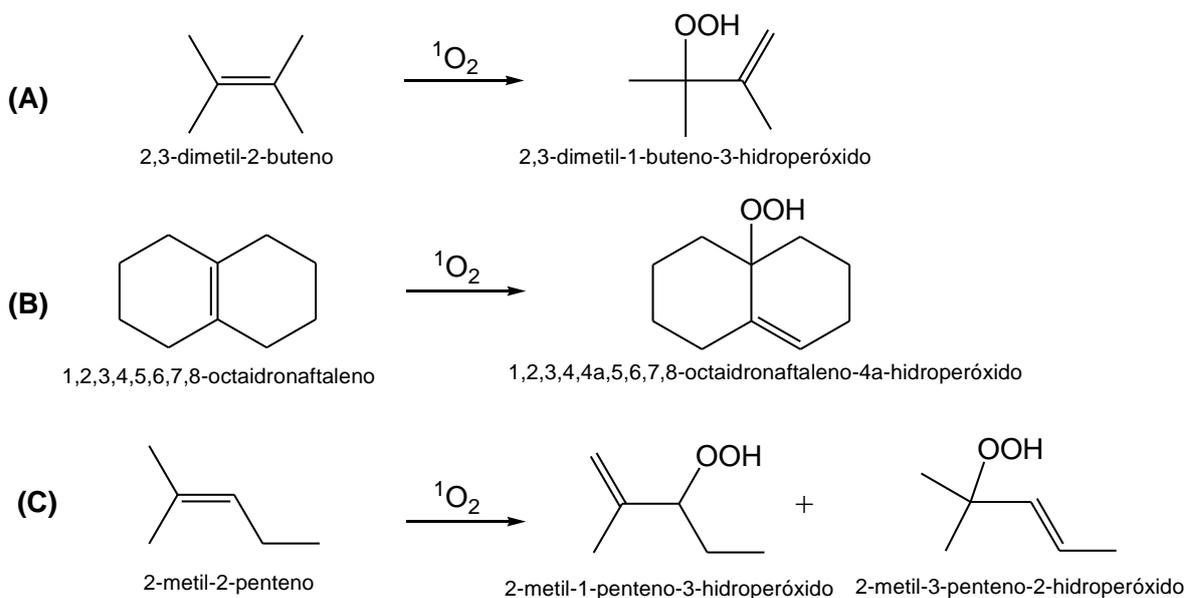
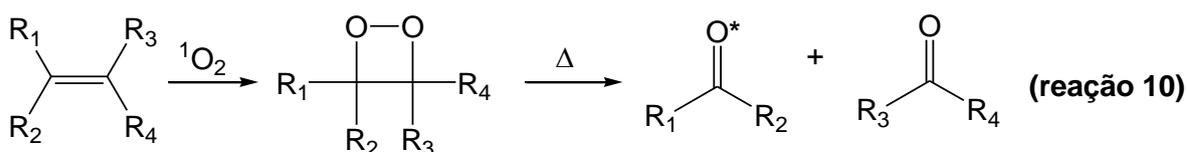


Figura 1.5. Exemplos de hidroperóxidos alílicos obtidos a partir da reação de olefinas com hidrogênio alílico com $^1\text{O}_2$. (A) Reação com 2,3-dimetil-2-buteno, fornecendo 2,3-dimetil-1-buteno-3-hidroperóxido. (B) Reação com 1,2,3,4,5,6,7,8-octaidronaftaleno, fornecendo 1,2,3,4,4a,5,6,7,8-octaidronaftaleno-4a-hidroperóxido (C) Reação com 2-metil-2-penteno, fornecendo 2-metil-1-penteno-3-hidroperóxido e 2-metil-3-penteno-2-hidroperóxido.

Compostos olefínicos sem hidrogênio alílico podem reagir com $^1\text{O}_2$ e resultar numa cicloadição [2+2], produzindo dioxetanos. Estes compostos são moderadamente instáveis e podem sofrer decomposição, gerando duas carbonilas, uma em estado triplete excitado, a qual pode ser verificada pela emissão de luz no visível (Bartlett e Landis, 1979) (reação 10).



Na Figura 1.6 encontram-se alguns exemplos da cicloadição [2+2] (Bartlett e Schaap, 1970).

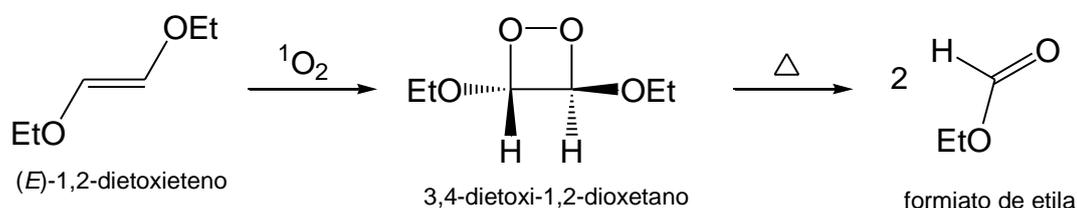
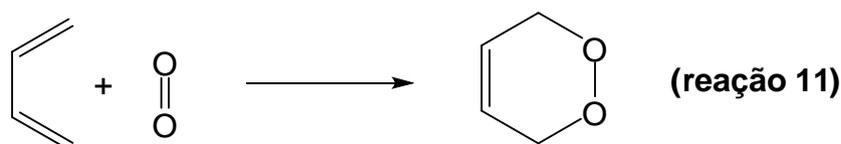


Figura 1.6. Exemplo de reação de cicloadição [2 + 2] entre $^1\text{O}_2$ e olefinas para formação de dioxetano. O composto (E)-1,2-dietoxietano reage com $^1\text{O}_2$, gerando o intermediário 3,4-dietoxi-1,2-dioxetano, o qual se decompõe termicamente fornecendo formiato de etila.

O $^1\text{O}_2$ pode se comportar como um dienófilo na cicloadição [4 + 2] ou reação de Diels-Alder e se adicionar a dienos, produzindo endoperóxidos. A estabilidade destes compostos é bem variada, pois depende da estrutura do substrato (Gilbert e Baggott, 1991) (reação 11).



A formação de endoperóxidos derivados do naftaleno utilizados como uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$ ocorre por meio desta reação. Na Figura 1.7 é apresentada a reação do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) com $^1\text{O}_2$, a qual leva a formação do endoperóxido correspondente DMNO₂.

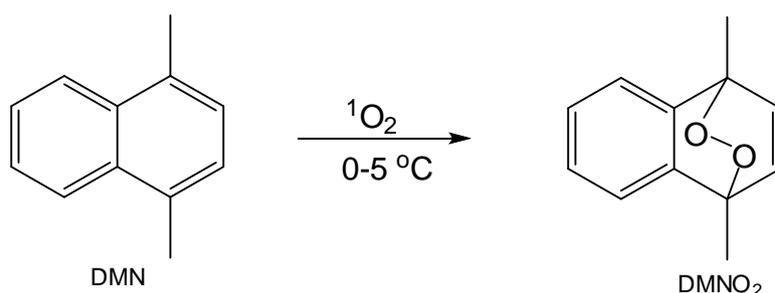
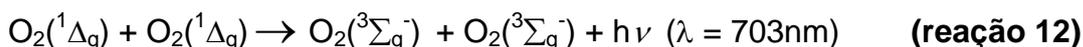


Figura 1.7. Exemplo de reação de cicloadição [4 + 2]. Reação do $^1\text{O}_2$ com 1,4-dimetilnaftaleno (DMN), gerando o endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO₂).

1.2.2 - Métodos de Detecção do Oxigênio Molecular Singlete

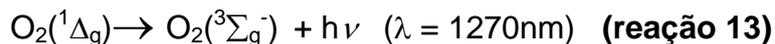
Como o $^1\text{O}_2$ é uma espécie excitada, este pode decair para o estado fundamental com emissão de luz. Este decaimento pode ocorrer de duas formas conhecidas como decaimento bimolecular e monomolecular. Assim, o decaimento bimolecular ocorre através da transição simultânea de duas moléculas de $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental, com bandas de emissão intensa em 634 nm e 703 nm (reação 12) (Khan e Kasha, 1963).



A emissão bimolecular pode ser monitorado por uma fotomultiplicadora sensível na região do vermelho, termoeletricamente resfriada e conectada a um

sistema discriminador e amplificador (Boveris *et al.*, 1981), sendo a intensidade da emissão proporcional ao quadrado da concentração de $^1\text{O}_2$ (Kanofsky, 1989).

O decaimento monomolecular envolve apenas uma molécula de oxigênio, sendo acompanhado por uma emissão de luz no infravermelho próximo, centrada em 1270 nm (reação 13) (Browne e Ogryzlo, 1964).



O decaimento monomolecular pode ser observado através de um espectrômetro, contendo um fotodiodo de germânio como detector. A intensidade de emissão é diretamente proporcional à concentração do $^1\text{O}_2$ (Khan, 1981).

Outra maneira de detectar o $^1\text{O}_2$ é por meio de captadores químicos, que reagem com $^1\text{O}_2$, fornecendo produtos específicos e estáveis que podem ser detectados mesmo em baixa concentração.

Os derivados do antraceno são os captadores mais utilizados, pois fornecem endoperóxidos estáveis a temperatura ambiente através de reações de cicloadição [4 + 2] com o $^1\text{O}_2$. Estes endoperóxidos necessitam de temperaturas relativamente altas, acima de 100°C, para sua decomposição (Aubry *et al.*, 2003). Na Figura 1.8 são apresentados as estruturas do DPA (9,10-difenilantraceno), ADP (9,10-antraceno dipropanoato de sódio) e EAS (sulfato mono-2[(10-sulfoxi-etil)-antraceno-9-il] ester de sódio) como captadores químicos. A utilização da captação química conjuntamente com oxigênio marcado isotopicamente $^{18}\text{O}_2$, torna-se uma ferramenta importante na detecção de $^1\text{O}_2$, com alta especificidade, quando associada a técnicas analíticas e espectroscópicas sensíveis, como a cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectroscopia de massas (HPLC-MS) (Miyamoto *et al.*, 2003a, Uemi *et al.*, 2011).

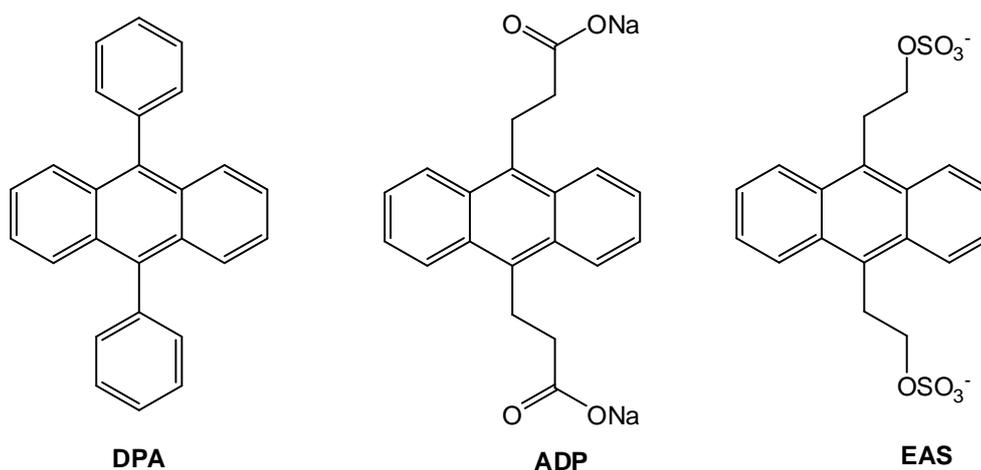


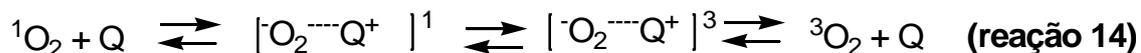
Figura 1.8. Estrutura dos captadores químicos do $^1\text{O}_2$ derivados do antraceno. DPA (9,10-difenilantraceno), ADP (9,10-antraceno dipropanoato de sódio) e EAS (sulfato mono-2[(10-sulfoxi-etil)-antraceno-9-il] ester de sódio).

O uso de solventes deuterados para detecção de $^1\text{O}_2$ é amplamente empregado, uma vez que seu tempo de vida é maior nesses tipos de solventes, conforme anteriormente mencionado. Embora, o efeito do solvente deuterado seja útil para verificar a presença de $^1\text{O}_2$, há restrições em relação à presença do ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$, pois o tempo de vida desta espécie também é aumentado em solventes deuterados (Bielski e Saito, 1971).

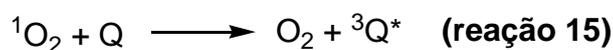
O emprego de supressores físicos representa outra maneira de identificar a formação de $^1\text{O}_2$. A supressão física ocorre com desativação do $^1\text{O}_2$ ao estado fundamental, não havendo formação de produtos e nem consumo de oxigênio. Este processo pode ocorrer através de dois tipos de mecanismos: transferência de carga ou de energia.

No mecanismo de supressão física por transferência de carga há formação de um complexo de transferência de carga entre $^1\text{O}_2$ e supressor Q, que se decompõe e libera O_2 no estado fundamental tripleto (reação 14). Entre os compostos que atuam como supressores por transferência de carga, podemos

citar azida, iodeto, aminas secundárias e terciárias, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, fenóis (Di Mascio *et al.*, 1995; Lissi *et al.*, 1993).



No mecanismo de supressão física por transferência de energia, o supressor Q absorve energia do ${}^1\text{O}_2$, sendo levado ao estado excitado triplete ${}^3\text{Q}^*$ (reação 15 e 16). Os carotenóides que apresentam mais de nove ligações duplas atuam por este mecanismo em uma velocidade próxima ao limite da difusão ($10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Di Mascio *et al.*, 1989).



Na Figura 1.9, estão resumidas os principais métodos de detecção de ${}^1\text{O}_2$.

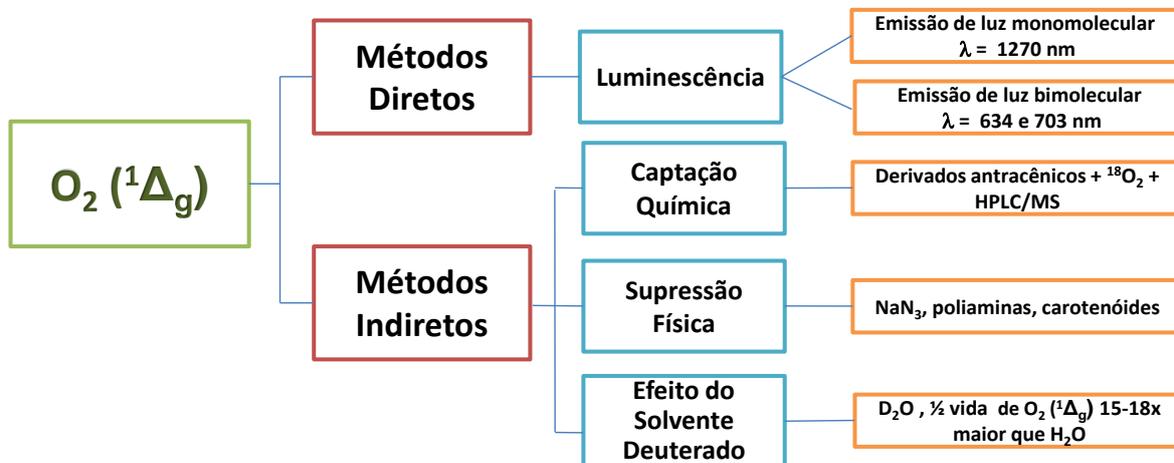


Figura 1.9. Métodos diretos e indiretos utilizados para detecção de ${}^1\text{O}_2$.

1.2.3 – Fontes de Oxigênio Molecular Singlete

O $^1\text{O}_2$ possui um importante papel em sistemas biológicos por sua natureza eletrofílica e capacidade oxidante, reagindo com compostos insaturados e átomos com alta densidade eletrônica, incluindo entre estes, bases de DNA, aminoácidos e lipídeos. As possíveis fontes biológicas de $^1\text{O}_2$ incluem a reação de fotossensibilização mediada por fotossensibilizadores endógenos como as porfirinas (Girotti e Kriska, 2004), o processo de fagocitose na reação de H_2O_2 e Cl^- , que envolve a participação da mieloperoxidase (Kanosky *et al.*, 1984), e a formação de $^1\text{O}_2$ durante a peroxidação lipídica pelo mecanismo de Russell (1957).

Em sistemas químicos o $^1\text{O}_2$ pode ser gerado através de reações de fotossensibilização (Foote, 1968), decomposição térmica de endoperóxidos policíclicos aromáticos (Pierlot *et al.*, 2000; Aubry *et al.*, 2003), desproporcionamento do H_2O_2 com íon hipoclorito (ClO^-) (Khan e Kasha, 1963, Held *et al.*, 1978) ou íon molibdato (MoO_4^{2-}) (Aubry *et al.*, 1989), entre outros. Na Tabela 3 são apresentadas algumas fontes químicas e biológicas de $^1\text{O}_2$.

Tabela 3. Fontes químicas e biológicas de $^1\text{O}_2$.

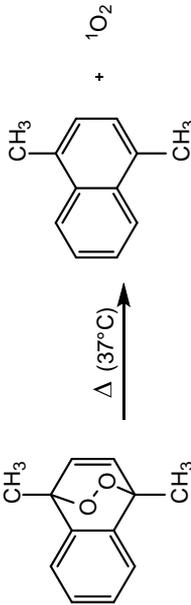
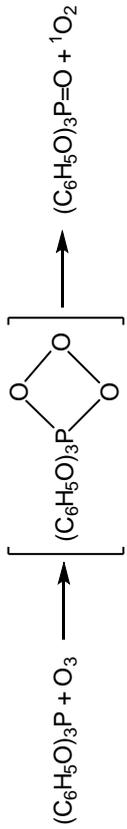
Fontes de $^1\text{O}_2$	Mecanismo	Referência
Fotossensibilização	$\text{FS} \xrightarrow{h\nu} \text{FS}^{1*} \xrightarrow{\text{cruzamento intersistema}} \text{FS}^{3*} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{FS} + ^1\text{O}_2$	Foote, 1968
Desproporcionamento de H_2O_2	$2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{MoO}_4^{2-} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{MoO}_6^{2-}$ $\text{MoO}_6^{2-} \longrightarrow \text{MoO}_4^{2-} + ^1\text{O}_2$	Aubry <i>et al.</i> , 1989
Oxidação de H_2O_2 por ClO^-	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$	Khan e Kasha, 1963.
Termólise de endoperóxidos aromáticos policíclicos		Pierlot <i>et al.</i> , 2000
Reação de ONOO^- e H_2O_2	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ONOO}^- \longrightarrow [\text{O}_2\text{NOO}^\cdot] \longrightarrow \text{NO}_2^- + ^1\text{O}_2$	Di Mascio <i>et al.</i> , 1994 Miyamoto <i>et al.</i> , 2009
Decomposição de ozonídeos		Murray e Kaplan, 1969

Tabela 4. (Continuação)

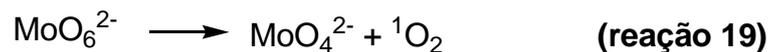
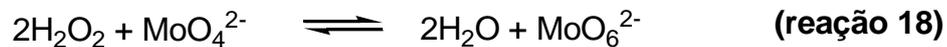
Fontes de ¹ O ₂	Mecanismo	Referência
Desproporcionamento de peróxidos	$\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OOH} + 2 \cdot\text{OH} \longrightarrow \text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}^- + \text{H}_2\text{O} + {}^1\text{O}_2$	McKeown e Waters, 1966
Decomposição térmica de dioxetanos		Briviba et al., 1996
Peroxidação lipídica		Russell, 1957
Reações enzimáticas (indireta)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{MPO}} \text{H}_2\text{O} + \text{HOCl}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HOCl} \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ + \text{Cl}^- + {}^1\text{O}_2$	Kanofsky et al., 1984

1.2.3.1 – Oxidação e Desproporcionamento do Peróxido de Hidrogênio

A geração de $^1\text{O}_2$ foi observado na reação entre H_2O_2 e ClO^- , através da emissão de luz proveniente do decaimento dimolecular de $^1\text{O}_2$ (Kasha em 1963, Held *et al.*, 1978), sendo deste então um método muito utilizado para produção desta espécie em sistemas químicos (reação 17).



O desproporcionamento de H_2O_2 por íons MoO_4^{2-} ocorre em soluções básicas, fornecendo $^1\text{O}_2$ quantitativamente, através da formação do íon intermediário diperoximolibdato (MoO_6^{2-}) (reações 18 e 19, respectivamente).



Estes métodos, entretanto, não são muito adequados para o uso em sistemas biológicos, uma vez podem levar a reações secundárias, produzindo produtos de maior toxicidade e não podem ser utilizadas com substratos que reagem com H_2O_2 .

1.2.3.2 – Fotossensibilização

A fotossensibilização é um método amplamente utilizado para geração de $^1\text{O}_2$ em sistemas químicos e biológicos. Este método é muito vantajoso, pois é suave, limpo, controlável e altamente específico para introdução de oxigênio em moléculas orgânicas (Foote, 1968, Kochevar e Redmond, 2000). Na fotossensibilização são necessários O_2 molecular, luz em um comprimento de onda apropriado e um composto fotossensibilizador com capacidade de absorver energia e transferi-la para o oxigênio atingir seu estado excitado singlete (Kochevar e Redmond, 2000, DeRosa e Crutchley, 2002).

Inicialmente, na fotossensibilização há excitação eletrônica do fotossensibilizador ao estado singlete (FS^{1*}) pela absorção de fótons de luz, sendo este levado ao estado excitado triplete (FS^{3*}), na maioria dos casos, por um processo conhecido como cruzamento intersistemas. Existem dois destinos possíveis para o FS^{3*} . No mecanismo tipo I há transferência de energia, elétrons ou de prótons entre o FS^{3*} e o substrato (S). Esse processo leva a formação de radicais que podem reagir com o O_2 , resultando em produtos oxidados. No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia do FS^{3*} para o O_2 gerando 1O_2 (Figura 1.10). Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente e a razão entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, substrato e concentração de oxigênio (Foote, 1991).

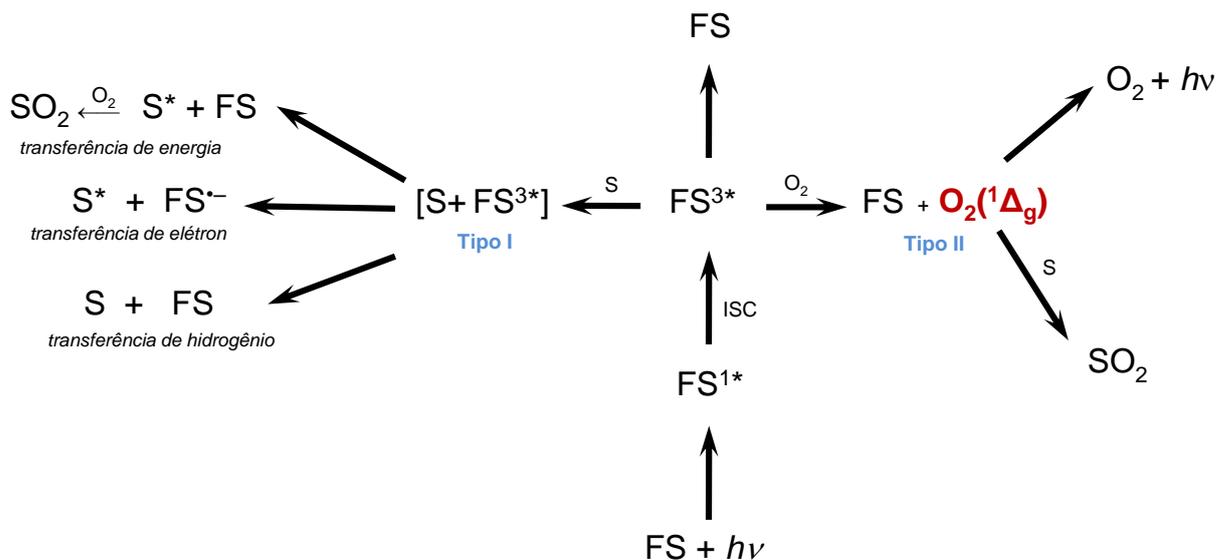


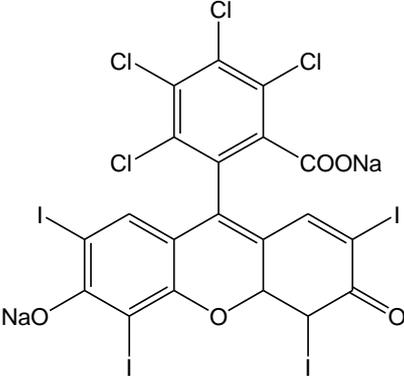
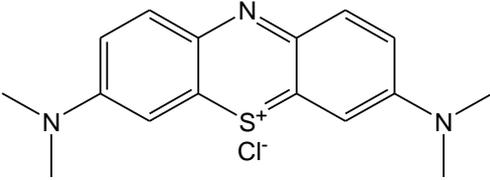
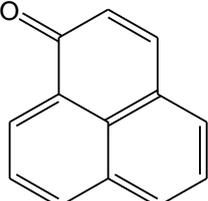
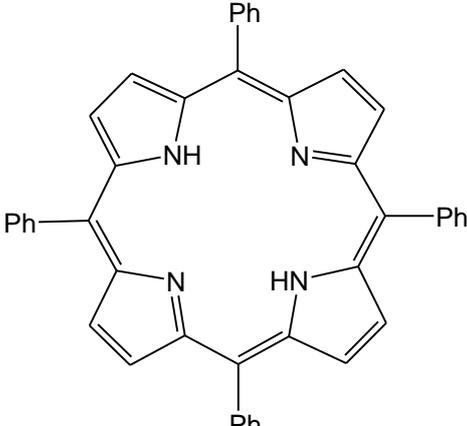
Figura 1.10. Mecanismos tipo I e tipo II da fotossensibilização. (S= substrato, FS= fotossensibilizador, ISC= cruzamento intersistemas, SO_2 substrato oxidado).

Os fotossensibilizadores devem ter como características desejáveis um alto coeficiente de absorção na faixa espectral de excitação de luz, um estado triplete de energia apropriada, que permita a transferência de energia eficientemente para

o oxigênio molecular no estado fundamental, um alto rendimento quântico e um tempo de vida longo do estado triplete, uma vez que a eficiência do fotossensibilizador está relacionada com suas propriedades no estado triplete excitado, além de ser foto-estável (DeRosa e Crutchley, 2002). Entre os fotossensibilizadores mais utilizados estão o azul de metileno, a rosa bengala e derivados da porfirina que apresentam bandas de absorção de luz na região do visível (Tabela 4).

Recentemente, proteínas modificadas por engenharia genética têm sido estudadas quanto sua aplicação como fotossensibilizadores na geração de $^1\text{O}_2$. Estes fotossensibilizadores são mais seletivos em relação a seus alvos, e podem propiciar o estudo de funções celulares localmente, de forma mais específica, embora ainda sejam ferramentas raramente disponíveis (Qi *et al.*, 2012). Dentre estas proteínas, destaca-se a miniSOG (mini singlet oxygen generator), uma flavoproteína fluorescente verde, contendo 106 aminoácidos, proveniente da fototropina 2. Seu pequeno tamanho agrega um diferencial, sendo muito conveniente para fusão com outras proteínas. Quando irradiada com luz azul, miniSOG é capaz de gerar $^1\text{O}_2$ em quantidade suficiente para oxidar o composto diaminobenzidina (Shu *et al.*, 2011) e para provocar ablação celular de neurônios em *Caenorhabditis elegans* (Qi *et al.*, 2012). O rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) para miniSOG é de $0,47 \pm 0,05$, muito semelhante ao da flavina mononucleotídeo (FMN) cujo valor Φ_Δ é de 0,51 (Shu *et al.*, 2011).

Tabela 4. Exemplos de fotossensibilizadores e seus parâmetros fotofísicos (Kochevar et al, 2000).

Fotossensibilizador	Faixa de absorção (nm)	Rendimento quântico de 1O_2	Solvente
 <p data-bbox="406 846 587 875">Rosa bengala</p>	450-580	0,76	Água, Metanol
 <p data-bbox="387 1093 608 1122">Azul de metileno</p>	550-700	0,52	Água, Metanol
 <p data-bbox="419 1368 579 1397">Fenalenona</p>	< 400	0,95	Solventes orgânicos
 <p data-bbox="400 1868 596 1930">Porfirina meso-tetrafenil</p>	300-650	0,62	Solventes orgânicos

A geração de $^1\text{O}_2$ pode ocorrer por fotossensibilização em determinadas patologias, como por exemplo, nas porfirias cutâneas, que estão relacionadas à defeitos na biossíntese do heme. Com o acúmulo de porfirinas na pele, a exposição à luz leva a produção excessiva de $^1\text{O}_2$ e outras espécies reativas, resultando em ulcerações na pele (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.2.3.3 - Endoperóxidos Como Fonte de $^1\text{O}_2$

A termólise de endoperóxidos de compostos aromáticos como antraceno, derivados do naftaleno, rubreno, podem liberar oxigênio, geralmente em sua forma excitada singlete (Aubry, 2003). A primeira observação de que $^1\text{O}_2$ reagia com compostos policíclicos aromáticos, formando endoperóxidos, e que estes compostos liberavam “oxigênio em estado ativado” foi feita utilizando-se o rubreno (Moureu *et al.*, 1926), mas a natureza das espécies envolvidas ($^1\text{O}_2$) somente foi elucidada em 1972 por Wasserman e Larsen, empregando o endoperóxido do 9,10-difenilantraceno (DPAO₂).

Endoperóxidos de derivados naftalênicos podem ser uma ótima fonte de $^1\text{O}_2$, principalmente em estudos realizados em sistemas biológicos, destacando-se por sua capacidade em liberar $^1\text{O}_2$ ao serem moderadamente aquecidos. Além disso, os endoperóxidos naftalênicos podem apresentar propriedades hidrofílicas e lipofílicas diferenciadas, e assim serem capazes de atingir diferentes alvos celulares (Martinez *et al.*, 2000a).

O primeiro derivado naftalênico sintetizado foi o 3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio (MNP). Embora seu endoperóxido correspondente fosse capaz de gerar $^1\text{O}_2$ em meio aquoso e a temperatura ambiente, sua solubilidade não era significativa (10^{-2} M em pH 7,5), uma vez que continha apenas um grupo

hidrofílico como substituinte (Saito *et al.*, 1981 e 1983). A introdução de um segundo grupo carboxila levou a formação do composto 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDP), e aumentou a solubilidade em água do endoperóxido correspondente (maior que 1,0 M) (Nieuwint *et al.*, 1985). Entretanto, estudos utilizando os endoperóxidos do MNP e NDP indicaram que estes compostos aniônicos não foram capazes de liberar $^1\text{O}_2$ nas proximidades do alvo desejado, mesmo gerando-o em fase aquosa (Di Mascio *et al.*, 1990, Ribeiro *et al.*, 1995, Dewilde *et al.*, 1996, Nakano *et al.*, 1998).

Novos compostos derivados do naftaleno foram sintetizados (Pierlot *et al.*, 1996 e 2000, Dewilde *et al.*, 1998). O diferencial em tais compostos era a presença de substituintes como sais quaternários de amônio, cloreto de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio (MNEA) ou grupamentos hidrofílicos não iônicos, como 1,4-dihidroximetil-naftaleno (HMN) e N,N'-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN). Estes substituintes propiciaram aos endoperóxidos certa afinidade por polinucleotídeos, sítios carregados negativamente e alvos intracelulares.

O naftaleno não reage com $^1\text{O}_2$, mas a presença de grupos doadores de elétrons nas posições 1 e 4 do anel naftalênico aumentam sua densidade eletrônica, contribuindo para o aumento da reatividade em relação ao $^1\text{O}_2$, de natureza eletrofílica. Substituintes que podem aumentar a hidrofiliidade da molécula como álcool (-OH), sais de ácido carboxílico (-COO⁻ Na⁺), sulfonato (SO³⁻ Na⁺), cloreto de amônio quaternários (-N(R)₃⁺Cl⁻), podem diminuir a reatividade do anel, e não devem ser ligadas diretamente a ele. Entretanto, a separação destas funções orgânicas pode ser feita por um ou dois grupos doadores de elétrons nas posições 1,4 do naftaleno, que funcionam como

espaçadores. Outra característica importante para os substituintes do anel naftalênico é que eles devem ser inertes ao $^1\text{O}_2$ e as fontes utilizadas para geração desta espécie (Aubry *et al.*, 1996, Pierlot *et al.*, 2000, Martinez *et al.* 2000a). Na Figura 1.11 são apresentadas as estruturas dos derivados naftalênicos dos compostos mencionados.

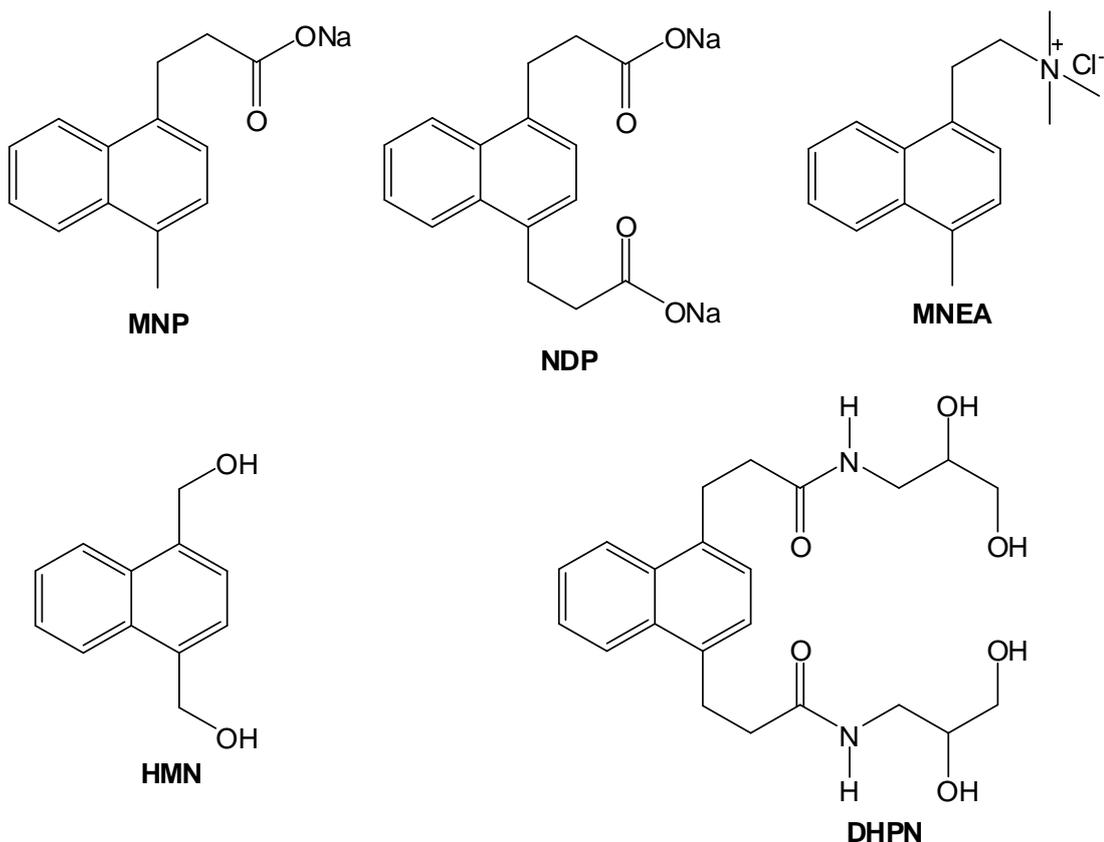
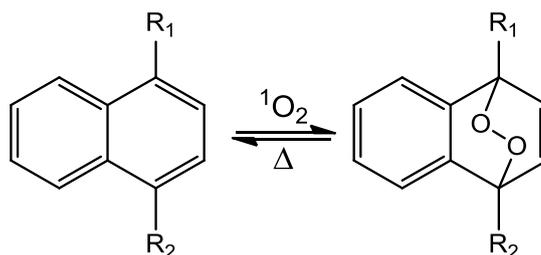


Figura 1.11. Derivados naftalênicos com substituintes hidrofílicos. MNP (3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio), NDP (3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio), MNEA (cloreto de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio), HMN (1,4-dihidroximetil-naftaleno), e DHPN (N,N'-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida).

Na síntese de endoperóxidos de derivados naftalênicos são empregadas duas fontes primárias de $^1\text{O}_2$, o desproporcionamento do H_2O_2 catalisado por molibdato (MoO_4^{2-}) (Aubry *et al.*, 1989), e reações de fotossensibilização a baixa temperatura (Pierlot *et al.*, 2000). Para escolha do método a ser aplicado, deve-se considerar as propriedades físico-químicas do composto naftalênico. Para compostos que apresentam substituintes carboxilados, como o MNDP e NDP, o desproporcionamento de H_2O_2 catalisado por molibdato é mais indicado, já que o endoperóxido pode ser recuperado por precipitação da forma ácida. A reação de fotossensibilização é mais empregada, levando-se em conta a remoção do fotossensibilizador no final do processo. O uso de solventes deuterados (D_2O e CDCl_3), contribui para diminuir o tempo reacional, já que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é maior em tais solventes.

A termólise do endoperóxido naftalênico apresenta uma cinética de primeira ordem, com constante de velocidade k . A Tabela 6 apresenta os valores de $t_{50\%}$ e $t_{95\%}$ (tempo necessário para decompor 50% e tempo para decompor 95% dos endoperóxidos, respectivamente). De modo geral, pode-se afirmar que os endoperóxidos derivados do naftaleno liberam $^1\text{O}_2$ com cerca de 50% de rendimento (Pierlot *et al.*, 1996 e 2000).

Tabela 5. Termólise de endoperóxidos de derivados naftalênicos (Martinez et al., 2000a).



- (a) $R_1 = -(CH_2)_2COONa$ $R_2 = -CH_3$
 (b) $R_1 = -(CH_2)_2COONa$ $R_2 = R_1$
 (c) $R_1 = -(CH_2)_2N(CH_3)_3^+ Cl^-$ $R_2 = -CH_3$
 (d) $R_1 = -CH_2OH$ $R_2 = R_1$
 (e) $R_1 = -(CH_2)_2CONHCH_2CHOHCH_2OH$ $R_2 = R_1$

	MNPO ₂ ^(a)	NDPO ₂ ^(b)	MNEAO ₂ ^(c)	HMNO ₂ ^(d)	DHPNO ₂ ^(e)
t _{50%} (min) ^a	23	23	22	70	23
t _{95%} (min) ^b	99	99	95	300	99
¹ O ₂ (%) ^c	45	50	65	51	59

^a Tempo necessário para decompor 50% dos endoperóxidos $t_{50\%} = \ln 2/k$. ^b Tempo necessário para decompor 95% dos endoperóxidos $t_{95\%} = \ln 20/k$. ^c Rendimento acumulativo de ¹O₂ produzido na termólise.

1.3 - Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é um evento complexo que leva a formação de vários produtos com ação biológica, com atuação tanto em processos patológicos quanto fisiológicos. Os ácidos graxos poliinsaturados são os principais componentes da membrana celular e podem facilmente sofrer oxidação. Essa suscetibilidade de oxidação pode ser explicada pela presença de hidrogênios alílicos na estrutura química dos ácidos graxos poliinsaturados, que podem ser abstraídos por espécies ERO e/ou ERN.

Os hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) são os produtos primários da peroxidação lipídica (Esterbauer, 1993; Frankel, 1991, Hogg e Kalyanaraman,

1999) e por serem mais polares modificam a estrutura e função das membranas. Os LOOH apresentam potencial ação deletéria para as células, sendo assim, estas possuem um sistema de defesa próprio que incluem enzimas da família da glutathione peroxidase (GPx) e fosfolipases (Ursini *et al.*, 1991; van Kujik *et al.*, 1987). Em situações normais a maioria dos LOOH formados na célula são detoxificados, mas em situações que o estresse oxidativo prevalece, os LOOH podem se acumular e participar de reações secundárias. Grande parte dos efeitos deletérios de LOOH é resultante da sua decomposição, a qual leva a formação de radicais livres e compostos secundários e terciários de maior reatividade e toxicidade (Esterbauer *et al.*, 1991; Gardner, 1989).

Diversas condições patológicas como aterogênese, lesões de isquemia de reperfusão e carcinogênese induzida por UV, tem sido relacionados com a peroxidação lipídica (Girotti, 1998). Entretanto, mais recentemente foram atribuídos papéis biológicos diversos aos produtos da peroxidação lipídica, os quais podem atuar *in vivo* como mensageiros da sinalização celular, reguladores da expressão gênica e fatores de transcrição nuclear (Niki, 2009).

A formação dos LOOH pode ocorrer de três formas distintas: 1) através da oxidação mediada por espécies radicalares, 2) por meio de reações oxidativas não radicalares e 3) através de reações mediadas por enzimas (Niki, 2009).

A peroxidação lipídica mediada por espécies reativas radicalares ocorre por reações em cadeia, sendo composta de três etapas: iniciação, propagação e terminação (Porter, 1986 e 1995; Frankel, 1991; Esterbauer, 1993). Na primeira etapa, há o ataque a bicamada lipídica por qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-aliílico de um ácido graxo

insaturado (LH), gerando um radical lipídico (L^\bullet) centrado no átomo de carbono, que é estabilizado por ressonância, formando um radical dieno conjugado.

Em condições aeróbicas, L^\bullet reage rapidamente com o oxigênio ($k = 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Hasegawa e Patterson, 1978), produzindo o radical peroxila (LOO^\bullet). Este, por sua vez, é capaz de abstrair um hidrogênio de lipídeos vizinhos, gerando outro radical lipídico (L^\bullet) e assim iniciando a etapa de propagação. A etapa de abstração de hidrogênio por LOO^\bullet é lenta ($k = 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), permitindo que antioxidantes, que funcionem como doadores de hidrogênio, como a vitamina E possam reagir com LOO^\bullet ($k = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), interrompendo a reação em cadeia, com formação de um hidroperóxido lipídico (LOOH) (Buettner, 1993).

Metais de transição, como ferro ou cobre, podem catalisar a etapa de propagação, pois estes promovem a quebra de hidroperóxidos lipídicos, gerando radicais alcoxila (LO^\bullet) e peroxila (LOO^\bullet) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Em geral, a formação de LOO^\bullet é promovida por metais no estado de oxidação mais alto, como o Fe^{3+} , enquanto a reação com metais no estado de oxidação mais baixo, como o Fe^{2+} , promovem a formação de LO^\bullet (Figura 1.12).

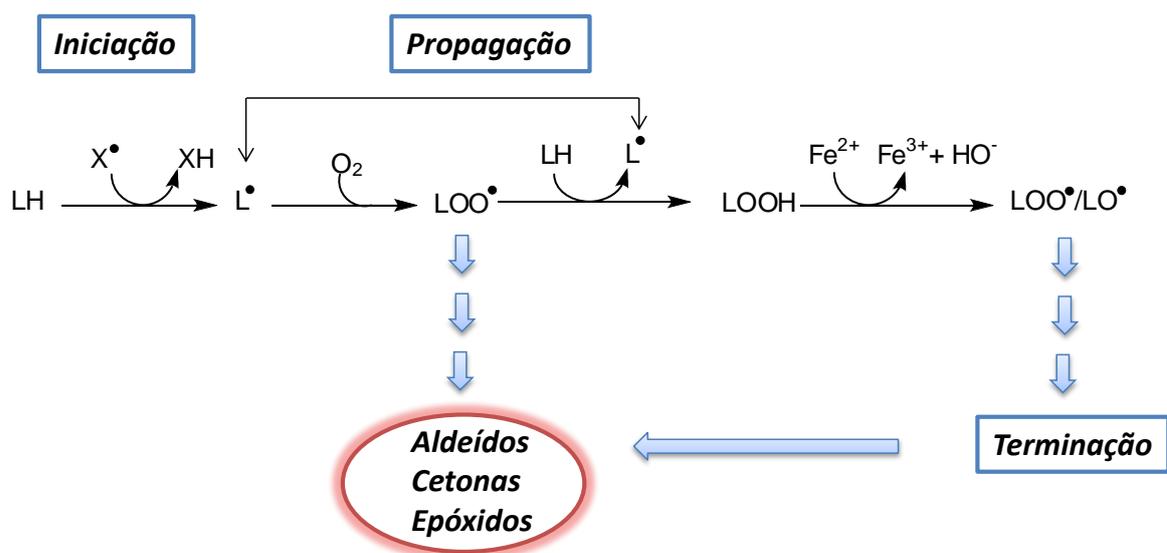


Figura 1.12. Representação geral das etapas da peroxidação lipídica.

Na etapa de terminação ocorrem reações de combinação entre radicais (LOO^\bullet e/ou LO^\bullet), gerando dímeros e polímeros, reações intramoleculares, formando peróxidos cíclicos, endoperóxidos, epóxidos e reações de fragmentação, levando a formação de aldeídos, cetonas e outros produtos secundários de cadeia mais curta (Esterbauer, 1993). Esses produtos secundários são mais estáveis que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação, e conseqüentemente, podem atingir pontos distantes do local em que foram formados. Na Figura 1.13 são apresentadas as estruturas de alguns aldeídos formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados.

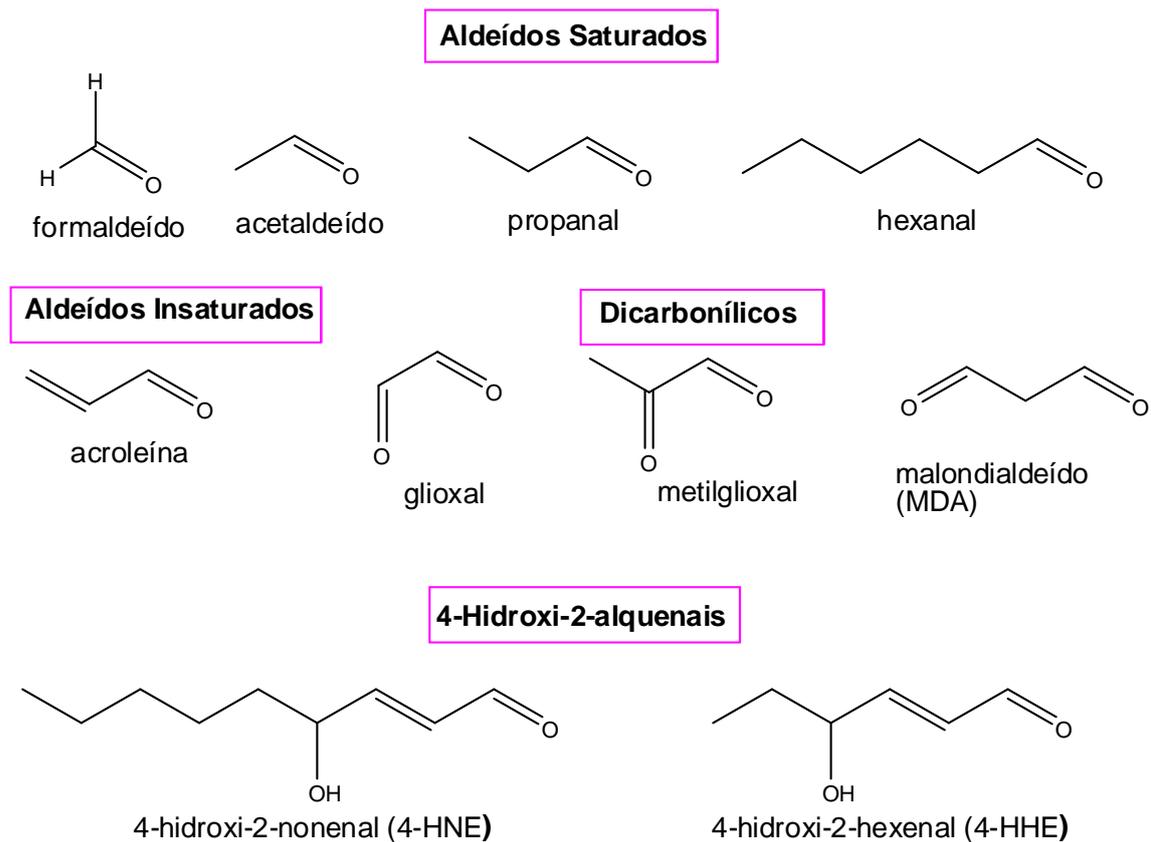


Figura 1.13. Estruturas de alguns aldeídos formados pela oxidação de ácidos graxos insaturados (adaptado de Salvayre et al., 2008)

A peroxidação lipídica também promove a formação de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos através do mecanismo de Russell (1957). Neste mecanismo, radicais peroxila (ROO^\bullet), reagem entre si gerando um intermediário tetraóxido linear (ROOOOR), que se decompõe via um mecanismo cíclico, formando uma cetona, um álcool e oxigênio molecular (Figura 1.14). De acordo com a regra de conservação de spin de Wigner, foi proposto que esta reação gera oxigênio molecular no estado singlete ou carbonila triplete (Howard e Ingold, 1968; Kellog, 1969). Estudos posteriores sugeriram que a espécie predominantemente formada nesta reação era o $^1\text{O}_2$ e que o rendimento de carbonila triplete era 1000 a 10.000 vezes menor (Mendenhall, 1991). Mais recentemente, estudos empregando espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta performance com hidroperóxidos de ácido linoleico, marcados isotopicamente com oxigênio 18 ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$), e o captador químico DPA, evidenciaram a formação de $^1\text{O}_2$ marcado ($^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$). A geração desta espécie foi confirmada pela detecção da emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho próximo (Near-IR) e aquisição de espectros de emissão de luz. Além disso, foram encontrados os produtos álcool e cetona marcados isotopicamente com $^{18}\text{O}_2$, indicando o envolvimento do mecanismo de Russell na geração de $^1\text{O}_2$ (Miyamoto *et al*, 2003 a e b, 2005).

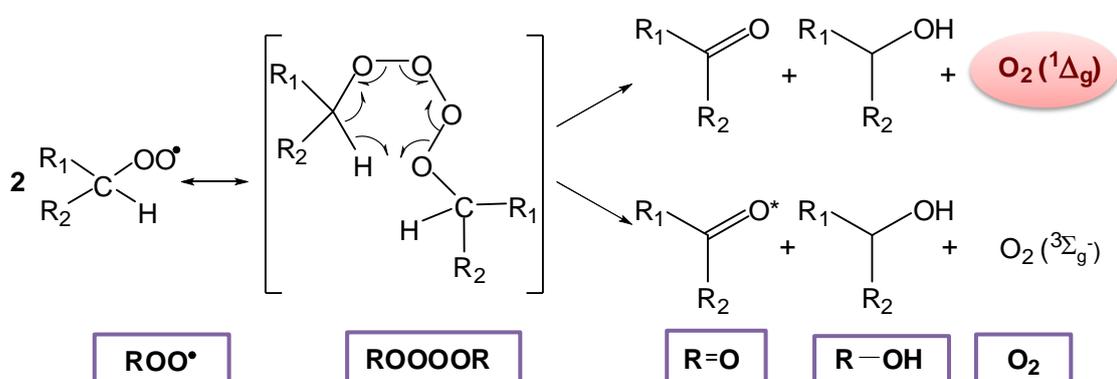


Figura 1.14. Esquema do mecanismo de Russell (1957).

O $^1\text{O}_2$ também pode promover a peroxidação lipídica por um mecanismo não radicalar. Por exemplo, o $^1\text{O}_2$ oxida os lipídeos insaturados principalmente através de reações tipo ene, fornecendo hidroperóxidos com concomitante migração da ligação dupla, e reações secundárias como a cicloadição [4 + 2], produzindo 1,4- endoperóxidos e cicloadição [2 + 2], produzindo dioxetanos, que se decompõem produzindo compostos carbonílicos e luminescência (Di Mascio *et al.*, 1992). Portanto, oxidação do ácido linoleico pelo $^1\text{O}_2$ fornece os isômeros 9, 10, 12 e 13 LAOOH, enquanto a peroxidação mediada por radicais livres fornece apenas os isômeros 9 e 13-LAOOH (Terao e Matsushita, 1977, Minami *et al.*, 2008). O número de isômeros dos hidroperóxidos produzidos pela peroxidação lipídica depende do número de ligações duplas (n) presentes no ácido poliinsaturado, sendo igual a $2n-2$. Assim, por exemplo, a peroxidação do ácido linoleico (18:2), que possui duas ligações duplas, gera dois isômeros, o ácido linolênico (18:3) com três ligações duplas gera 4 isômeros e ácido araquidônico (20:4) com quatro ligações duplas gera seis isômeros de hidroperóxidos (Esterbauer, 1993).

A produção de LOOH por via enzimática é mediada pela ação de enzimas como lipoxigenases (LOX) e prostaglandinas endoperóxido H síntase (PGHS), que levam a produção de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), os quais por sua vez desempenham o papel de mediadores da inflamação.

O ácido araquidônico é o principal alvo para ação das enzimas PGHS-1 e PGHS-2 (seus nomes genéricos COX 1 e 2, respectivamente), que exibem duas atividades catalíticas distintas. Uma delas é responsável pela inserção de duas moléculas de O_2 (atividade ciclooxigenase, COX), levando a formação do primeiro

intermediário da via de formação de prostanóides, a prostaglandina G_2 (PGG_2), e a outra atividade catalítica é peroxidásica (POX), responsável pela redução por dois elétrons do grupo 15-hidroperoxila de PGG_2 , levando a formação de prostaglandina H_2 (PGH_2) (Figura 1.15). Estas reações ocorrem em locais distintos, mas estão conectados funcional e estruturalmente. Deste modo, a reação de redução ocorre no sítio ativo do grupo heme, localizado próximo à superfície da proteína. Já as reações de bis-oxigenação ocorrem em um canal hidrofóbico no centro da proteína e é dependente de peróxido, requerendo que o grupo heme de POX sofra uma oxidação por dois elétrons (Landino *et al.*, 1997. Smith *et al.* 2000).

Em relação ao mecanismo para formação de PGG_2 , primeiramente há retirada do átomo de hidrogênio bis-alílico pro-S no carbono 13 do ácido araquidônico, considerado o passo limitante da reação. Então, há formação de um radical araquidonila, que sofre um rearranjo e há introdução de O_2 no carbono 11, com formação de um radical hidroperoxila. Este radical sofre uma ciclização, formando um endoperóxido e um radical no carbono 8. Após uma nova ciclização, é obtido um anel de cinco membros e um radical centrado no carbono 15, que sofre adição de uma molécula de O_2 e reintrodução do hidrogênio abstraindo inicialmente, formando um hidroperóxido (Smith *et al.*, 2011).

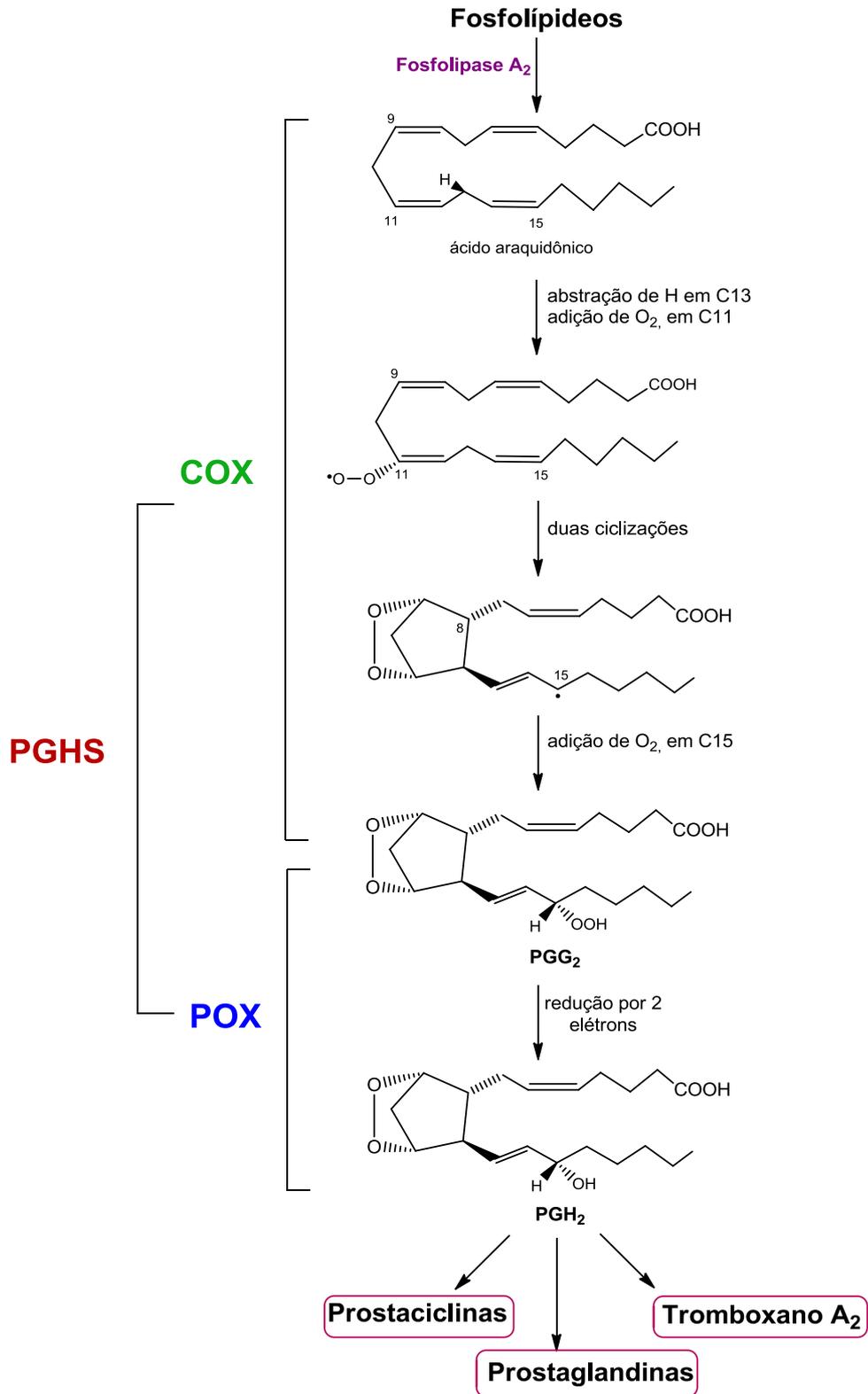


Figura 1.15. Biossíntese de prostanóides derivados do ácido araquidônico. Mecanismo de catálise da ciclooxigenase (COX) com formação de PGG₂ e peroxidase com formação de PGH₂ (Adaptado de Schneider et al., 2007 e Smith et al., 2000).

LOX promovem a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados a seus respectivos hidroperóxidos. Trata-se de proteínas não-heme, que contêm ferro em seu centro catalítico, em estado reduzido Fe^{2+} na forma inativa da enzima, sendo necessária para ativação da forma catalítica a oxidação para Fe^{3+} . No mecanismo de catálise de LOX, ocorre abstração estereosseletiva de um hidrogênio de um grupo metilênico bis-alílico do ácido graxo, com consequente formação de um radical centrado no carbono (L^\bullet). O radical reage com o oxigênio molecular, produzindo um radical peroxila (LOO^\bullet), o qual é reduzido para ânion peroxila LOO^- , formando Fe^{3+} . O ânion recebe um próton formando o hidroperóxido (LOOH) como produto final (Brash, 1999, Kuhn e Borchert, 2002). Na Figura 1.16 está representado o mecanismo catalítico de LOX.

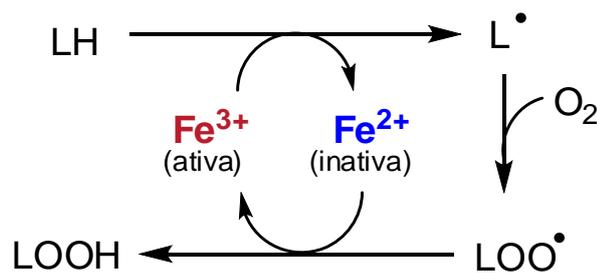


Figura 1.16. Mecanismo de catálise de lipoxigenases (adaptado de Brash, 1999).

1.3.1 – Óxido Nítrico e Peroxidação Lipídica

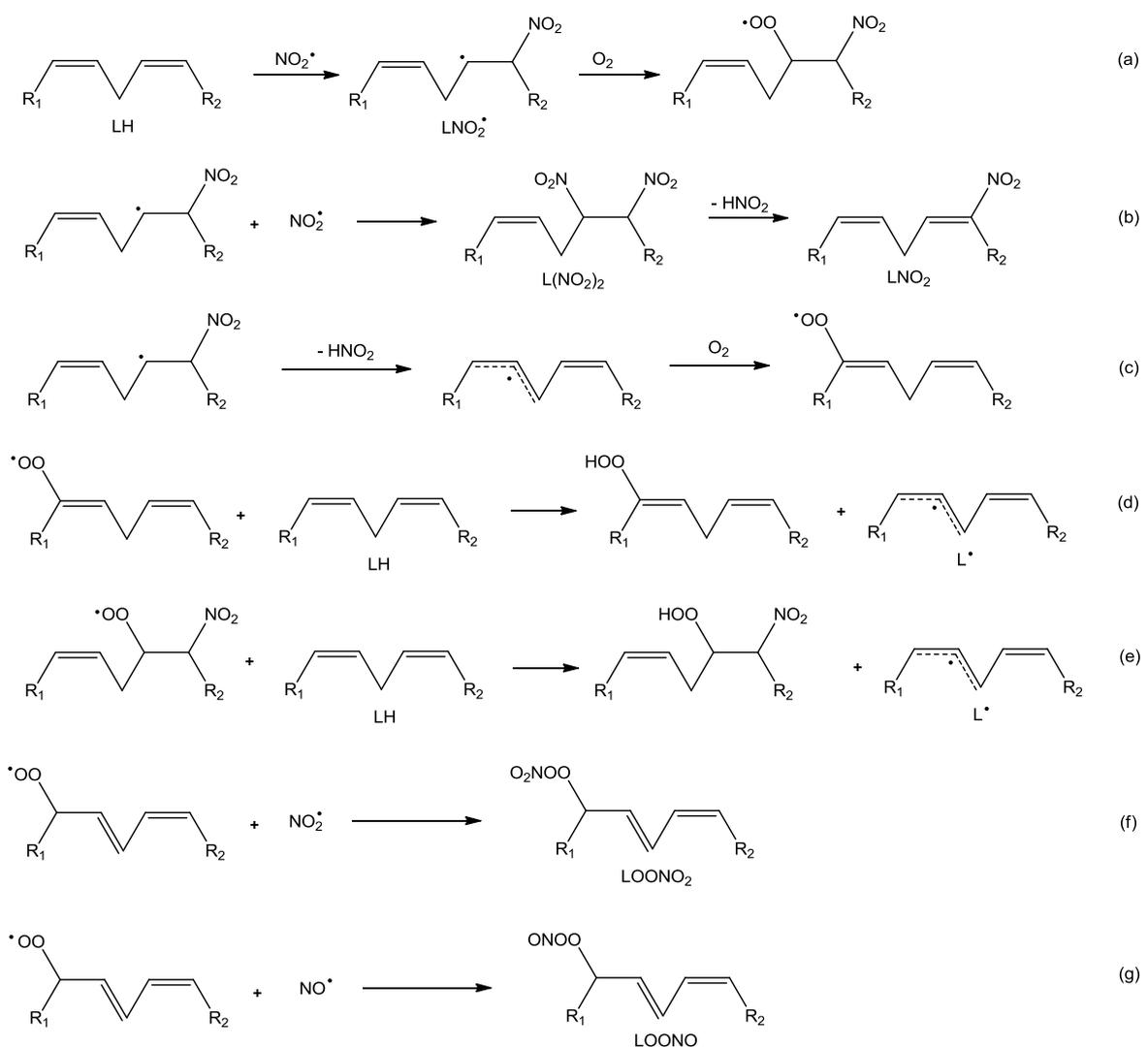
O NO^\bullet é um gás incolor a temperatura e pressão ambientes, que é produzido endogenamente por enzimas denominadas óxido nítrico sintetases (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. Esta espécie tem um caráter lipofílico, e possuindo alta solubilidade em solventes não polares. A temperatura e pressão ambientes, NO^\bullet não tende a dimerização, encontrando-se como uma espécie radicalar monomérica, capaz de reagir com outras espécies radicalares facilmente. Em sistemas biológicos, formação de ONOO^- se dá pela reação entre

NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$. A reação de NO^\bullet com O_2 gera NO_2^\bullet , que por sua vez pode reagir com NO^\bullet produzindo N_2O_3 (Fukuto *et al.*, 2000, Pryor *et al.*, 2006).

Diferentemente de outras espécies, o NO^\bullet não é suficientemente reativo para iniciar a peroxidação lipídica, por abstração de um átomo de hidrogênio, ou se adicionar a ligações duplas. Além disso, NO^\bullet inibe a formação de espécies iniciadoras da reação em cadeia, alterando a reatividade dos metais que servem como catalisadores para formação de tais espécies (Fukuto *et al.*, 2000). O NO^\bullet pode ainda atuar como um terminador da reação em cadeia, por captar radicais LOO^\bullet , levando a formação de produtos nitrados (LOONO). Uma vez produzidos, há dois destinos possíveis para estes produtos nitrados, os quais podem sofrer rearranjo interno para formação de produtos mais estáveis (LONO_2), ou decompor-se em radicais LO^\bullet e NO_2^\bullet (O'Donnell *et al.*, 1997).

A atuação do NO^\bullet como pró-oxidante na peroxidação lipídica se dá de modo indireto, por meio de seus derivados ONOO^- e NO_2^\bullet (Hogg e Kalyanaraman, 1999, Pryor *et al.*, 2006). ONOO^- pode oxidar ácidos graxos em microambientes sem a presença de metais. Assim, quando a concentração local de NO^\bullet não ultrapassa a concentração de $\text{O}_2^{\bullet-}$, a peroxidação lipídica é estimulada via ONOO^- , mas se há um aumento na concentração de NO^\bullet , há predominância do efeito inibitório pela captação de radicais LOO^\bullet (Rubbo *et al.*, 1994). Estudos realizados sobre a reação entre NO_2 e olefinas, além de ácidos graxos insaturados, indicaram que há formação de um radical nitroalquila (LNO_2^\bullet) pela adição irreversível de NO_2^\bullet a ligação dupla, o que é favorecido pela alta concentração de NO_2^\bullet . (Pryor e Lightsey, 1981, Pryor *et al.*, 1982). Este radical pode reagir com NO_2^\bullet ou O_2 , se presente. A abstração de hidrogênio de $\text{L}(\text{NO}_2)_2$ e de LNO_2^\bullet pode

levar a formação LNO_2 (Figura 1.17 b) e radicais alquila (Figura 1.17 c), respectivamente, e ácido nitroso (HNO_2). A reação deste radical alquila com O_2 produz LOO^\bullet (Figura 1.17, c e d). Além da formação de lipídeos nitrados (LNO_2), outros compostos nitrados podem ser formados como alquil nitritos (LONO), alquil peroxinitritos (LOONO) e alquil peroxinitratos (LOONO_2) como produtos terminais da peroxidação lipídica (Figura 1.17 e-g) (Cadet e Di Mascio, 2006, Pryor e Lightsey, 1981, Pryor *et al.*, 1982).



Ácido Linoleico $\text{R}_1 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ e $\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Figura 1.17. Oxidação do ácido linoleico mediada por NO_2^\bullet (adaptado de Cadet e Di Mascio, 2006).

Nos últimos anos, houve um crescente interesse em relação aos ácidos graxos nitrados por atuarem na sinalização celular (Freeman *et al.*, 2008). Estes compostos apresentam caráter eletrofílico e podem levar a modificações pós-traducionais em proteínas, através da reação destes compostos com os grupos tióis presentes em resíduos de cisteínas (Kansanen *et al.*, 2009). Um estudo demonstrou que a proteína recombinante NF- κ B *in vitro* e a subunidade p65 *in vivo* são alquiladas por ácidos graxos nitrados (derivados do ácido oleico e linoleico), o que causa a inibição da expressão de genes alvos e desta forma, ocorre uma modulação a resposta anti-inflamatória (Cui *et al.*, 2006).

O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado ω -6, com uma estrutura distinta, contendo 20 carbonos e 4 ligações duplas *cis homo* conjugadas. A interação de derivados nitrados do ácido araquidônico (AANO₂) sintéticos com PGHS -1 e PGHS-2 foi estudada, e se observou que a reação de AANO₂ causou inibição da atividade POX em ambas isoformas de PGHS. A proposta para o mecanismo de inibição sugere que haveria a formação de um complexo enzima-inibidor, e no passo limitante, este complexo perderia o grupo heme, levando a forma inativa da enzima. Neste mesmo estudo, para verificar a potencial relevância da inibição da enzima *in vivo*, foi avaliada a capacidade de AANO₂ modular a atividade de PGHS-1 em plaquetas humanas ativadas com trombina. O aumento de tromboxano B₂ (TxB₂) induzido por trombina, sofreu uma redução dose-dependente com AANO₂. Em plaquetas não ativadas não foi verificado qualquer alteração na produção de TxB₂ por AANO₂. Um comparativo com indometacina, um inibidor não seletivo de PGHS, levou a uma redução similar na formação de TxB₂, indicando que AANO₂ inibe PGHS-1 em plaquetas. Além disso, paralelamente houve diminuição da agregação plaquetária na

presença de AANO₂, o que não foi observado com indometacina, conforme esperado (Trostchansky *et al.*, 2011). Estes efeitos na função plaquetária seriam independentes de cGMP e não envolveriam mobilização de Ca²⁺ (Figura 1.18). (Trostchansky *et al.*, 2013).

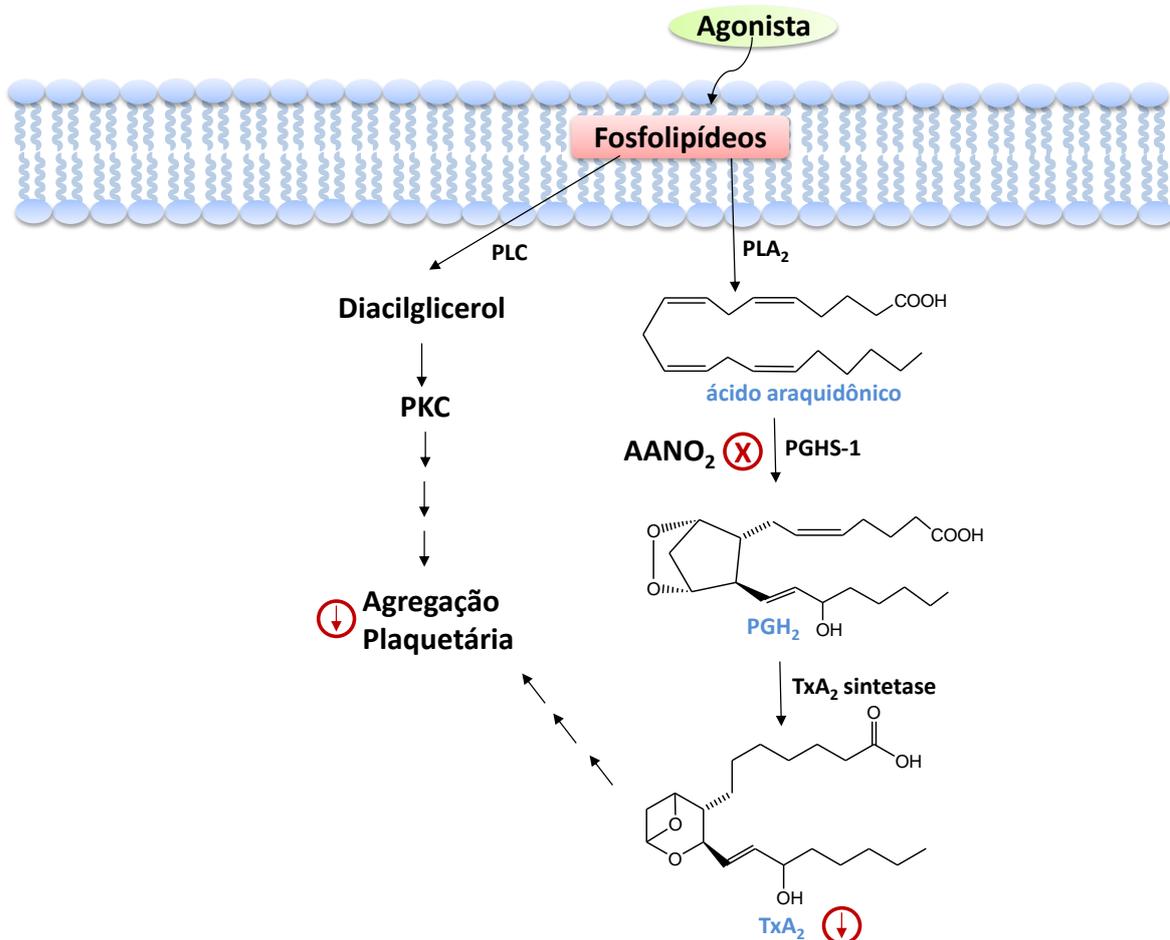


Figura 1.18. A administração de AANO₂ a plaquetas humanas ativadas inibiu a enzima PGHS-1, além de diminuir a agregação plaquetária. A estimulação de plaquetas ativa a fosfolipase C (PLC), com liberação de diacilglicerol e Ca²⁺. A fosfolipase A (PLA) promove a liberação do ácido araquidônico dos fosfolipídeos da membrana, que então na via de PGHS-1 forma prostaglandina endoperóxido H₂ (PGH₂), que por sua vez é transformada no pró-agregante tromboxano A₂ (TxA₂) pela enzima tromboxano A₂ sintase (TxA₂). O diacilglicerol ativa a PKC, levando a ativação de uma cascata enzimática até agregação plaquetária. (Adaptado de Trostchansky *et al.*, 2013).

2 – Objetivos

A identificação inequívoca de reações promovidas por oxigênio molecular singlete ainda é um desafio em sistemas complexos. Com o intuito de contribuir com ferramentas apropriadas para esses estudos, esse trabalho teve como objetivos: (i) sintetizar endoperóxidos hidrossolúveis derivados do naftaleno para serem utilizados como fonte limpa de $^1\text{O}_2$ em sistemas químicos e biológicos, utilizando isótopos 16 (NDPO₂, DHPNO₂), ou 18 do oxigênio (DHPN¹⁸O₂), (ii) sintetizar um novo endoperóxido hidrofílico com cloreto de amônio quaternário como substituintes nas posições 1 e 4 do anel naftalênico (NBTEO₂), apropriado para estudos em mitocôndrias; (iii) estudar o mecanismo de geração de $^1\text{O}_2$ na reação dos hidroperóxidos lipídicos e outros hidroperóxidos orgânicos com o íon nitrônio, utilizando NO₂BF₄, através de medidas de emissão de fótons do $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho próximo ($\lambda=1270\text{nm}$), característica de oxigênio molecular singlete. Para tanto foram sintetizados hidroperóxidos do ácido oleico, linoleico e colesterol por fotooxidação.

3- Materiais e Métodos

3.1- Reagentes

Ácido linoleico, colesterol, *tert*-butil hidroperóxido, hidroperóxido de cumeno, nitronium tetrafluoroborate 95% (NO_2BF_4), sílica gel (200-400 mesh), resina Chelex[®], resina Amberlite[®] Ira 400, azul de metileno, rosa bengala, bromo, cloreto de alumínio, hidreto de lítio alumínio, 3-amino-1,2-propanodiol, azida de sódio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de alumínio, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio anidro e sulfato de magnésio anidro foram obtidos junto a Sigma (Missouri, Estados Unidos).

Água deuterada (99,9%), ester malônico, dimetilsufóxido deuterado (99%), clorofórmio deuterado (99%), trietilamina foram obtidos junto a Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos).

Placas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, acetado de cádmio, sódio metálico, iodo, ácido sulfúrico, tolueno, tetracloreto de carbono, 1,4-dimetilnaftaleno foram obtidos junto a Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

Ácido oleico foi obtido junto à Synth (Diadema, Brazil).

O endoperóxido derivado do 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO_2) foi sintetizado em nosso laboratório, de acordo com o método descrito por Turro *et al.* (1981).

Os solventes utilizados foram adquiridos junto J.T.Baker (Xalostoc, México).

A água utilizada nos experimentos foi tratada pelo sistema de purificação da Water System Nanopure da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos) e/ ou pelo sistema Millipore Direct-Q 3UV da Merck.

Quando necessário o tratamento de secagem para alguns solventes foi realizado. Brevemente são descritos a seguir os procedimentos empregados (adaptado de Armarego e Chai, 2003).

- Etanol e metanol: em um balão de 1 L munido com condensador de refluxo, foram adicionados 50 mL de etanol ou metanol, 2,5 g de raspas de magnésio metálico e alguns cristais de iodo. O sistema foi aquecido até todo iodo desaparecer e então, após resfriar, foi adicionado o restante do álcool (450 mL). O sistema permaneceu sob refluxo por 2 horas. Em seguida, o álcool foi destilado e armazenado sobre peneira molecular de 3Å.

- Benzeno: em um balão de 1 L foram colocados 600 mL de benzeno e sódio metálico, sendo mantidos sob refluxo por 8 horas e o benzeno foi posteriormente destilado e armazenado sobre peneira molecular de 3Å.

- Tetraidrofurano e dimetil éter: em um erlenmeyer de 2 L foi colocado 1 L do solvente e acrescentado duas espátulas de sulfato ferroso, permanecendo sob agitação por 15 minutos. Em seguida, foi acrescentado 20 g de hidróxido de sódio e permaneceu reagindo por 6 horas, quando então o solvente foi destilado. Posteriormente, sódio metálico e o indicador benzofenona foram adicionados ao solvente destilado. O sistema foi mantido sob refluxo até o surgimento de uma coloração azul e o solvente destilado previamente antes do uso.

- Dimetilformamida: em um erlenmeyer de 1 L foram colocados 500mL de DMF e sulfato de magnésio anidro. O solvente foi filtrado e recolhido em um balão de 1 L para ser destilado, com ajuda de um aparelho de destilação, sob pressão reduzida e ao abrigo da luz. O solvente foi armazenado sobre peneira molecular de 3Å.

-Clorofórmio: em um balão de 500 mL contendo um condensador de refluxo, foram colocados 250 mL de CHCl_3 , e adicionado cloreto de cálcio. O sistema foi mantido so refluxo por 3 horas, quando então o solvente foi destilado com ajuda de um aparelho de destilação e armazenado sobre peneira molecular de 3Å.

3.2 - Equipamentos

Sistema Contador de Fótons

A emissão de luz do $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho próximo ocorre em $\lambda = 1270$ nm e foi monitorada por um sistema especial composto por uma fotomultiplicadora sensível a região do infravermelho (800 a 1400 nm).

O equipamento foi desenvolvido em conjunto com a empresa Edinburgh Instruments Ltd (Livingston, Reino Unido). Este equipamento contém uma câmara escura onde as amostras são colocadas em cubetas de quartzo. A fotomultiplicadora é composta por um tubo fotomultiplicador (NIR PMT H10330A module, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japão) sensível à região do infravermelho (800-1400nm), o qual possui um sistema termoelétrico de resfriamento, conectados a uma fonte de alta tensão (NIR PMT controller module, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japão), com aplicação de um potencial de -803 V. A luz que passa pelo monocromador constituído por grades de difração, que direcionam comprimentos de ondas específicos para a fotomultiplicadora. Este sistema permite realizar medidas da cinética de emissão em um determinado comprimento de onda, bem como aquisição do espectro de emissão. O controle do monocromador e a aquisição dos dados foram feitos pelo programa F-900 versão 7.0.4 da Edinburgh Instruments Ltd.

Espectrômetros de Massas

MicroMass Quattro II : espectrômetro de massas triplo quadruplo da Waters (Manchester, Reino Unido), contendo software MassLynx versão 3.2, e injetor *Rheodyme* (California, Estados Unidos).

MaXis 3G: espectrômetro de massas UHR-TOF (ultra- high resolution time of flight) da Bruker Daltonics, com software de operação – MicroTOFcontrol 3.0 e software de processamento – DataAnalysis versão 4.0 (Billerica, Estados Unidos).

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

RMN Gemini Varian 200 MHz (Palo Alto, Estados Unidos)

RMN Inova Varian 300 MHz (Palo Alto, Estados Unidos)

RMN Bruker DPX 300MHz (Rheinstetten, Alemanha)

Espectrofotômetros

Hitachi Modelo U-3000 (Tóquio, Japão).

Shimadzu Modelo Spectro IV-1800 (Tóquio, Japão).

pHmetro

Corning modelo 320 (Nova Iorque, Estados Unidos).

Balanças

Denver Instruments Company modelos XE 310 e AA 200 (Colorado, Estados Unidos).

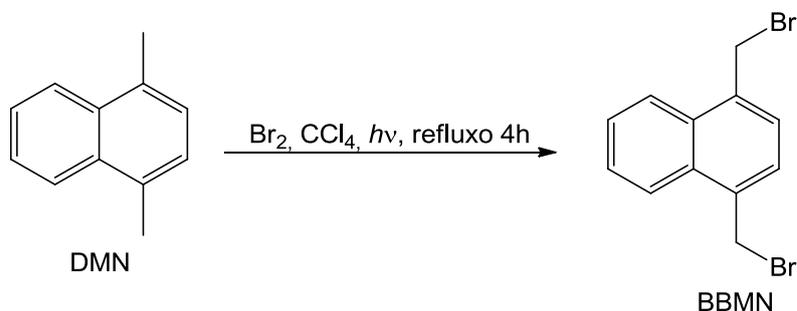
3.3 - Síntese dos Endoperóxidos Derivados Naftalênicos 1,4 - Substituídos

O procedimento para síntese dos endoperóxidos derivados naftalênicos parte do composto comercial DMN. A rota sintética para preparação dos compostos *N,N'*-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN) e 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDP), derivados hidrossolúveis do naftaleno, encontram-se descritos na literatura (Martinez *et al.*, 2000b; Pierlot *et al.*, 2000; Dewilde *et al.*, 1998; Di Mascio e Sies, 1989).

A preparação de um novo derivado di-catiônico possui um intermediário em comum com a síntese do DHPN, o 1,4-bis(bromometil)naftaleno (BBMN). Anteriormente, a síntese de um derivado naftalênico monocatiônico foi descrito por Pierlot *et al.* (1996), na qual a síntese do derivado dicatiônico foi parcialmente baseada. A seguir estão descritos os procedimentos para síntese do DHPN, NDP e de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de *N,N,N*-trimetil etanaminio) (NBTE), e seus endoperóxidos correspondentes.

3.3.1 – Síntese de DHPN, DHPNO₂ e NDP, NDPO₂

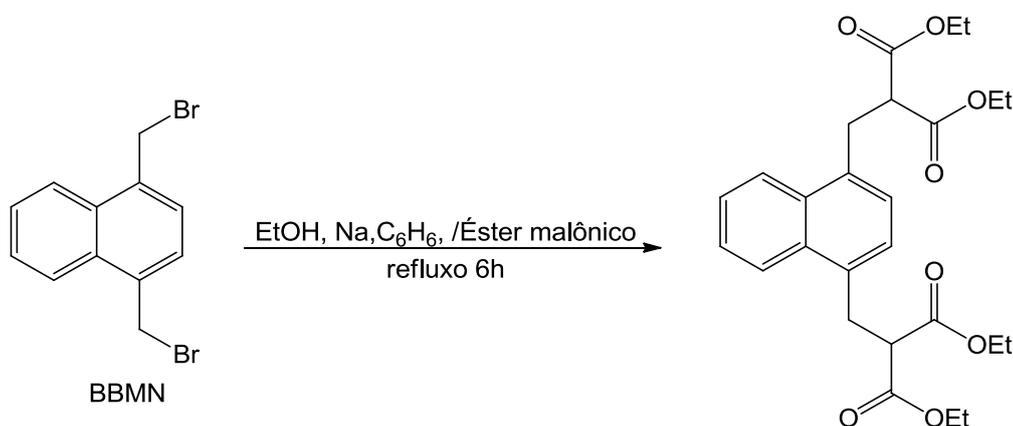
3.3.1.1 - Preparação do 1,4-Bis(bromometil)naftaleno (BBMN)



Em um balão de 1L de três bocas, equipado com condensador de refluxo, funil de adição e barra magnética, foram adicionados 250 mL de tetracloreto de

carbono e 50 mL de 1,4-dimetilnaftaleno (0,32 mol), previamente purificado por destilação à pressão reduzida. Em seguida, foram acrescentados, gota-a-gota (por aproximadamente 2 h), 37 mL (0,72 mol) de bromo, enquanto o sistema foi irradiado por uma lâmpada de 500 W e aquecido por uma manta. Ao final da adição do bromo, a mistura reacional permaneceu em refluxo, sob agitação constante e irradiação por 4h. Após este período, manteve-se em repouso à temperatura ambiente por uma noite. O solvente foi retirado sob pressão reduzida e o sólido obtido, recristalizado em CHCl_3 . O produto sólido obtido, referente ao BBMN foi recuperado por filtração a vácuo, em funil de Büchner. O produto foi obtido com 71% de rendimento (72,5 g). Uma amostra do produto foi dissolvido em CDCl_3 e analisado por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

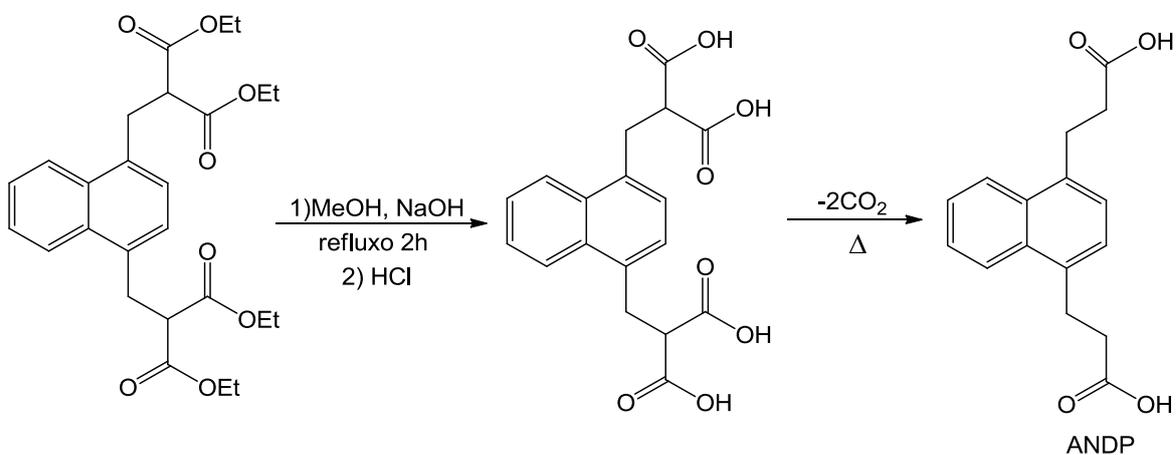
3.3.1.2 - Preparação do Éster α,α' -Dicarbetoxi-1,4-Naftalenobispropanoato de Etila



Em um balão de 1L de três bocas, equipado com condensador de refluxo, barra magnética, tubo secante e funil de adição, foram adicionados 250 mL de etanol absoluto seco e 7,13 g (0,31 mol) de sódio metálico lentamente. Após todo sódio ter reagido, 88 mL (0,58 mol) de éster malônico, previamente destilado

foram adicionados gota a gota, por cerca de 2 h, sob agitação constante. Durante esta etapa, o sistema foi mantido aquecido (aproximadamente em 50°C) para prevenir a precipitação do éster de sódio malônico. Após o término da adição do éster, o sistema foi mantido em refluxo por 2 h. Adicionaram-se 350 mL de benzeno seco para facilitar a dissolução do BBMN, que foi adicionado na forma sólida (33 g, 0,10 mol), em porções de aproximadamente 8 g, num intervalo de 45 min. O sistema reacional permaneceu em refluxo por 4 h e sob temperatura ambiente por uma noite. Após, a mistura resultante foi neutralizada com uma solução aquosa de HCl a 20%. Houve a separação das fases orgânica e aquosa, sendo esta última extraída com éter etílico três vezes. As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com solução 5% de NaHCO₃ e água destilada, e seca sob Na₂SO₄ anidro. Os solventes foram removidos à pressão reduzida por roto-evaporação e o excesso de éster malônico removido por destilação à pressão reduzida. O produto foi obtido com 90% de rendimento (44,9 g). Uma amostra do produto resultante, o éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila, foi dissolvida em CDCl₃ e o produto analisado por RMN de ¹H e ¹³C (apêndice I).

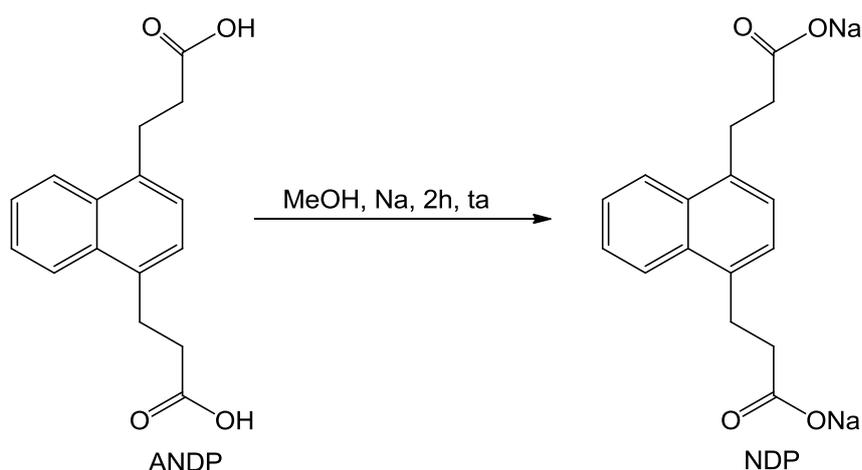
3.3.1.3 - Preparação do Ácido 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropânico (ANDP)



Em um balão de 500 mL de duas bocas, contendo um condensador de refluxo, tubo secante e barra magnética, o composto resultante da etapa anterior, o éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de dietila (44,8 g, 0,095 mol) foi dissolvido em 200 mL de solução 6M de hidróxido de sódio e 50 mL de metanol. O sistema foi mantido em refluxo e agitação constante por 2 h. Em seguida, foi realizada uma filtração a quente e adicionou-se ácido clorídrico concentrado ao filtrado, até pH próximo a 1, até se observar a formação de um precipitado. Após esta etapa, o sistema foi mantido a 8°C por uma noite.

O sólido obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e mantido em estufa a temperatura de 120°C durante aproximadamente 12 dias até descarboxilação total, verificada pela estabilização da massa do produto. O produto foi obtido com 72% de rendimento (21,7 g). Uma amostra do produto, o ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico (ANDP), foi dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado para análise do produto por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

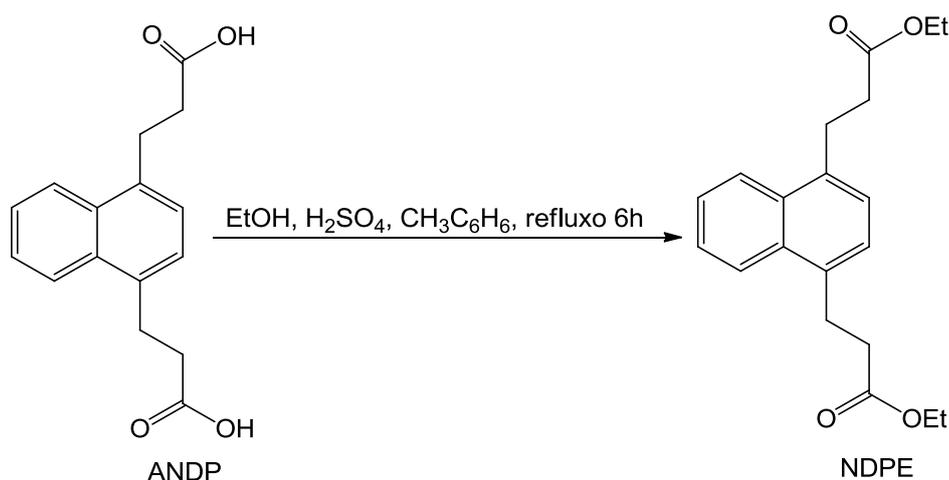
3.3.1.4 - Preparação do 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Sódio (NDP)



Em um balão de duas bocas de 250 mL, equipado com um tubo secante, contendo 100 mL de metanol seco foram dissolvidos 1,5 g de sódio metálico. Após, foram adicionados 3,5 g do ANDP (0,013 mol) e a mistura permaneceu sob agitação constante a temperatura ambiente por 2 horas. O sistema foi mantido em geladeira por uma noite. Depois, o produto sólido foi separado por filtração e o produto seco em estufa a 50°C.

O rendimento obtido do produto foi de 89% (3,60 g). Uma amostra do produto obtido, 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDP), foi dissolvida em D₂O para análise por RMN de ¹H e ¹³C (apêndice I).

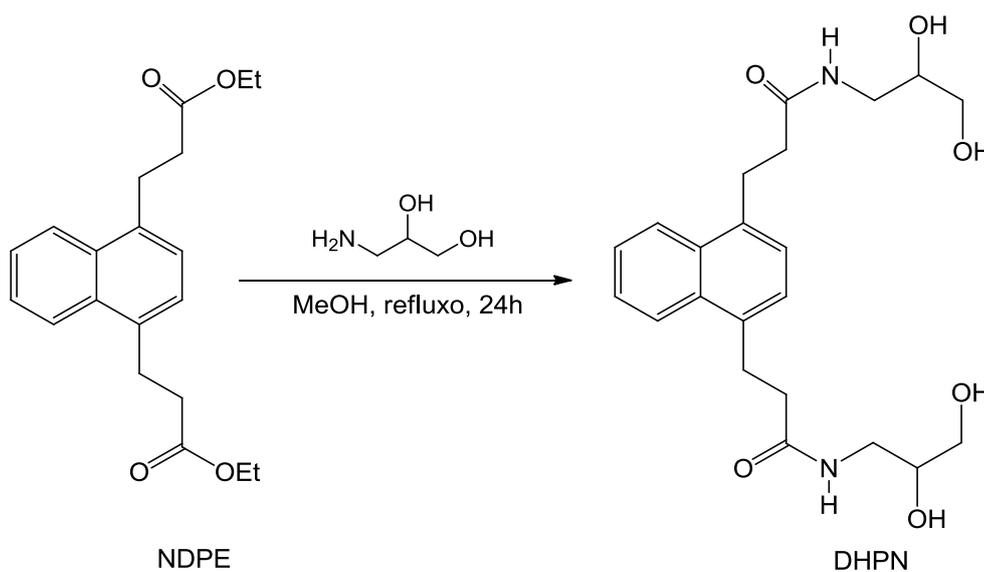
3.3.1.5 - Preparação do 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de Etila (NDPE)



Em um balão de 100 mL de duas bocas, contendo um condensador de refluxo, tubo secante e barra magnética, foram colocados 5 g (0,018 mol) de ANDP, 36 mL de etanol absoluto e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, e o sistema mantido sob refluxo por 2 horas. Após este período, foram adicionados 9,5 mL de tolueno e um dean-stark foi acoplado ao sistema, tendo sua parte lateral preenchida com tolueno. A mistura reacional permaneceu em refluxo por

mais 4 horas. Ao fim deste período, o etanol e o excesso de tolueno foram retirados por destilação simples, obtendo-se um líquido viscoso, ao qual foi adicionado 50 mL de uma solução aquosa de cloreto de sódio e 50 mL de éter etílico. A fase orgânica foi lavada com 50 mL de uma solução aquosa de NaHCO_3 a 5% e seca sob Na_2SO_4 anidro. O produto foi filtrado e o solvente removido a pressão reduzida. O produto foi obtido com 68% de rendimento (3,99 g). Uma amostra do produto obtido, 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila (NDPE), foi dissolvida em CDCl_3 para análise do produto por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

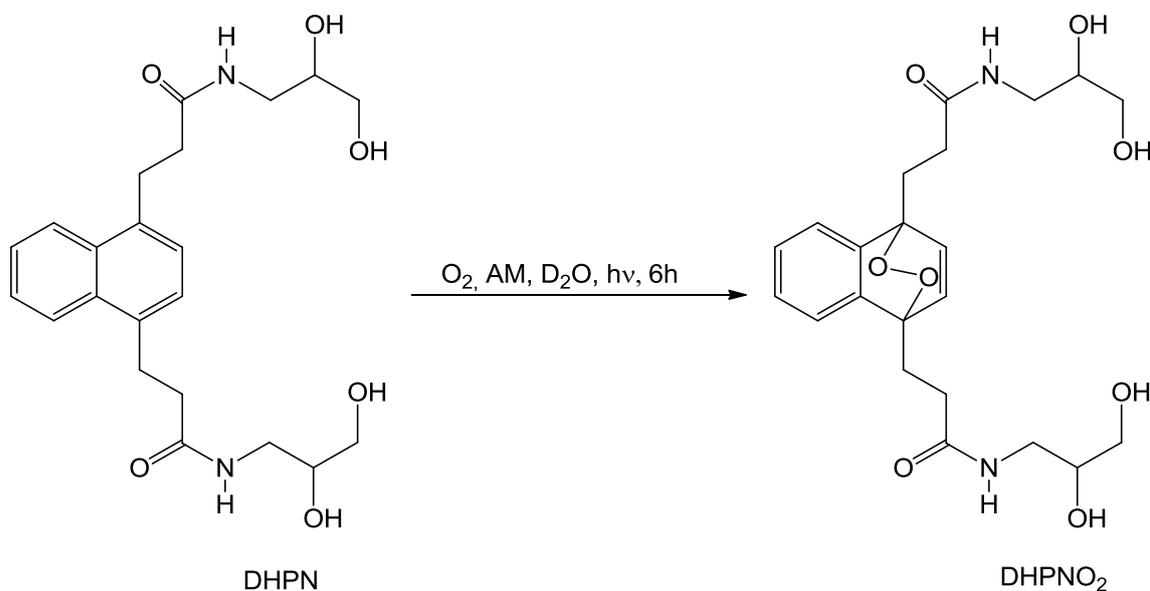
3.3.1.6 - Preparação de *N,N'*-(2,3-Dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanamida (DHPN)



Em um balão de 250 mL de duas bocas, contendo um condensador de refluxo, tubo secante e barra magnética, foram dissolvidos 3,95 g de NDPE em 80mL de metanol, em seguida foram acrescentados 8,0 g (0,088 mol) de 3-amino-1,2-propanodiol. A mistura reacional permaneceu sob refluxo por 24 horas. Após este período, o metanol foi eliminado a pressão reduzida, e o resíduo transferido

para um erlenmeyer, no qual foram adicionados 180 mL de acetona. O sistema permaneceu a 8°C para melhor precipitação do produto, sendo depois recuperado por filtração a vácuo em funil de Büchner. O sólido obtido foi recristalizado em metanol, fornecendo um sólido amorfo, levemente amarelo. O produto foi obtido com 56% de rendimento (2,84 g). O produto foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

3.3.1.7 - Preparação do Endoperóxido de *N,N'*-(2,3-Dihidroxi-propil)-3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanamida (DHPNO₂)

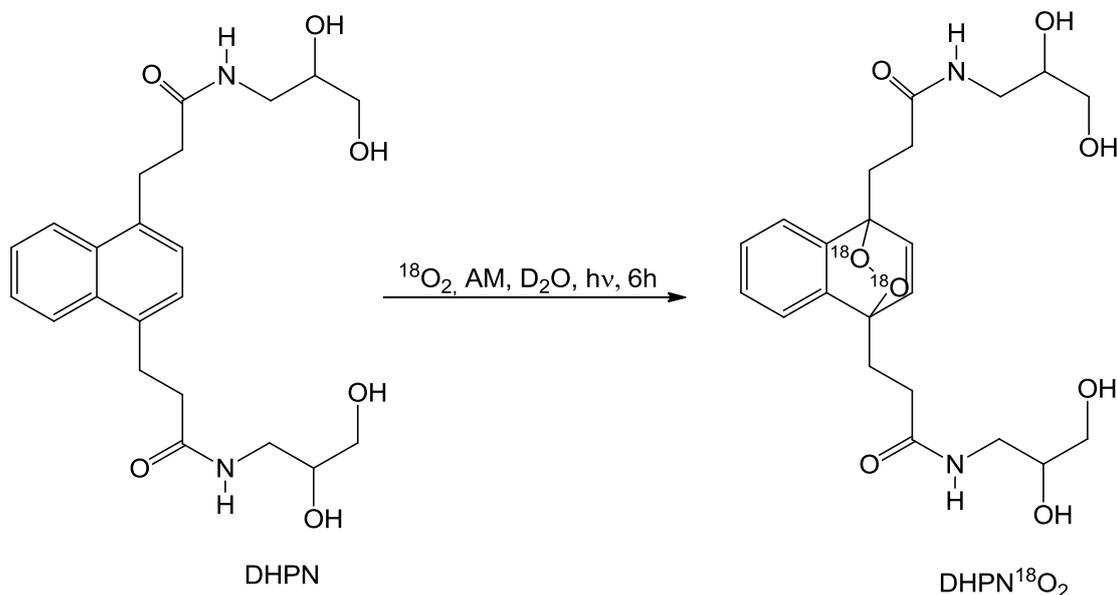


Em um balão de 10 mL, contendo uma barra magnética, foram colocados 200 mg de DHPN e 3 mL de D₂O, sendo levemente aquecido para melhor dissolução do composto. Posteriormente, foram adicionados 25 µL de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL em D₂O). A temperatura foi mantida em 4°C durante todo tempo de irradiação através de um frasco com isolamento térmico, mantido por um banho termostático. A solução permaneceu sob agitação constante, sendo saturada com oxigênio e irradiada com duas lâmpadas de

tungstênio de 500 W por cerca de 6 horas. Após este período, foi adicionado Chelex[®] 100 para remoção do azul de metileno, mantendo-se a solução sob agitação por 10 minutos a 4°C. Um filtro de 0,45 µm de diâmetro (Millex[™] LCR com membrana PTFE, Millipore) foi utilizado para filtração da solução e a mesma armazenada em microtubos de 1,5 mL a -80°C.

A análise do endoperóxido foi feita por espectrometria de massas, injeção direta no modo ESI⁺ em 240 µL/min capilar, 4.5 kV; dry heater, 180°C; dry gas, 4.0 l/min; end plate -500 V.

3.3.1.8 - Preparação do Endoperóxido de *N,N'*-(2,3-Dihidroxi-propil)-3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanamida Marcado Isotopicamente com Oxigênio 18 (DHPN¹⁸O₂)



Em um balão de 10 mL, contendo uma barra magnética, foram colocados 200 mg de DHPN e 3 mL de D₂O, sendo levemente aquecido para melhor dissolução do composto. Posteriormente, foram adicionados 40 µL de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL em D₂O). Em seguida, o balão foi

conectado a um sistema fechado ligado a uma bomba de vácuo e a um cilindro contendo oxigênio ^{18}O , ao qual permaneceu conectado até o final da reação. O balão foi congelado em nitrogênio líquido e descongelado, sendo este procedimento repetido por cinco vezes para completa remoção de oxigênio ^{16}O dissolvido no sistema, com sucção de ar pela bomba de vácuo. Em seguida, o sistema reacional foi mantido resfriado em 4°C sob constante agitação. A reação foi irradiada com duas lâmpadas de tungstênio de 500 W por cerca de 6 horas (vide representação esquemática do sistema na Figura 3.1). Após este período, foi adicionado Chelex[®] 100 para remoção do azul de metileno, mantendo-se a solução sob agitação por 10 minutos a 4°C . Um filtro de $0,45\ \mu\text{m}$ de diâmetro (Millex[™] LCR com membrana PTFE, Millipore) foi utilizado para filtração da solução e a mesma armazenada em microtubos de 1,5 mL a -80°C . A análise do endoperóxido foi feita por espectrometria de massas, injeção direta no modo ESI⁺ em $240\ \mu\text{L}/\text{min}$ capilar, 4.5 kV; dry heater, 180°C ; dry gas, 4.0 l/min; end plate $-500\ \text{V}$.

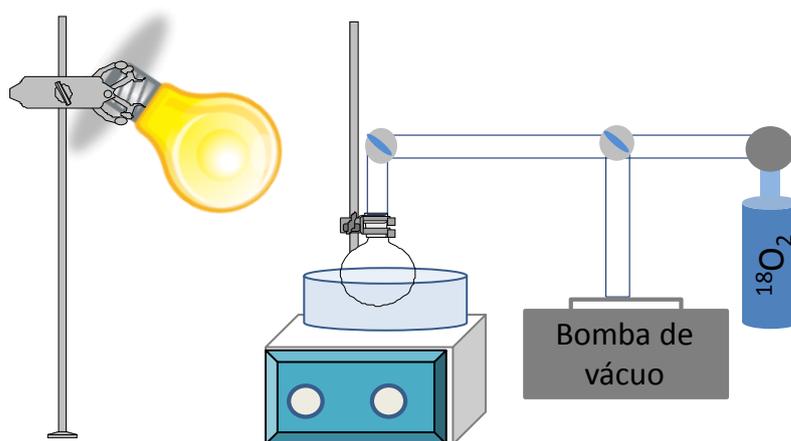
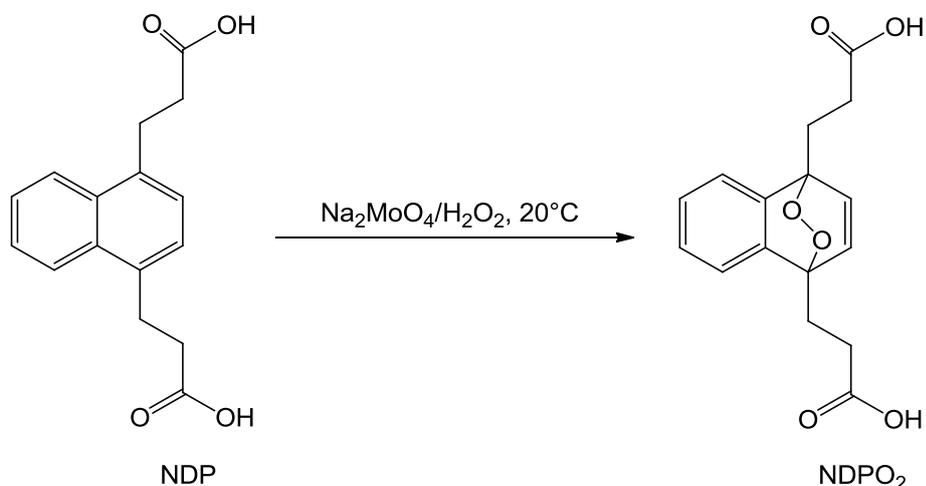


Figura 3.1. Representação esquemática do sistema reacional para preparação de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$.

3.3.1.9 – Preparação do Endoperóxido de 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropoato de Sódio (NDPO₂)



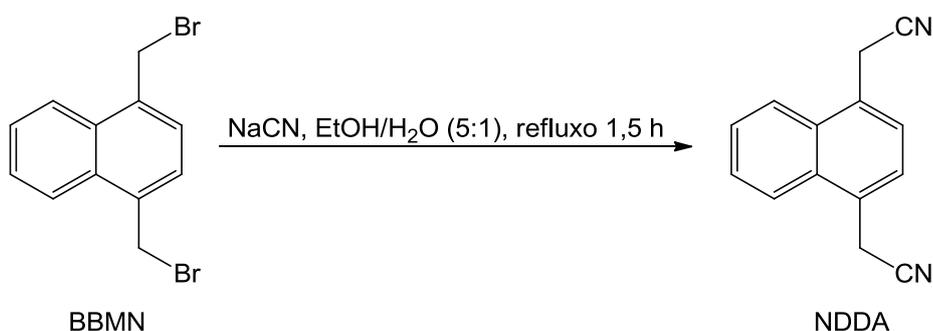
Em um tubo para centrífuga contendo um agitador magnético foram colocados 500 µL de uma solução de 0,5 M de Na₂MoO₄ em tampão 0,1 M de Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 10-11, e 50 mg do NDP. O tubo permaneceu sob agitação contínua, em banho de água com temperatura a 20°C durante todo o processo. Em seguida, acrescentou-se 50 µL de H₂O₂ (35 % comercial) na solução, a qual ficou marrom avermelhada com liberação intensa de O₂. Após 14 min, a coloração da solução passou a amarelo-ouro e, então, acrescentou-se mais 50 µL de H₂O₂. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes, sendo que ao final da última adição a solução permaneceu em agitação por 20 min. Após este período, o tubo foi resfriado em um banho de água e gelo e 500 µL de H₃PO₄ 2 M foram acrescentados lentamente, sob agitação contínua, para precipitar a forma diácido do endoperóxido. Em seguida, o sistema foi centrifugado a 7000 rpm, 4°C, por 2 min. O sobrenadante, de coloração amarela, foi descartado. Acrescentaram-se 1 mL de água fria ao sólido, agitou-se por alguns minutos e centrifugou-se nas mesmas condições descritas anteriormente, descartando-se novamente o

sobrenadante obtido. A lavagem do sólido foi repetida por mais duas vezes. O tubo, contendo o sólido obtido após as lavagens, foi colocado em gelo. Acrescentou-se lentamente e sob agitação NaOH 2 M até completa solubilização do precipitado. A solução obtida foi congelada imediatamente e armazenada a -80°C. Esse mesmo procedimento pode ser feito partindo-se diretamente do ANDP, porém nesse caso uma quantidade estequiométrica de NaOH deverá ser adicionada para possibilitar a solubilização.

O endoperóxido NDPO₂ foi analisado por HPLC-MS, com o detector de UV programado para detecção no comprimento de onda de 230 nm. A coluna usada foi a Gemini 5µ C-18 (250 x4,60 mm, 5 micron) Phenomenex. A separação foi realizada com fluxo de 0,6 mL/min e um gradiente, partindo de 15 % de MeCN em solução 10 mM de formiato de amônio, indo para 30% MeCN em 20 min, 60 % MeCN em 25 min e voltando para 15 % em 30 min. Para o NDPO₂ a análise foi feita no modo ESI⁻ e com a voltagem do cone em 20 V, temperatura da fonte de 100°C e temperatura de dessolvatação 200°C.

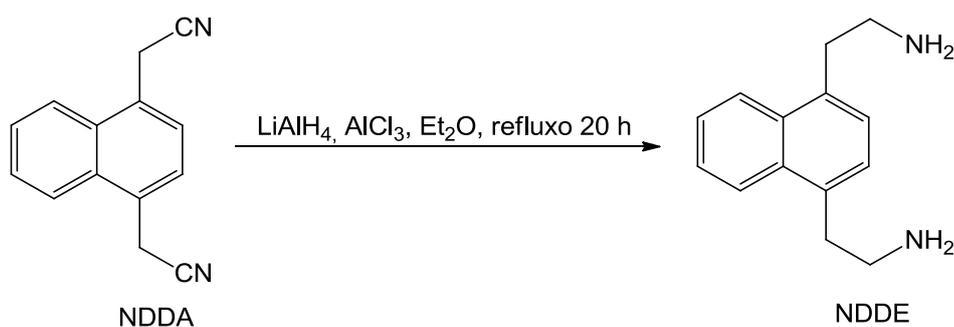
3.3.2 – Síntese do Endoperóxido de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de *N,N,N*-trimetil Etanaminio) (NBTEO₂)

3.3.2.1 - Preparação do 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)diacetonitrila (NDDA)



Em um balão de 1L de três bocas e fundo redondo, equipado com condensador de refluxo e barra magnética, foram adicionados 12 g (0,038 mol) de BBMN, 8,6 g (0,175 mol) de NaCN, 100 mL de EtOH e 40 mL de H₂O. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 1,5 h. Após este período, o excesso de etanol foi retirado por uma destilação simples. Ao resíduo foi adicionado 50 mL de H₂O e extraído por 3 vezes com CHCl₃. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto sólido obtido com 84% (6,6 g) de rendimento. Uma amostra do produto foi diluído em CDCl₃ e analisada por RMN de ¹H e ¹³C (apêndice I).

3.3.2.2 - Preparação de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)dietanamina (NDDE)



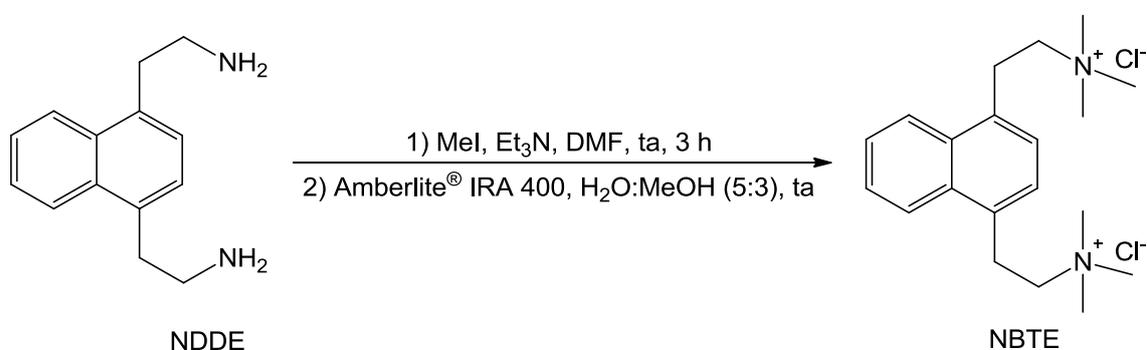
Em um balão de 100 mL de três bocas, equipado com condensador de refluxo, barra magnética, tubo secante e funil de adição e foram adicionados 0,74 g (19,4 mmol) de hidreto de lítio alumínio e 20 mL de éter seco. O sistema foi resfriado com banho de gelo e 2,58 g (19,4 mmol) de cloreto de alumínio foram adicionados. Por meio do funil de adição, 1 g (4,86 mmol) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetonitrila em 30 mL de éter foram adicionados a reação lentamente. Depois de todo composto ser adicionado, o banho de gelo foi retirado e a reação permaneceu sob agitação a temperatura ambiente. Após 20 horas, a reação foi resfriada com banho de gelo e lentamente foi adicionada H₂O e uma solução de ácido sulfúrico a 10% até pH 1. A reação foi extraída com diclorometano por duas

vezes, e o solvente removido sob pressão reduzida, obtendo-se 75 mg do material de partida. À fase aquosa foi adicionada uma solução de NaOH a 20% até pH próximo a 13 e a mesma extraída com diclorometano por três vezes. A fase orgânica combinada foi lavada com solução saturada de NaCl e o solvente foi retirado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado em coluna de sílica gel, empregando-se como eluente uma mistura de metanol e éter de petróleo (9,5:0,5, v/v, respectivamente). O rendimento obtido do produto purificado foi de 32% (329 mg). Uma amostra do produto foi diluído em CDCl_3 e analisada por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

3.3.2.3 - Preparação de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil Etanaminio) (NBTE)

Na preparação do sal quaternário foram utilizados dois métodos com adaptações. O primeiro método utiliza uma base orgânica (Sommer e Jackson, 1970), e o segundo utiliza um sal inorgânico (Avellar *et al.*, 2000) como acceptor de prótons do ácido que se forma a medida que a reação vai prosseguindo.

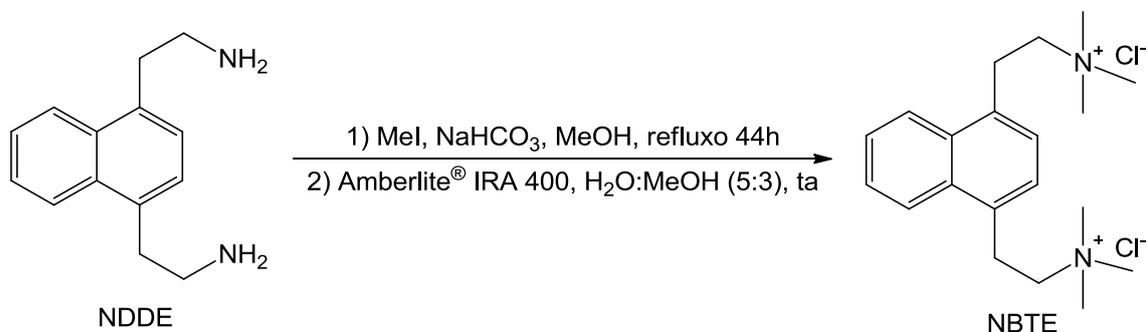
Método 1



Em um balão de 50 mL, contendo tubo secante e barra magnética, foram adicionados 283 mg (1.32 mmol) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina e 15 mL de

DMF seco, sendo o sistema levemente aquecido para melhor dissolução do composto. O sistema reacional foi resfriado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e adicionados 534 mg (5,28 mmol) de trietilamina, e em seguida foram adicionados 1,91 mg (13,4 mmol) de iodometano. Após 5 minutos, o sistema foi deixado reagir a temperatura ambiente por 3 horas, com a formação de um precipitado. O sistema foi deixado por uma noite em repouso para melhor precipitação do sólido formado, sendo recuperado por filtração. O produto obtido foi dissolvido em 17 mL de metanol e água (5:3, v/v) e adicionado a resina aniônica Amberlite[®] IRA 400 para obtenção do cloridrato. Após filtração e remoção do solvente a pressão reduzida, o produto foi obtido com 5% de rendimento (25mg), mais subprodutos da reação. Uma amostra do produto foi diluída em D_2O e analisada por RMN de ^1H e ^{13}C (apêndice I).

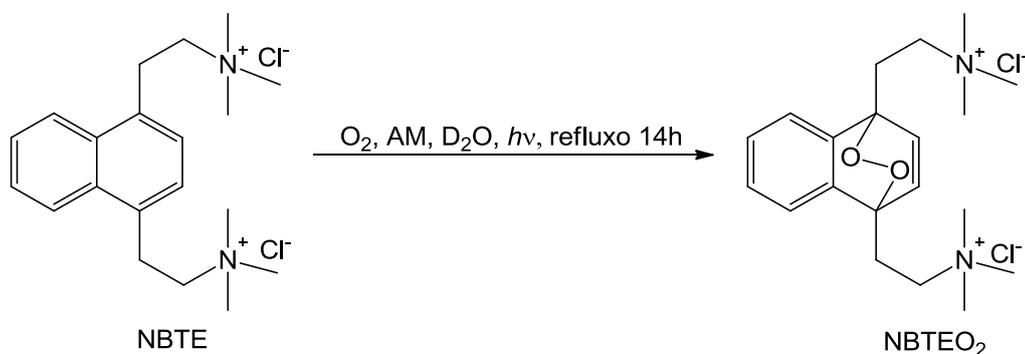
Método 2



Em um balão de 3 bocas de 50 mL, contendo um condensador de refluxo, tubo secante e barra magnética, foram adicionados 15 mL de metanol seco, 114 mg (0,53 mmol) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diethanamina, 354 mg (4,2 mmol) de bicarbonato de sódio e 1,2 g (8,5 mmol) iodometano. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e constante agitação. Quantidades adicionais de iodometano (1,1 g, 8,0 mmol) foram acrescentadas após 1 e 19 horas de reação. Após 44

horas de reação, o solvente foi removido a pressão reduzida e o sólido residual foi extraído três vezes com CHCl_3 a quente, três vezes com CH_2Cl_2 a quente, e finalmente extraído com EtOAc a quente. O resíduo sólido foi filtrado e seco a pressão reduzida. O produto obtido foi dissolvido em 16 mL de MeOH e H_2O (5:3, v/v) e adicionado a resina aniônica Amberlite[®] IRA 400 para obtenção do cloridrato. Após filtração e remoção do solvente a pressão reduzida, o produto foi obtido com 58% (114 mg) de rendimento. O produto foi analisado por espectrometria de massas por injeção direta no modo ESI^+ , com voltagem do cone em 25 V, temperatura da fonte em 100°C e temperatura de dessolvatação em 200°C .

3.3.2.4 - Preparação do Endoperóxido de 2,2'-(Naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de *N,N,N*-trimetil Etanaminio) (NBTEO₂)



Em um balão de 10 mL, contendo uma barra magnética, foram colocados 200 mg de sal quaternário e 3 mL de D_2O e 30 μL de uma solução de azul de metileno (6 mg/mL em D_2O). A temperatura foi mantida em 4°C durante todo tempo de irradiação e a solução permaneceu sob agitação constante, sendo saturada com oxigênio e irradiada com duas lâmpadas de tungstênio de 500 W por cerca de 14 horas.

A análise do endoperóxido foi feita por injeção direta no modo ESI⁺, com voltagem do cone em 15 V, temperatura da fonte em 100°C e temperatura de dessolvatação em 200°C.

3.3.3 – Medida da Concentração dos Endoperóxidos

A concentração do endoperóxido foi realizada por espectrofotometria no UV, medindo-se a absorbância em $\lambda = 288$ nm, antes e depois de aquecido a 50°C por 2 horas, uma vez que a absorção do anel naftalênico se dá neste comprimento de onda ($\epsilon_{288} = 7780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para o endoperóxido $\epsilon_{288} = 140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 288 nm.

Os cálculos podem ser feitos primeiramente pela lei de Lambert-Beer, determinando-se a concentração do precursor naftalênico. A pureza da amostra é obtida por comparação das absorbâncias em 288 nm antes e depois de aquecido, através da relação [Pureza = $1 - (A_{\text{inicial}}/A_{\text{final}}) / 1 - (\epsilon_{\text{endoperóxido}}/\epsilon_{\text{precursor naftalênico}})$]. Uma vez obtido esses dois valores, a concentração do endoperóxido naftalênico pode ser determinada ([Endoperóxido] = [Precursor naftalênico] x Pureza).

3.4 - Preparação de Hidroperóxidos de Lipídeos

A síntese dos hidroperóxidos dos ácidos graxos linoleico (LAOOH), oleico (OAOOH), e do colesterol (ChOOH) ocorreu por reação de fotossensibilização na presença de oxigênio. A seguir estão descritos os procedimentos utilizados na síntese, purificação e análise destes hidroperóxidos.

3.4.1 - Preparação dos Hidroperóxidos dos Ácidos Graxos Linoleico e Oleico

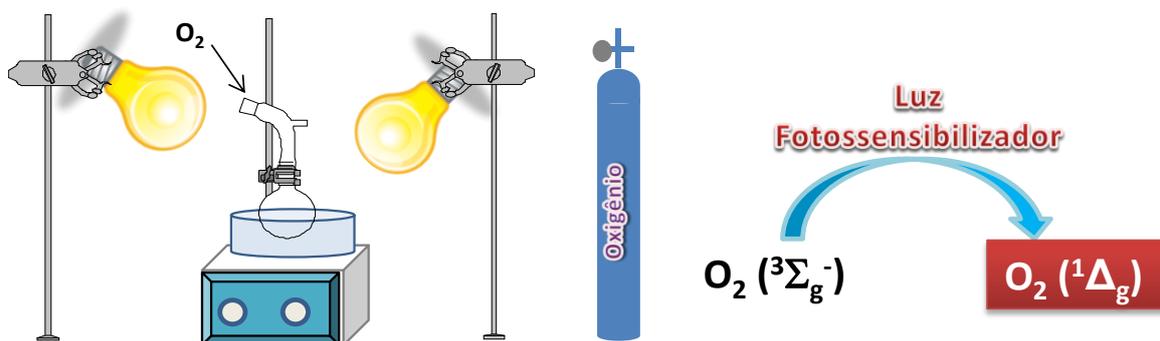


Figura 3.2. Representação esquemática de uma reação de fotossensibilização.

Em um balão de fundo redondo de 100 mL, acrescentou-se 100 μ L de uma solução de azul de metileno (0,1 M em metanol) a 1 g de ácidos graxos (linoleico ou oleico), dissolvido em 50 mL de $CHCl_3$. O sistema reacional foi mantido em banho de gelo e água, sob agitação constante. A solução foi saturada com oxigênio e irradiada com duas lâmpadas de tungstênio de 500 W por cerca de 5 horas para o ácido linoleico e de 3 horas para o ácido oleico.

A reação foi monitorada através de cromatografia em camada delgada para verificar a formação dos hidroperóxidos LAOOH e OLOOH. As amostras foram retiradas e aplicadas sobre placa de sílica e eluídas em uma mistura de $CHCl_3/MeOH$ (90:6, v/v) e reveladas com solução de H_2SO_4 em EtOH (5,0 g de H_2SO_4 em 97,5 ml de EtOH) ou *p*-anisaldeído (3,7 mL de *p*-anisaldeído, 135 mL de EtOH, 5 mL de H_2SO_4 concentrado, 1,5 mL de ácido acético).

3.4.2 - Preparação dos Hidroperóxidos do Colesterol

Na preparação dos hidroperóxidos do colesterol foi utilizado como fotossensibilizadores o azul de metileno (método 1) e o rosa bengala (método 2).

No método 1, foram adicionados 100 μ L de uma solução de azul de metileno (0,1 M em metanol) a 200 mg de colesterol, dissolvidos em 20 mL de

CHCl_3 . O sistema reacional foi mantido em banho de gelo e água, sob agitação constante. A solução foi saturada com oxigênio e irradiada com duas lâmpadas de tungstênio de 500 W por cerca de 3 horas.

No método 2, uma solução de piridina (12 mL) contendo 1 g de colesterol e 10,7 mg de rosa bengala, foi mantida em banho de gelo e água, sob agitação constante. O sistema foi saturado com oxigênio e irradiado com duas lâmpadas de tungstênio de 500 W por cerca de 5 horas.

Em ambos os casos, a reação foi monitorada através de cromatografia em camada delgada para verificar a formação dos hidroperóxidos. As amostras foram retiradas e aplicadas sobre placa de sílica e eluídas em uma mistura de acetato de etila e isooctano (1:1, v/v) e reveladas com solução de H_2SO_4 em etanol ou *p*-anisaldeído.

3.4.3 - Purificação e Quantificação dos Hidroperóxidos dos Ácidos Graxos Linoleico e Oleico e Colesterol

Os hidroperóxidos LAOOH, OLOOH e ChOOH foram purificados através de cromatografia de coluna, empacotada com sílica como descrito por Kühn *et al*, 1987. Utilizou-se 10 g de sílica previamente dessecada a 110°C por duas horas para preparação da coluna, a qual foi equilibrada com *n*-hexanos. Após a reação de fotossensibilização dos ácidos linoleico, oleico e colesterol, respectivamente. O excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo aplicado na coluna. A separação foi feita com um gradiente de *n*-hexanos e éter nas seguintes proporções: 95:5 (50 ml); 90:10 (100 ml); 80:20 (100 ml); 70:30 (50 ml); 60:40 (50 ml) e 50:50 (100 ml). Alíquotas foram recolhidas em tubos de ensaio e analisadas por cromatografia em camada delgada, para que as frações contendo os

hidroperóxidos fossem reunidas em um balão e concentradas, com remoção do solvente sob pressão reduzida. O resíduo concentrado foi dissolvido em CHCl_3 e/ou MeOH e a amostra estocada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para confirmação da concentração dos hidroperóxidos LAOOH, OLOOH e CHOOH foi utilizado o método iodométrico (Buege e Aust, 1978). A quantificação dos hidroperóxidos do ácido linoleico também foi realizada através da medida de absorvância do dieno conjugado ($\epsilon_{234}=25000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Mulliez *et al.*, 1987). Para determinação do total de hidroperóxidos, considerou-se que 60% correspondem a hidroperóxidos contendo dieno conjugado.

3.4.4 - Análise dos Hidroperóxidos por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas

Os hidroperóxidos LAOOH e OLOOH foram analisados por RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) e ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, apenas para hidroperóxidos do ácido oleico).

Na análise por espectrometria de massas por injeção direta, 2 a 5 μL de amostras de hidroperóxidos 0,1 mM foram injetadas, no modo negativo de ionização electrospray (ESI^- -MS), nas seguintes condições: temperatura da fonte 100°C , temperatura de dessolvatação 200°C , voltagem do cone de 35 V.

A análise de ChOOH foi feita análise por RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) e por espectrometria de massas, por injeção direta, usando o modo APCI^+ , nas seguintes condições: temperatura da fonte 100°C , temperatura da de dessolvatação 300°C , voltagem do cone de 25 V e descarga corona em 4,00 kV.

3.5 - Medidas de Emissão de Luz no Infravermelho: Cinética e Espectro

Os experimentos de medidas de emissão de luz no infravermelho foram conduzidos em um cubeta de quartzo, contendo uma pequena barra magnética, a temperatura ambiente. As soluções dos hidroperóxidos foram injetadas na cubeta, contendo NO_2BF_4 , através de um pequeno tubo de polietileno.

A cinética e os espectros adquiridos da termodecomposição de DMNO_2 (10 mM a 37 °C em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 4:1) foram utilizados como padrão de gerador de $^1\text{O}_2$.

3.5.1 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre o Ácido Oleico com NO_2BF_4

Soluções de 3 mL de ácido oleico com concentração de 10 mM em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:4 v/v), bem como em CHCl_3 , MeOH e MeCN foram preparadas e acompanhou-se a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ das reações com o NO_2BF_4 .

3.5.2 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos do Ácido Oleico, Linoleico e do Colesterol com NO_2BF_4 .

Soluções de 3 mL de OLOOH (10 mM), LAOOH e ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v), com concentração de 10 mM foram preparadas e acompanhou-se a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ das reações com o NO_2BF_4 . Reações controle utilizando 3 mL do sistema solvente e soluções de 3 mL com concentração de 10 mM de ácido oleico, ácido linoleico ou colesterol, respectivamente, foram testadas com NO_2BF_4 , assim como soluções dos hidroperóxidos na ausência de NO_2BF_4 . Os espectros de emissão

no infravermelho foram adquiridos com 3 a 4 repetições de varredura, no intervalo de 1180 a 1340 nm.

3.5.3 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Peróxido de Hidrogênio Hidroperóxidos do Cumeno e *t*-Butila com NO_2BF_4

Soluções de 3 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e dos hidroperóxidos de cumeno (CuOOH), hidroperóxido de *t*-butila (*t*-BuOOH), em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v), com concentração de 10 mM, foram preparadas, respectivamente, e acompanhou-se a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ das reações com o NO_2BF_4 . Reações controle utilizando 3 mL do sistema solvente e NO_2BF_4 , e soluções isoladas de 3 mL de H_2O_2 , CuOOH e *t*-BuOOH, respectivamente, em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1v/v), com concentração de 10mM, foram testadas. Os espectros de emissão no infravermelho foram adquiridos com 3 a 4 repetições de varredura, no intervalo de 1180 a 1340 nm.

3.5.4 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos do Ácido Oleico, Linoleico e do Colesterol com NO_2BF_4 em Meio Acidificado

Soluções ácidas de 3 mL de OLOOH, LAOOH e ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) com concentração de 10 mM, foram preparadas com adição de 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM), e monitoradas quanto a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ das reações com o NO_2BF_4 . Adicionalmente, reações controle contendo 3 mL do sistema solvente, 1 μL de HCl concentrado (37%) e NO_2BF_4 , e soluções ácidas isoladas de 3 mL de ácido oleico, ácido linoleico ou colesterol, em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1 v/v), com concentração de 10 mM respectivamente, foram testadas com NO_2BF_4 , bem como

soluções ácidas dos hidroperóxidos correspondentes isolados, na ausência de NO_2BF_4 . Os espectros de emissão no infravermelho foram adquiridos com 3 a 4 repetições de varredura, no intervalo de 1180 a 1340 nm.

3.5.5 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Peróxido de Hidrogênio Hidroperóxidos do Cumeno e *t*-Butila com NO_2BF_4 em Meio Acidificado

Soluções ácidas de 3 mL de H_2O_2 e dos hidroperóxidos de cumeno (CuOOH), hidroperóxido de *t*-butila (*t*- BuOOH), em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1 v/v), com concentração de 10 mM, foram preparadas com adição de 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM), e monitoradas quanto a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ da reação com o NO_2BF_4 . Adicionalmente, reações controle contendo 3 mL do sistema solvente e NO_2BF_4 , e soluções ácidas isoladas de 3 mL de H_2O_2 e dos hidroperóxidos orgânicos, com concentração de 10 mM, foram testadas. O espectro de emissão no infravermelho foi realizado com 3 a 4 repetições de varredura no intervalo de 1180 a 1340 nm.

3.5.6 - Efeito da Azida de Sódio na Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Ácido Oleico e Ácido Linoleico com NO_2BF_4

Soluções de 3 mL de OLOOH e LAOOH em metanol foram preparadas e acompanhou-se a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ das reações com o NO_2BF_4 , na presença e na ausência de azida de sódio (NaN_3). Para os hidroperóxidos do ácido oleico foram adicionados 200 μL de uma solução de NaN_3 em MeOH com concentração de 25 mM (concentração final de 1,56 mM). Para LAOOH foram adicionados 500 μL de uma solução de 25 mM em

MeOH (concentração final de 3,57 mM) através de um tubo de polietileno. Reações controle utilizando 3 mL do sistema solvente e NO_2BF_4 , soluções de 3 mL com concentração de 10 mM de ácido oleico, ácido linoleico foram testadas com NO_2BF_4 na presença e ausência de NaN_3 .

3.5.7 - Efeito da Azida de Sódio na Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Colesterol com NO_2BF_4

Soluções de 3 mL de ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) foram preparadas e acompanhou-se a emissão de luz resultante do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ (região do infravermelho em $\lambda = 1270$ nm) das reações com o NO_2BF_4 na presença e na ausência de NaN_3 . Foram adicionados 500 μl de uma solução de 25 mM em metanol de NaN_3 (concentração final de 3,57 mM) através de um tubo de polietileno.

3.5.8 - Cálculo do Rendimento de Oxigênio Singlete

O rendimento de $^1\text{O}_2$ gerado nas reações dos hidroperóxidos de lipídeos, hidroperóxidos orgânicos e H_2O_2 com NO_2BF_4 foi calculado empregando-se como padrão o endoperóxido DMNO_2 . Este endoperóxido por termodecomposição a 37 °C libera $^1\text{O}_2$ com 76% de rendimento ($k = 2,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Müller e Zierreis, 1990). Medidas de emissão de luz no infravermelho próximo ($\lambda = 1270$ nm) foram realizadas através da termólise de 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v). Calculou-se o rendimento tomando-se a área sob a curva de emissão do DMNO_2 , considerando-se a velocidade de geração de $^1\text{O}_2$ e comparou-se com área sob a curva das emissões das reações com NO_2BF_4 . Detalhes sobre o cálculo se encontram no Apêndice II.

3.5.9 - Reação entre os Hidroperóxidos de Ácido Oleico e NO_2BF_4

Uma solução contendo 10 mM do hidroperóxido de OAOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v, total de 3mL), foi mantida por 30 minutos sob borbulho de argônio a -20°C . Após este período foi adicionado NO_2BF_4 e a mistura reacional foi mantida sob agitação constante, a temperatura ambiente e sob fluxo de argônio. Após 2 horas de reação, foram adicionados água deionizada e éter etílico (5 mL ao total). A fase orgânica foi extraída e o solvente seco sob fluxo de N_2 . Ao resíduo foi adicionado isopropanol/metanol (1:1, v/v) e os produtos da reação analisados por cromatografia em camada delgada e por espectrometria de massas pelo modo negativo de ionização electrospray (ESI⁻/MS), condições utilizadas: temperatura da fonte 100°C , temperatura de dessolvatação 200°C , voltagem do cone 35 V e energia de colisão 25 eV, potencial do capilar e do eletrodo 4,5 e 0,5 kV, respectivamente.

4 - Resultados

4.1 - Síntese e Caracterização dos Endoperóxidos Derivados do Naftaleno Utilizados como Fonte de Oxigênio Singlete

4.1.1 - Síntese do Endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida Não Marcada (DHPNO₂) e Marcada com Oxigênio-18 (DHPN¹⁸O₂)

A síntese dos derivados naftalênicos precursores de DHPNO₂, foi realizada conforme método desenvolvido no nosso laboratório (Martinez *et al.*, 2000b; Pierlot *et al.*, 2000; Dewilde *et al.*, 1998; Di Mascio e Sies, 1989) e os rendimentos obtidos em cada etapa da rota sintética estão dentro do esperado (Figura 4.1).

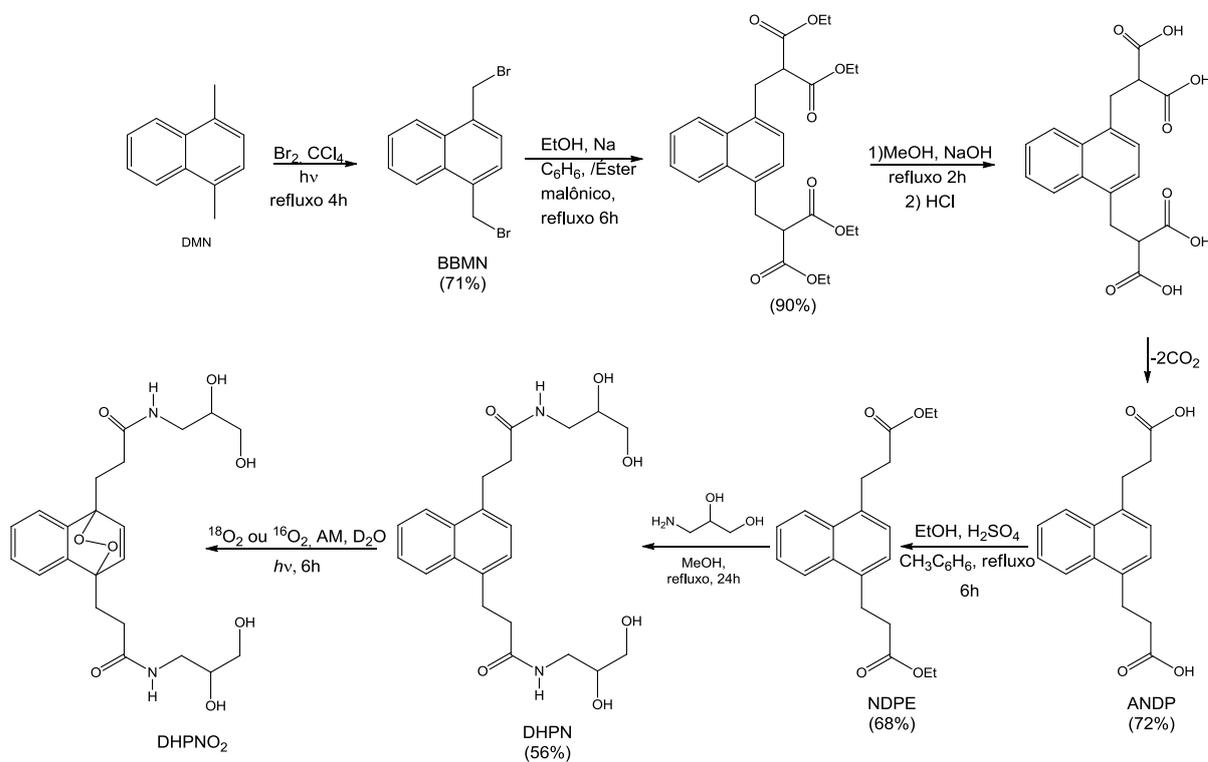


Figura 4.1. Preparação dos endoperóxido derivado do naftaleno DHPNO₂.

A preparação do endoperóxido de DHPNO₂ (não marcado e marcado com ¹⁸O₂) foi realizada através de fotossensibilização com azul de metileno em D₂O. Ao final da reação, após 6 horas, utilizou-se uma resina para retirada do fotossensibilizador e a concentração foi determinada por espectrofotometria UV/VIS, através da medida da absorbância em $\lambda = 288$ nm, antes e depois de aquecido a 50°C por 2 horas. Assim, na análise do espectro de massas para o DHPNO₂ sintetizado com ¹⁶O₂ (Figura 4.2, A) tem-se íon m/z 451 [(M + H)]⁺ que corresponde ao íon molecular. A perda de uma molécula de O₂ leva ao íon m/z 419 [(M + H) - O₂]⁺. Outros fragmentos encontrados correspondem aos íons m/z 381 [(M + H) - O₂ - 2H₂O - 2H]⁺, m/z 359 [(M + H) - C₃H₁₀NO₂]⁺, m/z 341 [(M + H) - C₃H₁₀NO₂ - H₂O]⁺, m/z 300 [(M + H) - C₆H₁₂NO₃ - 5H]⁺ e m/z 229 [(M + H) - C₈H₁₈N₂O₅]⁺.

Na análise do espectro de massas para DHPN¹⁸O₂ (Figura 4.2, B), tem-se íon m/z 455 [(M + H)]⁺ que refere-se ao íon molecular. Com a perda de uma molécula de ¹⁸O₂ tem-se o íon m/z 419 [(M + H) - ¹⁸O₂]⁺. Os outros fragmentos encontrados, correspondem aos íons m/z 381 [(M + H) - ¹⁸O₂ - 2H₂O - 2H]⁺ referente a perda de uma molécula de ¹⁸O₂ e duas moléculas de H₂O, o íon m/z 359 [(M + H) - C₃H₁₀N¹⁸O₂]⁺ e o íon m/z 284 [(M + H) - ¹⁸O₂C₆H₁₀NO₃ - 3H]⁺

A termólise do DHPNO₂ em 37°C gerou intensa emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm, característica de ¹O₂ (Figura 4.3 A), o que foi confirmado através do espectro de emissão, que apresenta intensidade máxima em 1270 nm (Figura 4.3 B).

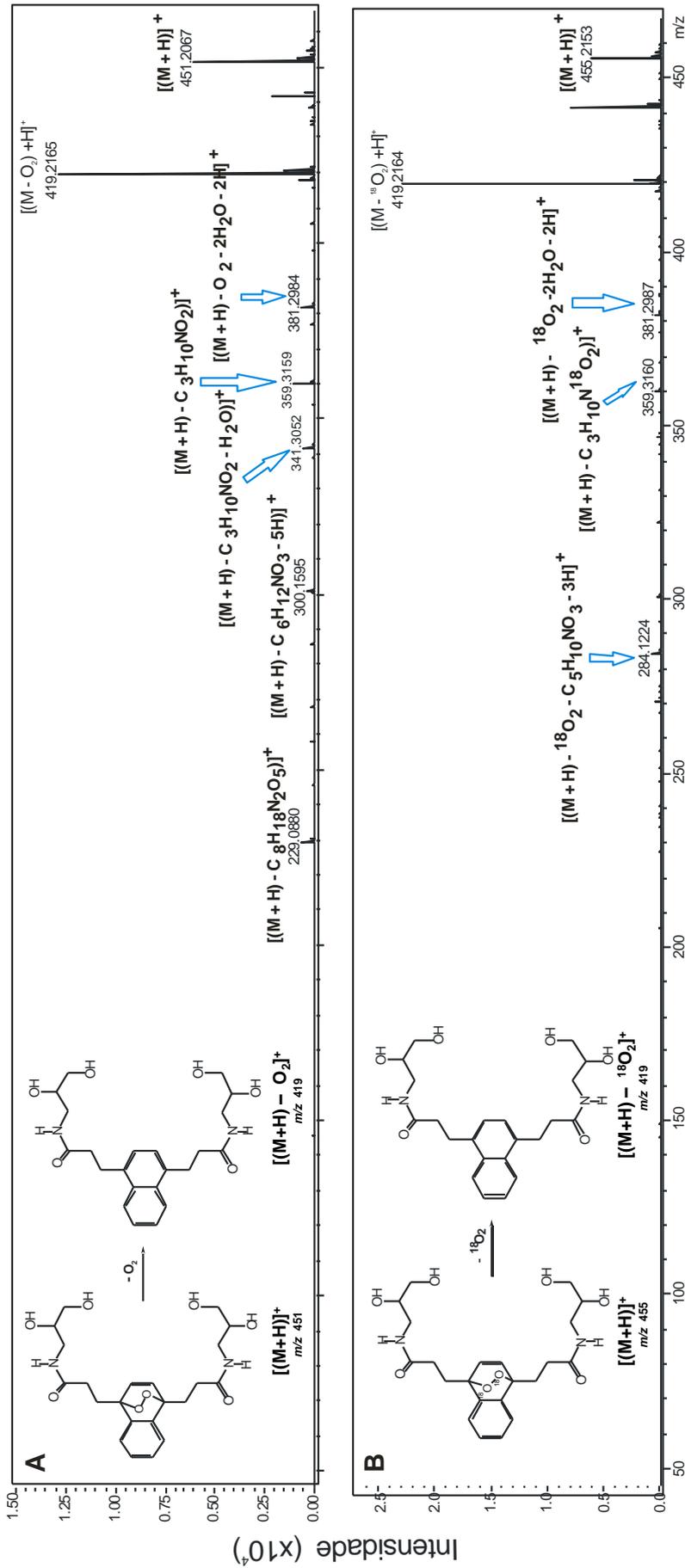


Figura 4.2. Espectros de ESI⁺-MS do DHPNO₂ (A) e de DHPN¹⁸O₂ (B).

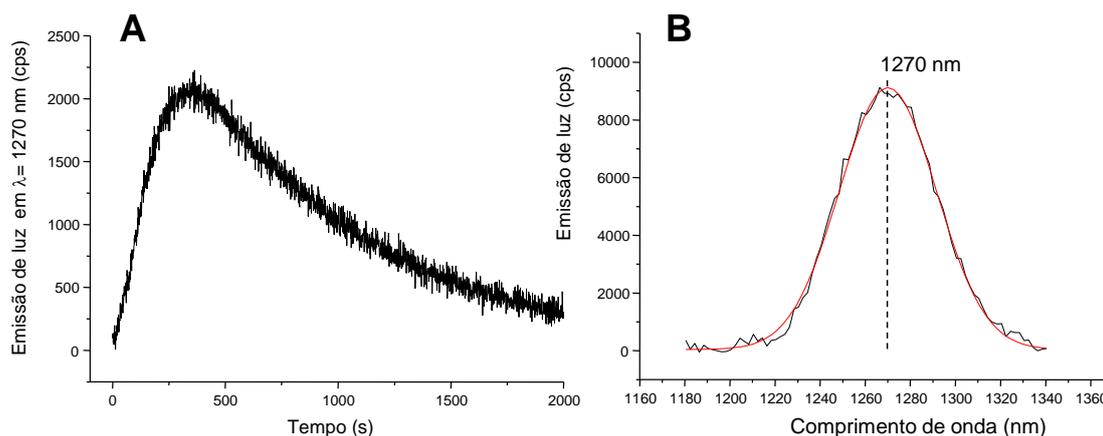


Figura 4.3. (A) Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm gerado pela termólise de DHPNO₂ a 37°C. (B) Espectro de emissão de ¹O₂ liberado pela termólise de DHPNO₂ a 37°C (25 mM em D₂O).

4.1.2 - Síntese do Endoperóxido de 3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropoato de sódio (NDPO₂)

Na preparação do endoperóxido NDPO₂ foi utilizado o método de desproporcionamento de H₂O₂ catalisado por íons molibdato em meio básico, como fonte primária de ¹O₂ (Aubry *et al.*, 1989). Este método propicia a recuperação do endoperóxido através da precipitação de sua forma ácida. Na Figura 4.4 é mostrada a síntese do NDPO₂, a partir do derivado di-ácido (ANDP).

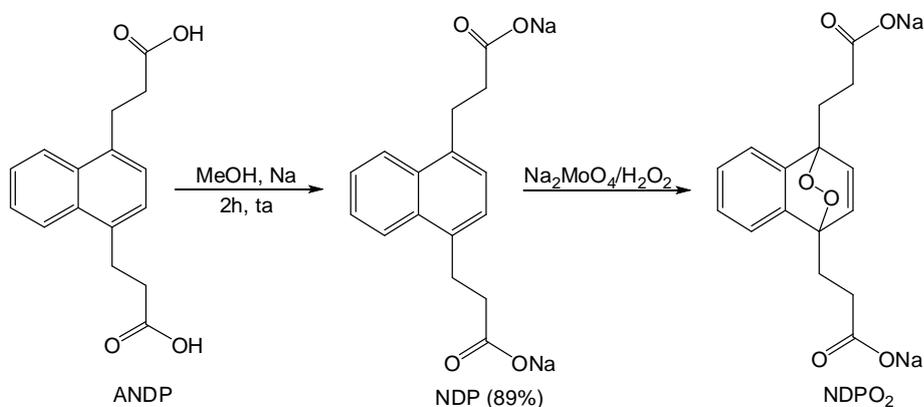


Figura 4.4. Preparação dos endoperóxidos derivados do naftaleno NDPO₂.

A análise do espectro de massas obtido do NDPO₂ (Figura 4.5) indica que o íon m/z 349 $[(M - H) + 2H]^-$ corresponde ao íon molecular. Além disso, o íon m/z 317 corresponde à perda de uma molécula de O₂ $[(M - H) - O_2 + 2H]^-$, o íon m/z 303 corresponde à perda de dois átomos de Na $[(M - H) - 2Na + 2H]^-$ e o íon m/z 271 que corresponde à perda de dois átomos de Na e uma molécula de O₂ $[(M + H) - 2Na - O_2 + 2H]^-$.

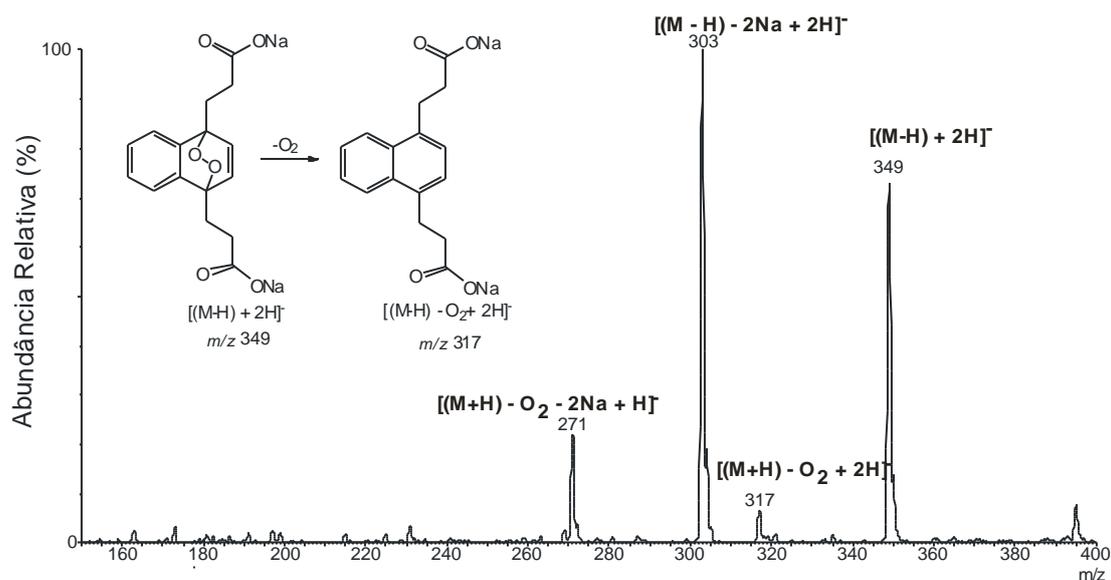


Figura 4.5. Espectro de ESI/MS do endoperóxido NDPO₂.

Com a termólise a 37°C do endoperóxido NDPO₂ ocorreu intensa emissão de luz em $\lambda=1270$ nm, característica de ¹O₂ (Figura 4.6 A), o que foi confirmado através do espectro de emissão, que apresenta intensidade máxima em 1270 nm (Figura 4.6 B).

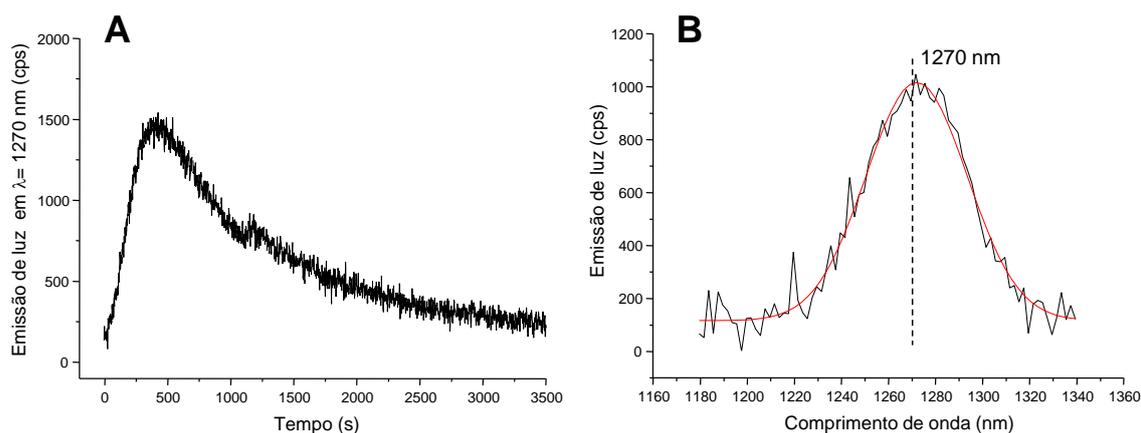


Figura 4.6. (A) Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm gerado pela termólise de NDPO₂ a 37°C (10 mM em D₂O). (B) Espectro de emissão de ¹O₂ liberado pela termólise de NDPO₂ a 37°C (10 mM em D₂O).

4.1.3 - Síntese do Endoperóxido de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de *N,N,N*-trimetil Etanaminio) (NBTEO₂)

A síntese do endoperóxido do derivado naftalênico dicatiônico NBTEO₂, parte do DMN e tem um intermediário comum à síntese do DHPN, o BBMN. As reações realizadas para síntese deste composto estão resumidas na Figura 4.7, com os respectivos rendimentos.

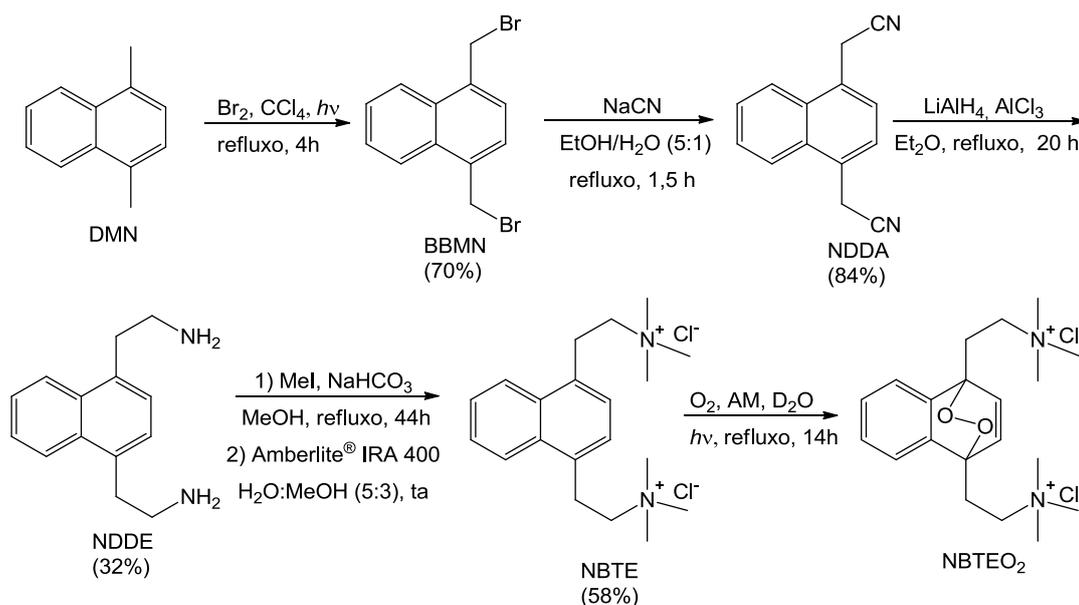


Figura 4.7. Síntese dos derivados naftalênicos para obtenção do endoperóxido de NBTEO₂.

Para obtenção do endoperóxido dicatiônico NBTEO₂, foi feita uma reação de fotossensibilização com azul de metileno em D₂O. A análise por espectrometria de massas ESI⁺/MS demonstrou a formação do íon de *m/z* 166 correspondente ao endoperóxido e ao íon *m/z* 150 correspondente a perda de O₂ (Figura 4.8). Os íons obtidos pela fragmentação do íon *m/z* 166 são apresentados na tabela 6.

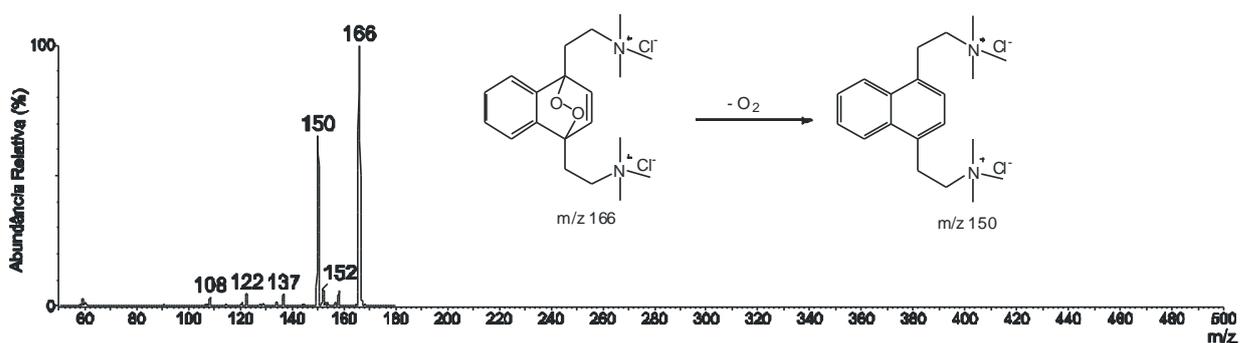
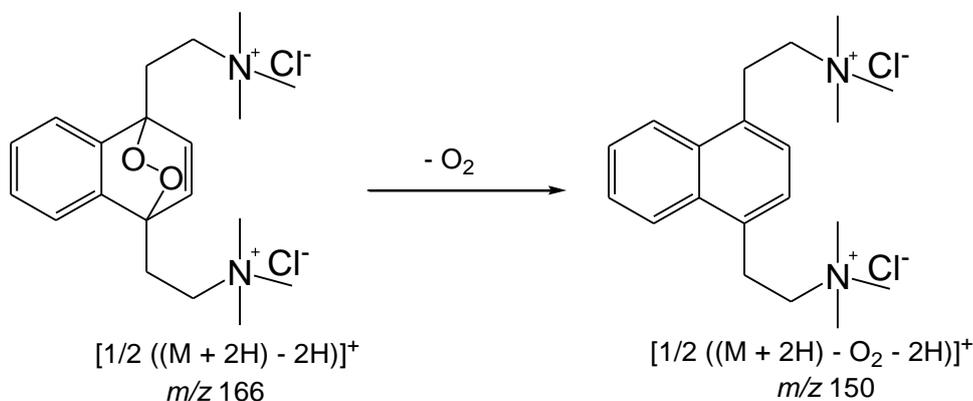


Figura 4.8. Espectro de ESI⁺/MS do endoperóxido NBTEO₂.

Tabela 6. Íons produto obtidos a partir da fragmentação de *m/z* 166



<i>m/z</i>	Estrutura do íon
166	$[1/2 (M + 2H) - 2H]^+$
150	$[1/2 ((M + 2H) - O_2 - 2H)]^+$
137	$[1/2 (M + 2H - (CH_3CH_2)_2 - 2H)]^+$
122	$[1/2 (M + 2H - (CH_3CH_2NH)_2 - 2H)]^+$
108	$[1/2 (M + 2H - ((CH_3)_2CH_2N)_2 - 2H)]^+$

A termólise do endoperóxido dicatiónico em 37°C gerou intensa emissão de luz em $\lambda=1270$ nm, característica de $^1\text{O}_2$. (Figura 4.9 A). O espectro de emissão adquirido a partir da termólise do endoperóxido a 50°C demonstrou um máximo de intensidade em 1270 nm (Figura 4.9 B), comprovando a geração de $^1\text{O}_2$.

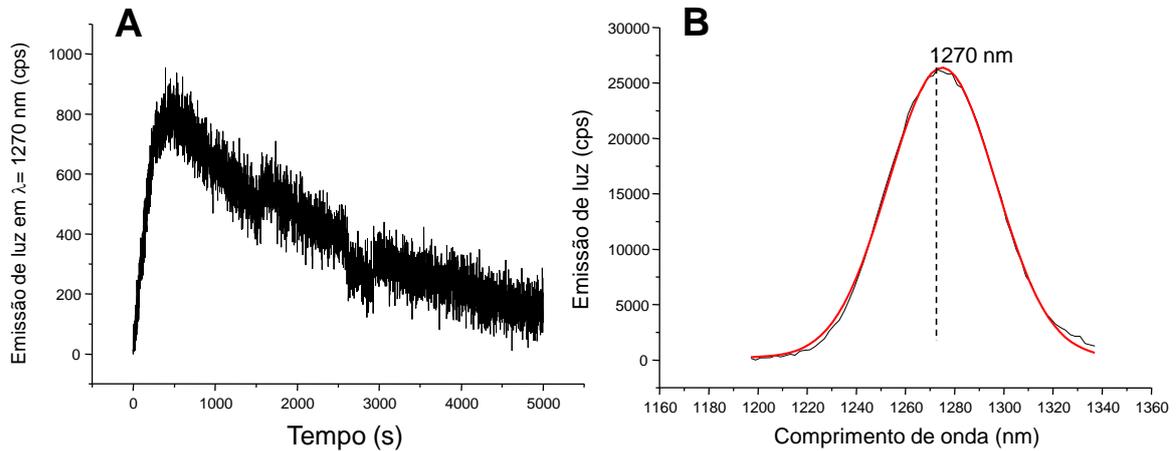


Figura 4.9. (A) Emissão de luz em $\lambda= 1270$ nm gerado pela termólise do endoperóxido NBTEO_2 a 37°C (8 mM em D_2O). (B) Espectro de emissão de $^1\text{O}_2$ liberado pela termólise do endoperóxido de NBTEO_2 a 50°C (8 mM em D_2O).

4.2 – Síntese e Caracterização dos Hidroperóxidos de Lipídeos

4.2.1 – Hidroperóxidos do Ácido Oleico

O ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado que foi fotossensibilizado com azul de metileno e, após a purificação em coluna de sílica, foi obtida uma mistura de hidroperóxidos do ácido oléico (9-OAOOH e 10-OAOOH) correspondente a oxidação pelo $^1\text{O}_2$ (Figura 4.10).

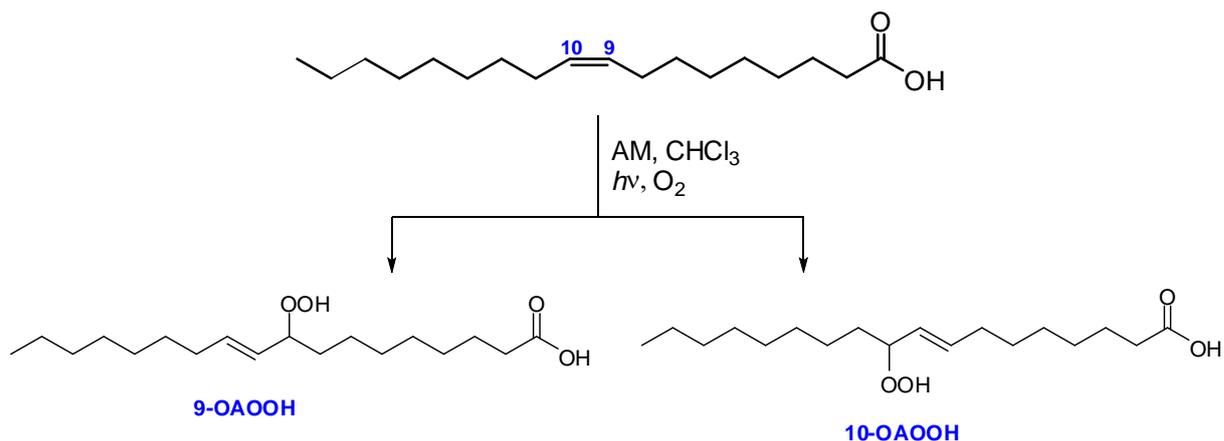


Figura 4.10. Preparação dos hidroperóxidos 9-OLOOH e 10-OLOOH por fotooxidação.

A análise por RMN de ¹H (Figura 4.11), indica que os hidrogênios do grupo metila e da cadeia alifática (-CH₂)_n, se localizam entre 0,83 a 1,65 ppm, os hidrogênios ligados ao oxigênio do grupo peroxila apresentam deslocamento químico em 2,02 ppm. Como seria de se esperar, os hidrogênios metilênicos vizinhos à carbonila do ácido, tem deslocamento químico em 2,35 ppm, aproximadamente. O hidrogênio ligado ao carbono do grupo peroxila tem um deslocamento químico próximo de 4,25 ppm. Os hidrogênios vinílicos apresentam deslocamento químico em 5,30 e 5,71 ppm.

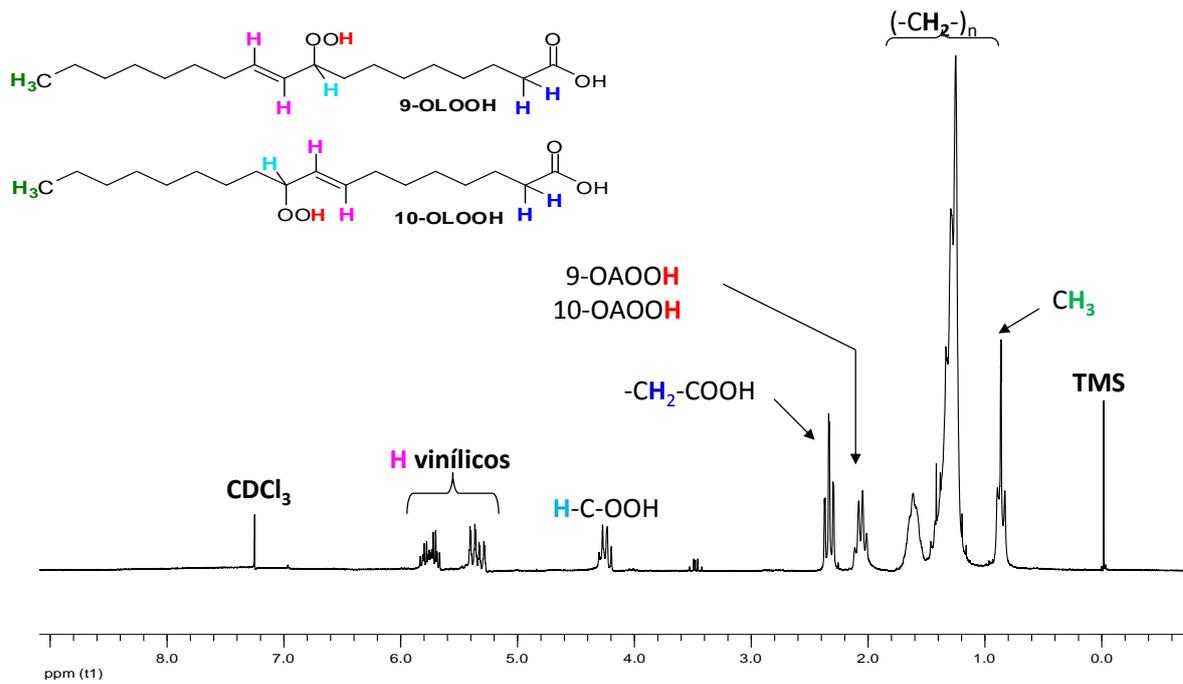


Figura 4.11. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido oleico (OA00H).

No espectro de RMN de ^{13}C , o pico em 179 ppm corresponde ao carbono carbonílico do ácido. Já o pico em 87 ppm, corresponde ao carbono do hidroperóxido. Os carbonos vinílicos têm deslocamento químico entre 128 e 137 ppm, os carbonos metilênicos entre 22 e 34 ppm e o carbono metílico em 14 (Figura 4.12).

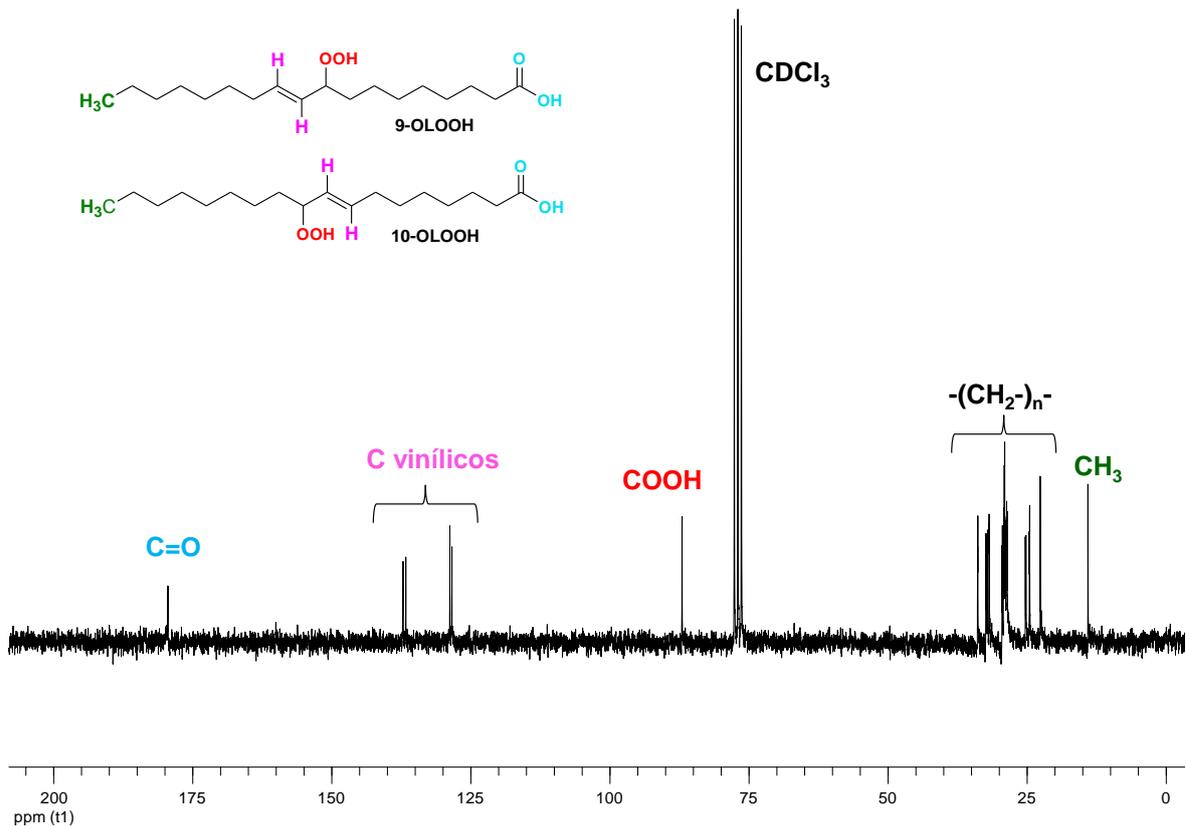


Figura 4.12. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz CDCl_3 , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido oleico. (OAOOH).

Também foi feita análise dos hidroperóxidos do ácido oleico por espectrometria de massas, o que comprovou a formação destes produtos (Figura 4.13). O íon de m/z 313 corresponde a $[(M - H)]^-$, e o íon m/z 295 corresponde a $[(M - H) - \text{H}_2\text{O}]^-$. Também se pode verificar a formação dos isômeros 9-OAOOH e 10-OAOOH pela fragmentação característica dos isômeros, conforme mostrado na Figura 4.13 B.

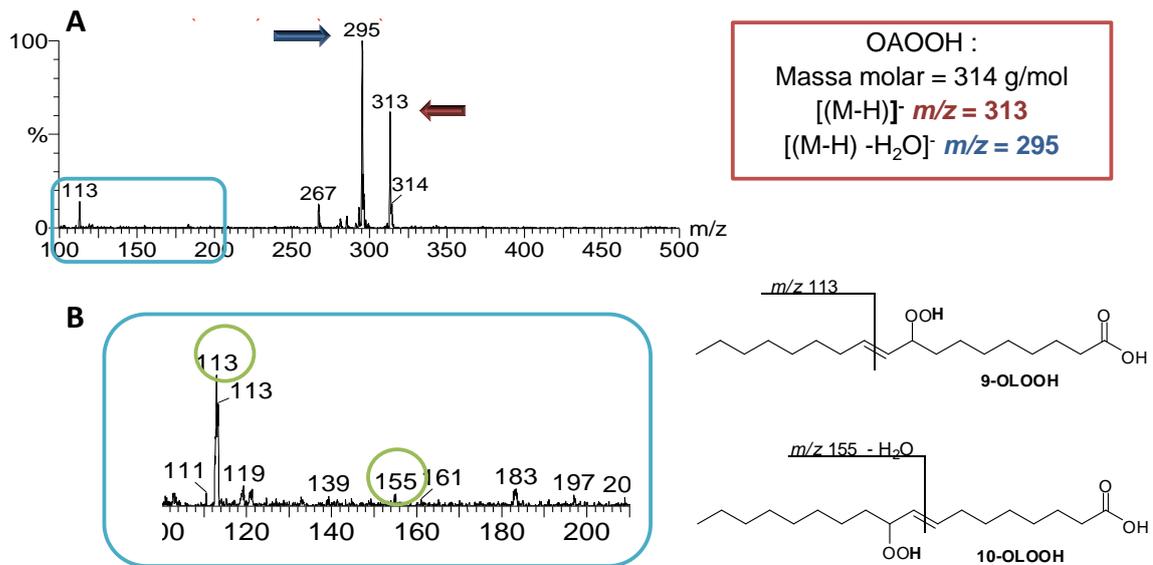


Figura 4.13. Espectro de ESI dos hidroperóxidos do ácido oleico. (A) Espectro de massas de m/z 100 a 500. (B) Íons m/z 113 e m/z 155 característicos da fragmentação dos isômeros 9-OAPOH e 10-OAPOH, respectivamente.

4.2.2- Hidroperóxidos do Ácido Linoleico

A reação de fotossensibilização do ácido linoleico foi realizada, utilizando-se o azul de metileno como agente fotossensibilizador. O $^1\text{O}_2$ produzido reage com o ácido linoleico e leva à formação de quatro hidroperóxidos (9-LAPOH, 10-LAPOH, 12-LAPOH e 13-LAPOH) (Figura 4.14).

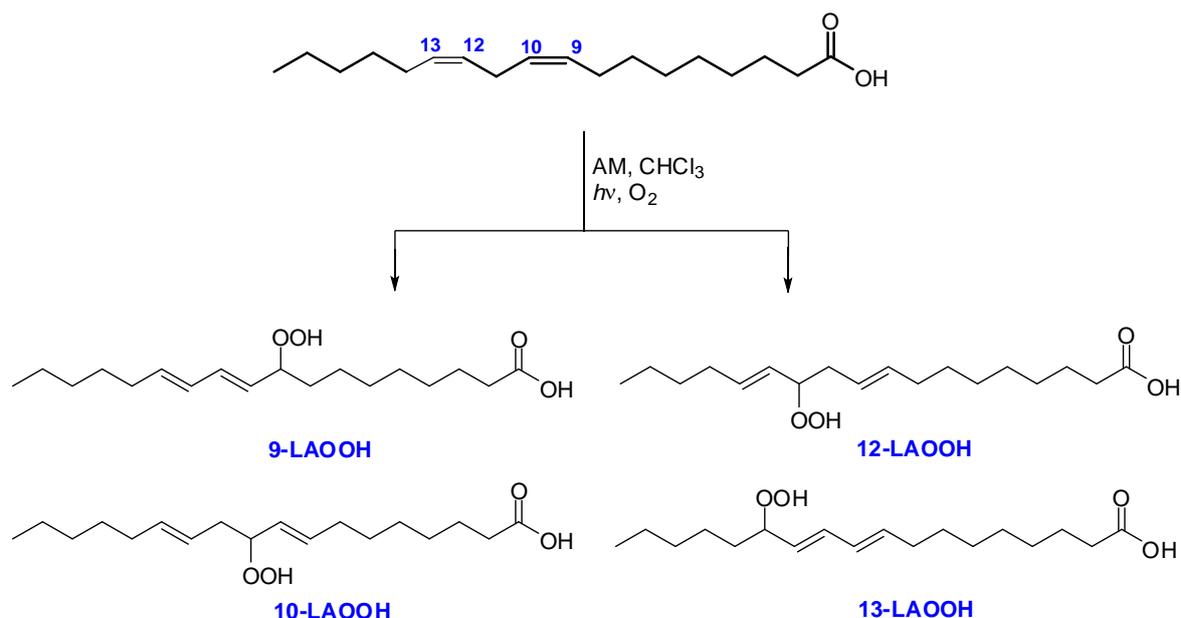


Figura 4.14. Esquema da formação dos hidroperóxidos 9-LAOOH, 10-LAOOH, 12-LAOOH e 13-LAOOH.

Após a purificação em coluna de sílica, a mistura dos hidroperóxidos do ácido linoléico foi analisada por RMN de ¹H (Figura 4.15). Como há quatro estereoisômeros, a análise do espectro de RMN de ¹H é complexa, sendo difícil atribuir sem erros todos os sinais. Nele é possível apenas identificar hidrogênios do grupo metila e da cadeia alifática (-CH₂)_n, que se localizam entre 0,85 a 1,66 ppm; o hidrogênio ligado ao carbono do grupo peroxila que apresenta um deslocamento químico próximo de 4,30 ppm, e os hidrogênios vinílicos que apresentam deslocamento químico entre 5,36 e 6,7 ppm.

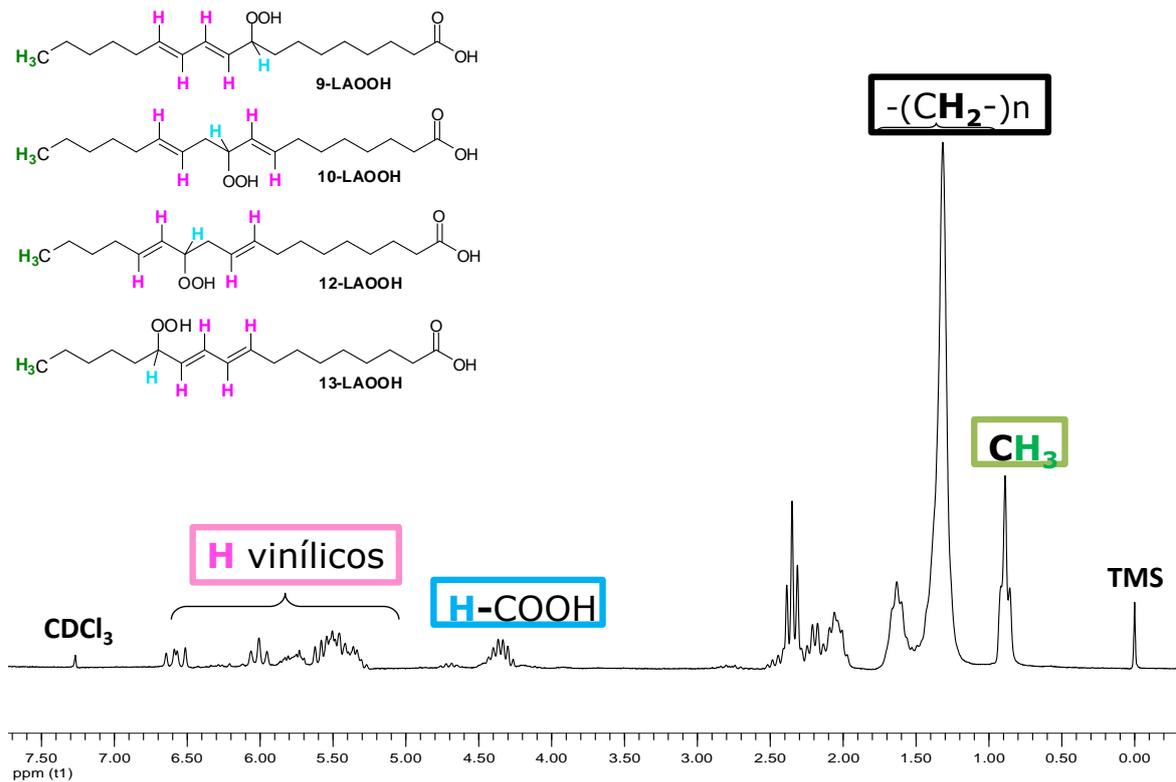


Figura 4.15. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do ácido linoléico (LAOOH).

No espectro de massa dos hidroperóxidos do ácido linoleico, podemos verificar a presença dos íons intensos m/z 311 $[(M - \text{H})^-]$ e m/z 293 $[(M - \text{H}) - \text{H}_2\text{O}]^-$, que correspondem ao íon molecular e a perda de uma molécula de H_2O pelo hidroperóxido. A ampliação do espectro demonstra a formação dos isômeros de LAOOH, conforme o padrão de fragmentação (MacMillan e Murphy, 1995) apresentado na Figura 4.16.

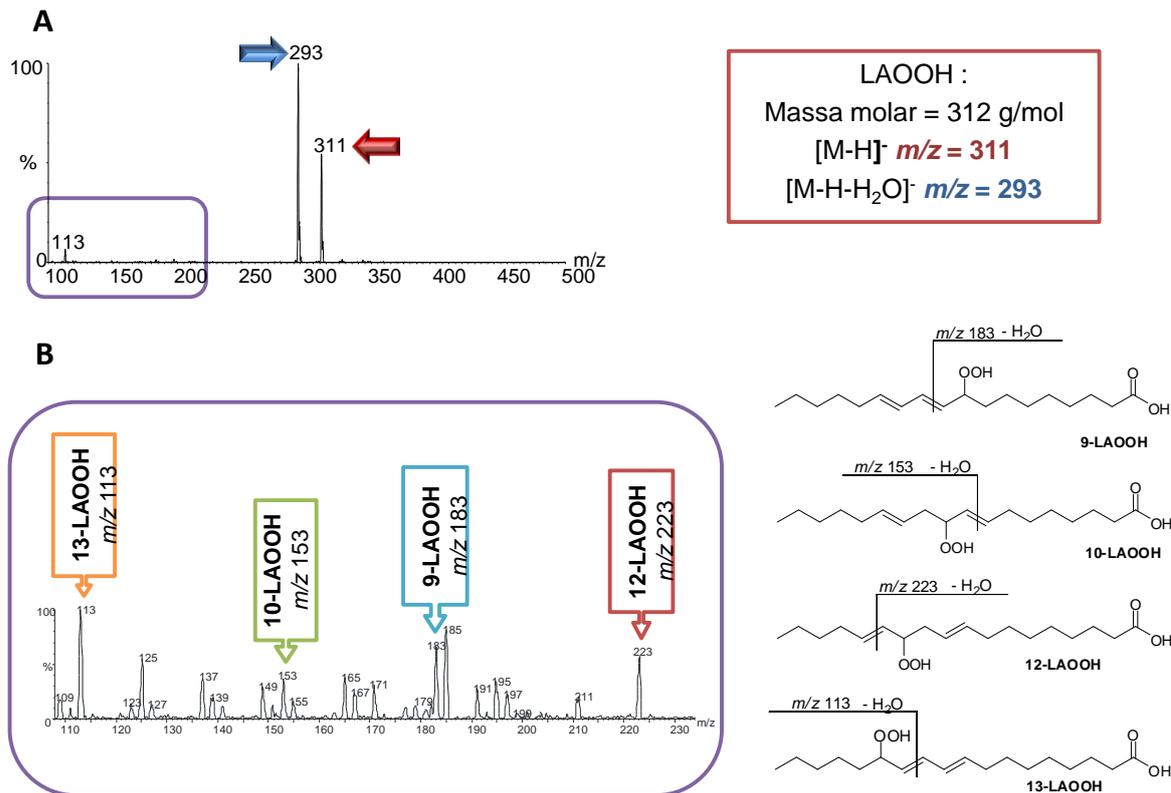


Figura 4.16. Espectro de ESI dos hidroperóxidos do ácido linoleico. (A) Espectro de massas de m/z 100 a 500, (B) Íons m/z 113, 153, 183 e 223 característicos da fragmentação dos isômeros 13-LAOOH, 10-LAOOH, 9-LAOOH e 12-LAOOH, respectivamente.

4.2.3- Hidroperóxidos do Colesterol

Os hidroperóxidos do colesterol foram preparados através da fotossensibilização com o azul de metileno ou rosa bengala. Uma vez submetido à fotossensibilização, dois mecanismos competitivos (tipo I e tipo II) agem para formar diferentes produtos (Figura 4.17). Pelo mecanismo do tipo I, os principais hidroperóxidos formados são 3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 α hidroperóxido (7 α ChOOH) e 3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 β -hidroperóxido (7 β ChOOH), podendo também ocorrer a formação de epóxidos, alcoóis e cetonas (Kulig e Smith, 1973, Girotti, 1985, Osada e Sevanian, 2000). No mecanismo tipo II, os hidroperóxidos formados são os hidroperóxidos 3 β -hidroxicolestano-6-ene-5 α -hidroperóxido

($5\alpha\text{ChOOH}$), 3β -hidroxicolestano-6-ene- 6α -hidroperóxido ($6\alpha\text{ChOOH}$), 3β -hidroxicolestano-6-ene- 6β -hidroperóxido ($6\beta\text{ChOOH}$) (Kulig e Smith, 1973, Korytowski e Girotti, 1999). Outro fato importante, é que os hidroperóxidos $7\alpha\text{ChOOH}$ e $7\beta\text{ChOOH}$ são obtidos através de um rearranjo alílico do $5\alpha\text{ChOOH}$ em solventes pouco polares (Davies e Davison, 1989; Beckwith *et al*, 1989).

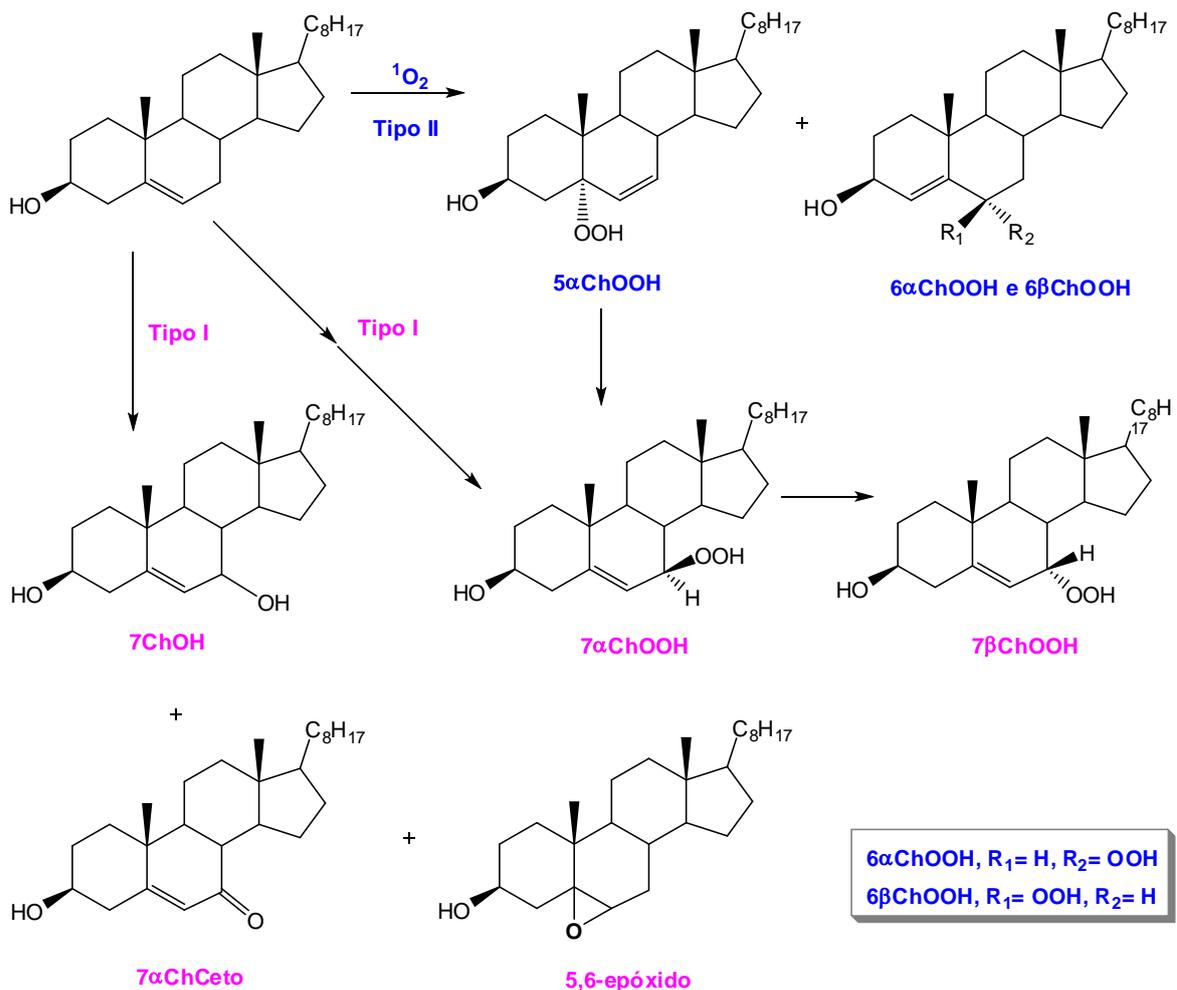


Figura 4.17. Principais produtos gerados pela reação de fotossensibilização do colesterol (Adaptado de Kulig e Smith, 1973, Girotti, 1985 e Osada e Sevanian, 2000).

Após purificação por coluna de sílica, a mistura dos hidroperóxidos foi analisada por RMN ^1H (Figura 4.18). Como se trata de um espectro de uma

mistura é difícil identificar e atribuir todos os sinais referentes aos deslocamentos químicos. Além disso, alguns sinais encontram-se sobrepostos, pois os deslocamentos químicos são parecidos e temos o problema da resolução devido à frequência do aparelho. Assim, a informação que podemos retirar deste espectro de ^1H , refere-se aos sinais dos hidrogênios vinílicos do hidroperóxido $5\alpha\text{ChOOH}$ e do $7\alpha\text{ChOOH}$. Os prótons vinílicos do $5\alpha\text{ChOOH}$ tem deslocamento químico entre 5,57-5,65 ppm e 5,79 a 5,86ppm. Já o próton vinílico do $7\alpha\text{ChOOH}$ apresenta deslocamento em 5,71 ppm.

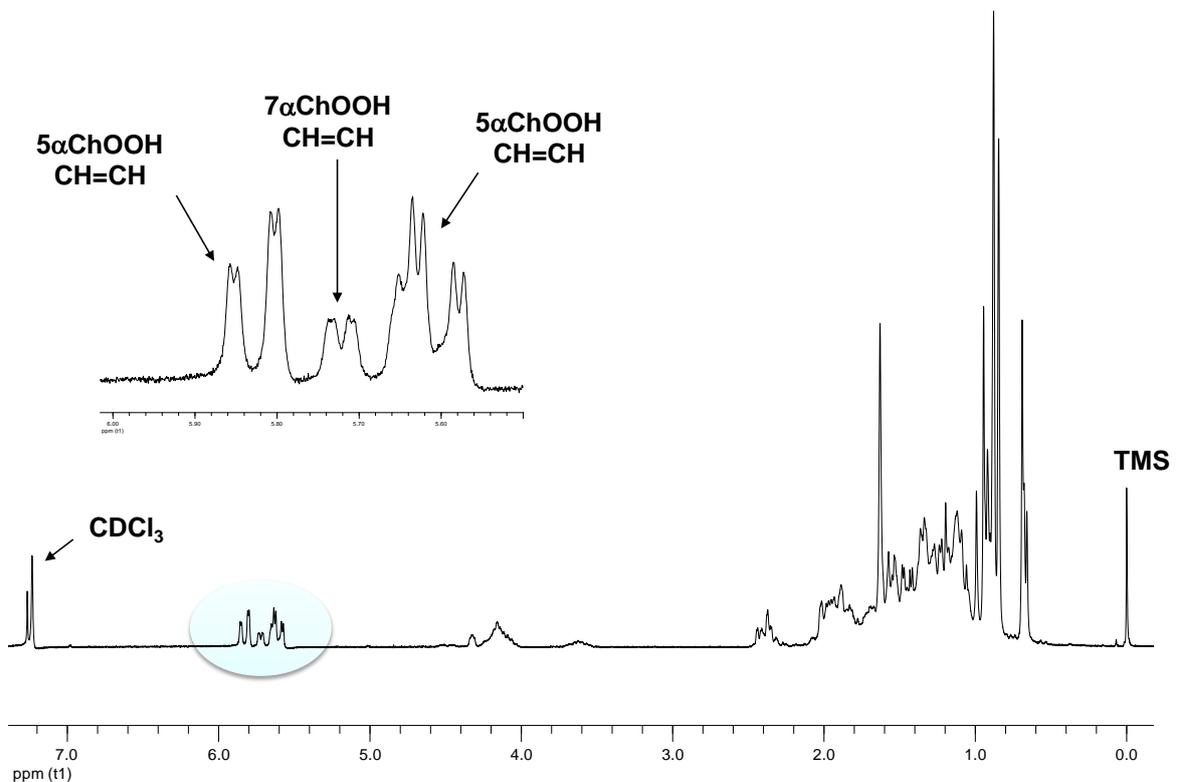


Figura 4.18. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) dos hidroperóxidos do colesterol.

O espectro de massas para a mistura de hidroperóxidos do colesterol, foi obtido através de injeção direta no modo APCI^+ , apresentando como fragmentos mais importantes m/z 419 $[(\text{M} + \text{H})]^+$, que corresponde ao íon molecular, m/z 401 $[(\text{M} + \text{H}) - \text{H}_2\text{O}]^+$, que corresponde à perda de uma molécula H_2O de ChOOH , m/z

383 $[(M+H) - 2H_2O]^+$, que corresponde à perda de duas moléculas de H_2O , m/z 367 $[(M+H) - H_2O - H_2O_2]^+$ que corresponde à perda de uma molécula de H_2O e H_2O_2 (Figura 4.19).

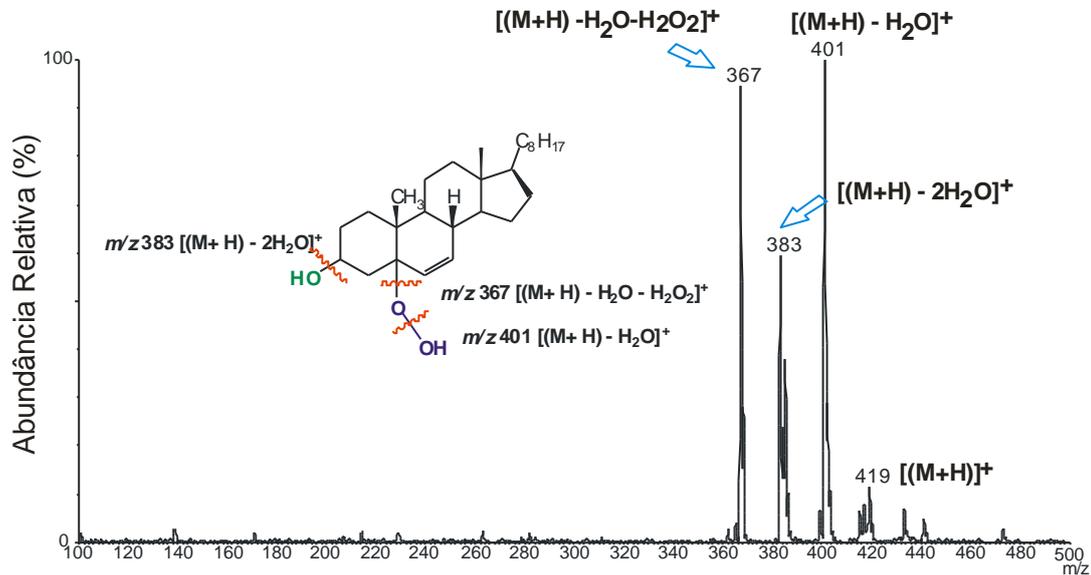


Figura 4.19. Espectro $APCI^+/MS$ dos hidroperóxidos de colesterol ($ChOOH$).

4.3 – Medidas de Emissão de Luz

4.3.1 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos, Orgânicos e Peróxido de Hidrogênio com NO_2BF_4 no Infravermelho.

Como o 1O_2 é uma molécula em estado eletrônico excitado, pode decair para o estado fundamental emitindo luz de duas formas: a) através do decaimento bimolecular (com bandas de emissão intensa em 634 nm e 703 nm) e b) através do decaimento monomolecular (emissão de luz no infravermelho próximo centrada em $\lambda = 1270$ nm) (Khan e Kasha, 1963; Browne e Ogryzlo, 1964). Dessa forma, a quimioluminescência representa um método direto para detecção e caracterização de 1O_2 .

Os experimentos realizados concentraram-se no decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$. Inicialmente, foram testados alguns solventes para verificar em qual a reação entre os hidroperóxidos de lipídeos e NO_2BF_4 seria mais bem conduzida. Para tanto, os hidroperóxidos do ácido oleico OAOOH foram submetidos à reação com o agente nitrante em MeOH, CHCl_3 , MeCN e uma mistura de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção de 4:1 (v/v). A mistura de solventes mostrou-se mais adequada, uma vez que todo reagente NO_2BF_4 foi dissolvido e houve intensa emissão de luz (Figura 4.20).

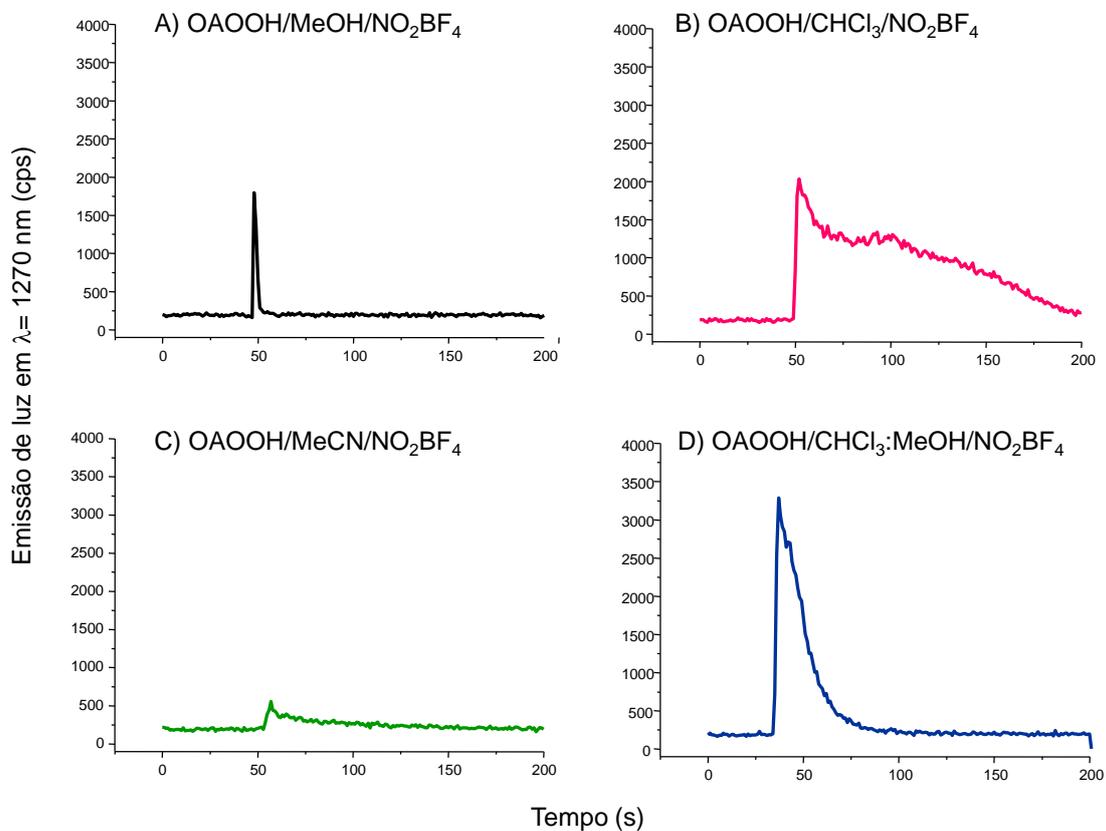


Figura 4.20. Emissão de luz em $\lambda = 1270 \text{ nm}$ para as reações entre os hidroperóxidos do ácido oleico OAOOH e NO_2BF_4 em (A) MeOH, (B) CHCl_3 , (C) MeCN e (D) mistura de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1).

A geração de $^1\text{O}_2$ na reação entre os hidroperóxidos dos ácidos oleico e linoleico e do colesterol com NO_2BF_4 foi monitorada através da emissão de luz proveniente do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ em $\lambda = 1270 \text{ nm}$. Como um

comparativo empregou-se uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$, o derivado naftalênico DMNO₂, capaz de gerar $^1\text{O}_2$ com 76% de rendimento quando submetido à termólise a 37°C (Figura 4.21) (Müller e Zierreis, 1990).

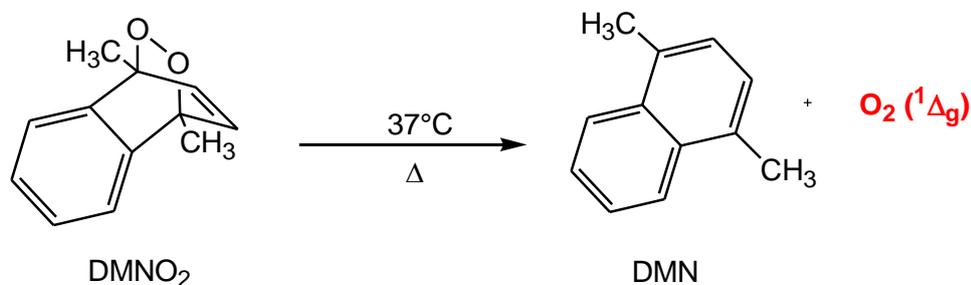


Figura 4.21. Termólise de DMNO₂ a 37°C.

Além das reações estudadas, para verificar se a luz emitida era proveniente da reação entre os hidroperóxidos e NO₂BF₄, foram feitos alguns controles. Observou-se que NO₂BF₄ em CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) e as soluções de ácidos oleico, linoleico e colesterol neste sistema de solventes, quando reagidas com NO₂BF₄ não foram capazes de gerar $^1\text{O}_2$, assim como as soluções de hidroperóxidos isoladamente sem NO₂BF₄ (Figura 4.22).

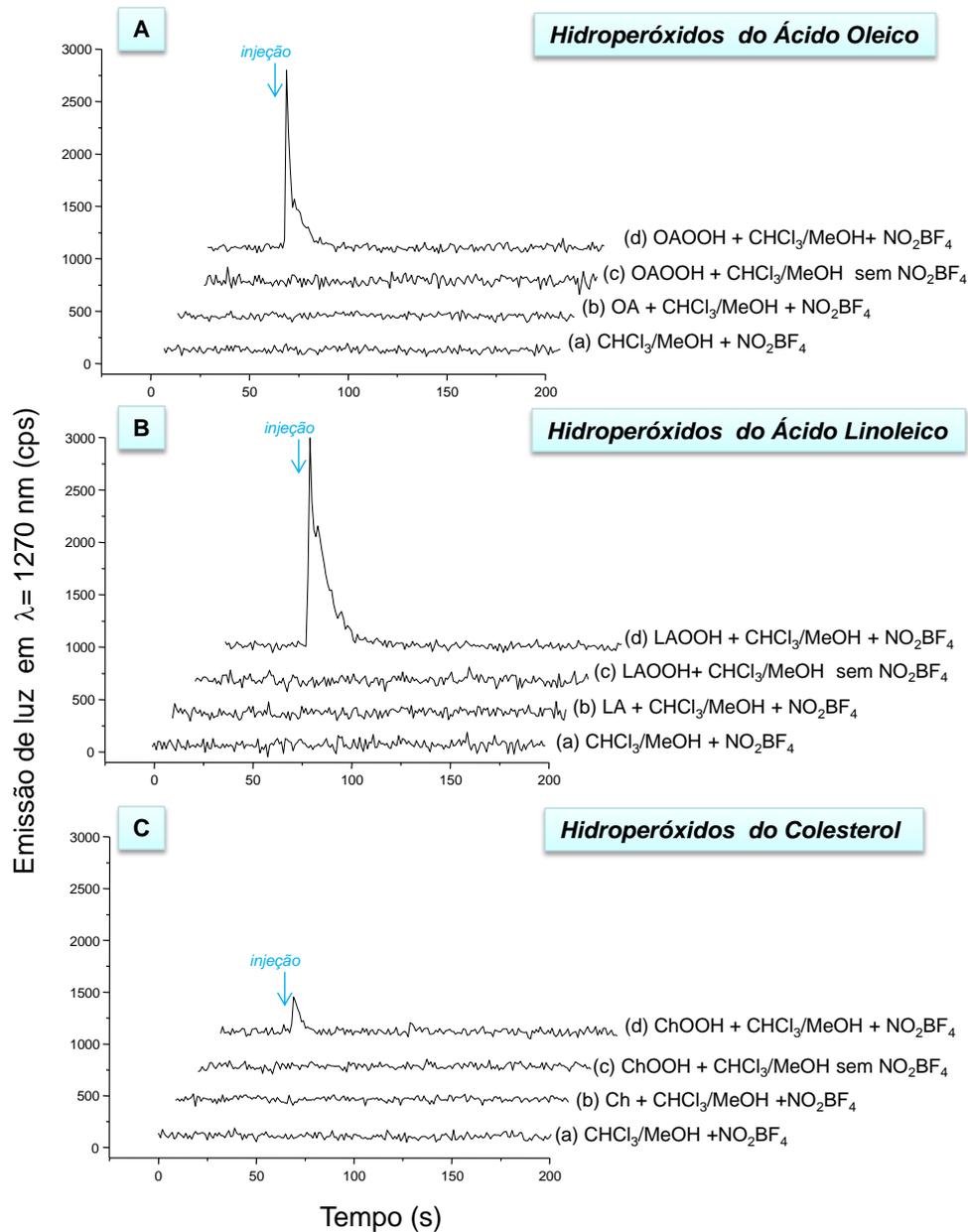


Figura 4.22. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre os hidroperóxidos de (A) ácido oleico, (B) ácido linoleico, (C) colesterol e NO_2BF_4 . Reações controle (a) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) e NO_2BF_4 (b) $L/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NO}_2\text{BF}_4$ (c) $\text{LOOH}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ sem NO_2BF_4 foram realizadas. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos e/ou lipídeos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) para as reações.

O espectro de emissão de luz comprovou que a emissão observada é proveniente do decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre os hidroperóxidos OAOOH, LAOOH e ChOOH com NO_2BF_4 (Figura 4.23).

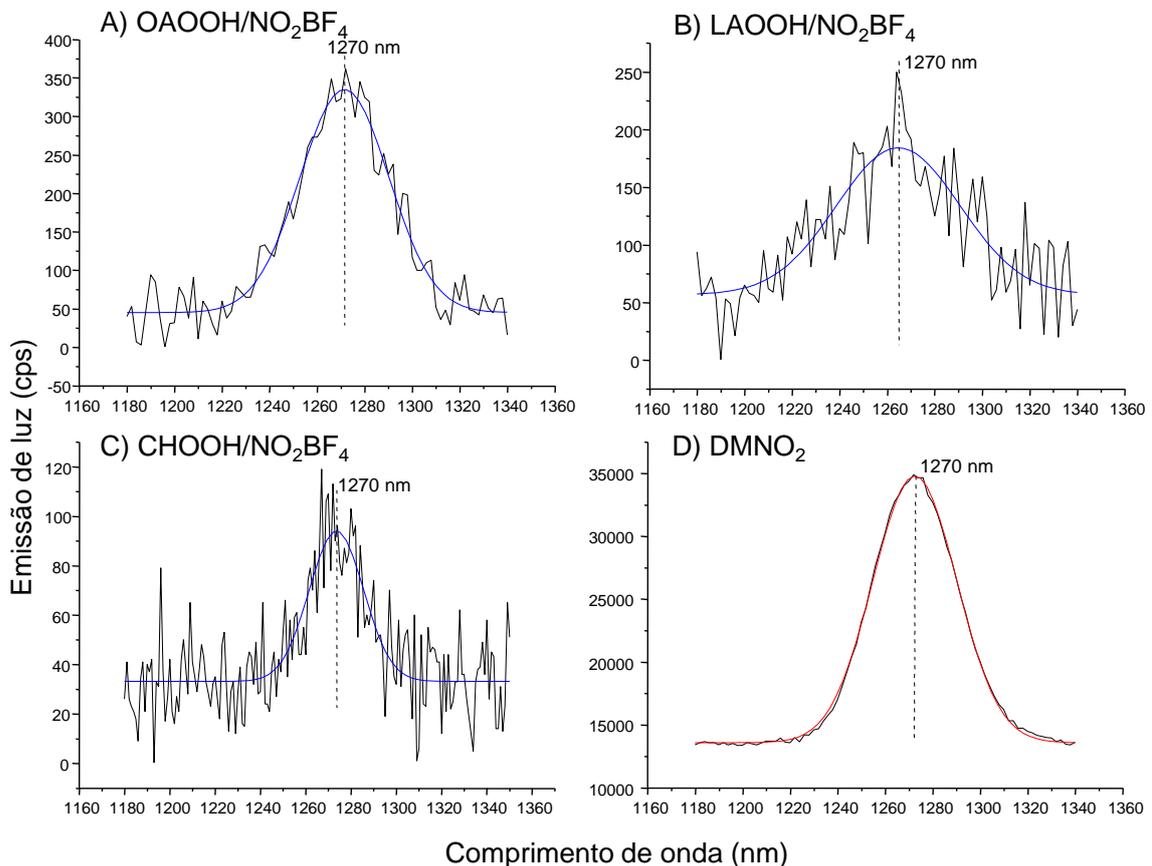


Figura 4.23. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH, (B) LAOOH, (C) ChOOH e NO_2BF_4 . Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v) com NO_2BF_4 . O espectro de emissão de luz do DMNO_2 foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v) a 37°C .

Também foram testados peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os hidroperóxidos orgânicos de cumeno ($CuOOH$) e *t*-butila ($t-BuOOH$) com NO_2BF_4 . Na Figura 4.24 estão representadas as estruturas destes 3 compostos.

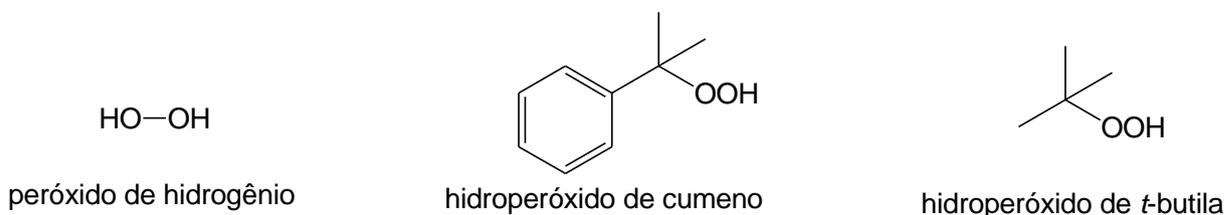


Figura 4.24. Representação das estruturas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido de cumeno ($CuOOH$) e hidroperóxido de *t*-butila ($t-BuOOH$).

A emissão de luz no infravermelho ($\lambda = 1270$ nm), correspondente ao decaimento monomolecular de 1O_2 foi monitorada indicando a formação de 1O_2 para as reações entre H_2O_2 e os hidroperóxidos orgânicos terciários. Alguns controles também foram realizados para verificar se a emissão de luz era proveniente de 1O_2 (Figura 4.25).

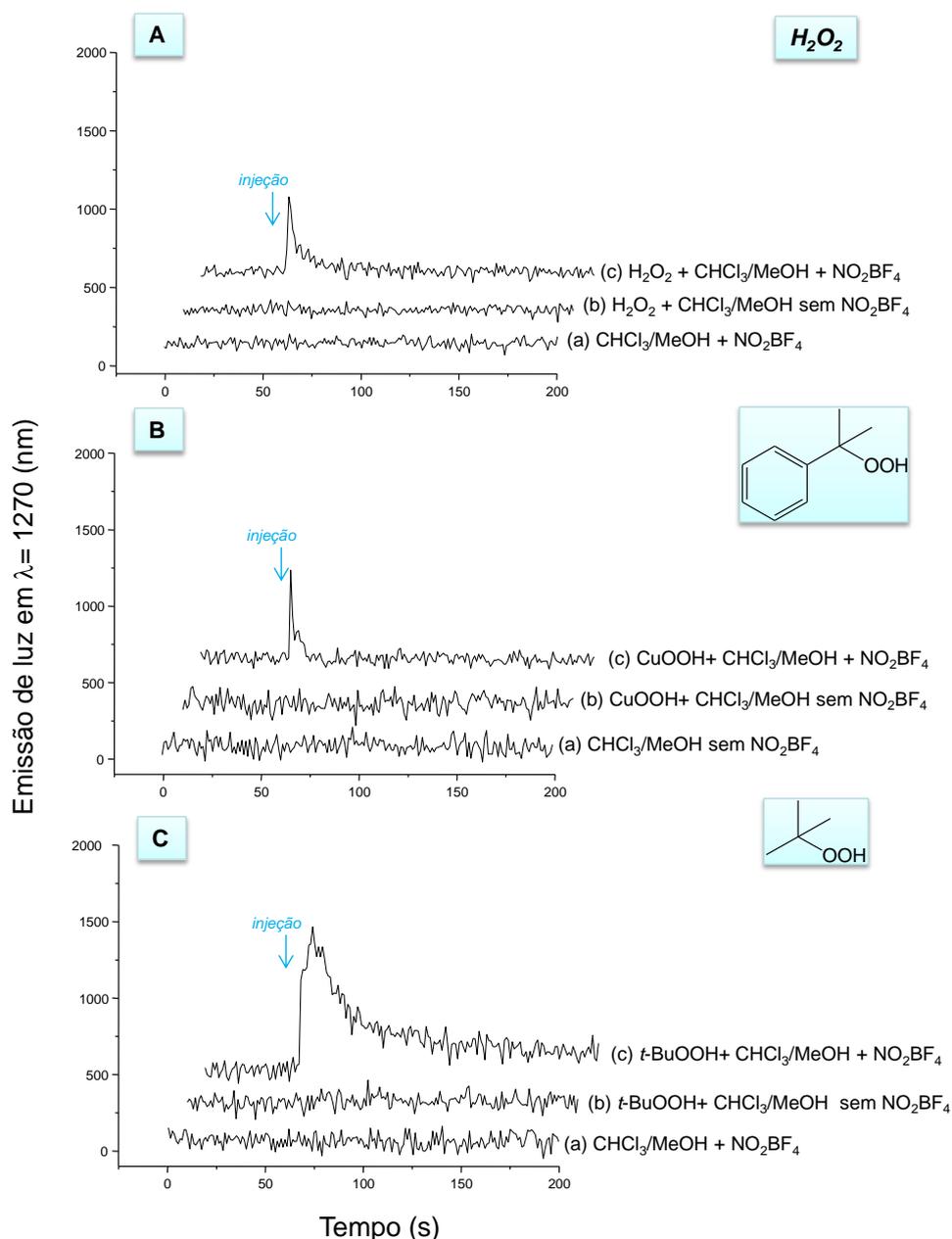


Figura 4.25. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre (A) H_2O_2 , (B) $CuOOH$, (C) $t\text{-BuOOH}$ e NO_2BF_4 . Reações controle (a) $CHCl_3/MeOH$ (4:1; v/v) e NO_2BF_4 (b) H_2O_2 e/ou $ROOH/CHCl_3/MeOH$ sem NO_2BF_4 foram realizadas. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 e dos hidroperóxidos em $CHCl_3/MeOH$ (4:1; v/v) para as reações.

A prova inequívoca foi obtida através do espectro de emissão de luz do decaimento monomolecular de 1O_2 gerado na reação entre H_2O_2 e os hidroperóxidos orgânicos terciários com NO_2BF_4 (Figura 4.26).

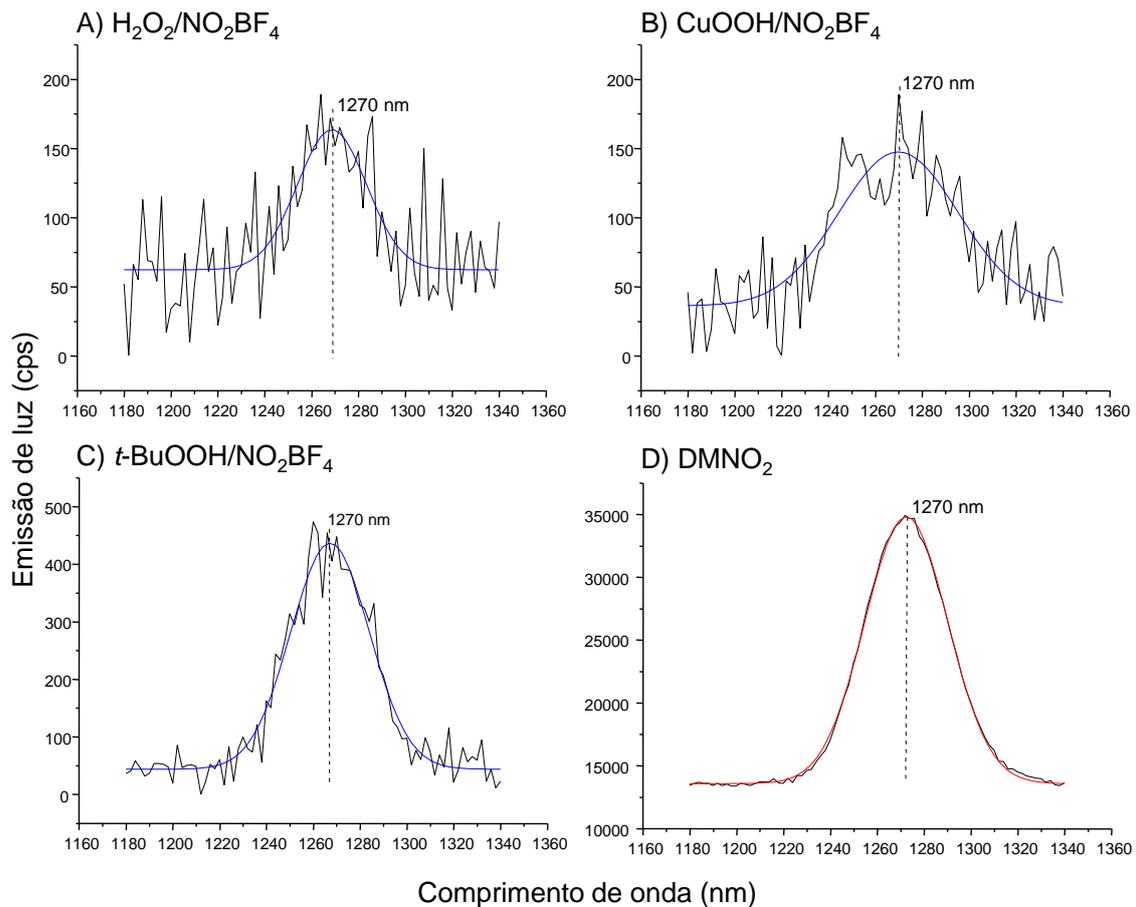


Figura 4.26. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre (A) H_2O_2 e os hidroperóxidos de (B) $CuOOH$ e (C) $t-BuOOH$ com NO_2BF_4 . Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 e dos hidroperóxidos orgânicos em $CHCl_3/MeOH$ (4:1; v/v) com NO_2BF_4 . (D) O espectro de emissão de luz do $DMNO_2$ foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de $DMNO_2$ em $CHCl_3/MeOH$ (4:1; v/v) a $37^\circ C$.

4.3.2 - Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos, Orgânicos e Peróxido de Hidrogênio em Meio Acidificado

As reações entre os hidroperóxidos de lipídeos e NO_2BF_4 foram testadas em meio acidificado. Assim, soluções de 10 mM dos hidroperóxidos $OAOOH$, $LAOOH$ e $ChOOH$, contendo 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM), foram monitoradas quanto ao decaimento monomolecular de 1O_2 no

infravermelho. Verificou-se uma intensidade de luz ligeiramente mais intensa se comparada às reações sem adição de ácido (Figura 4.27).

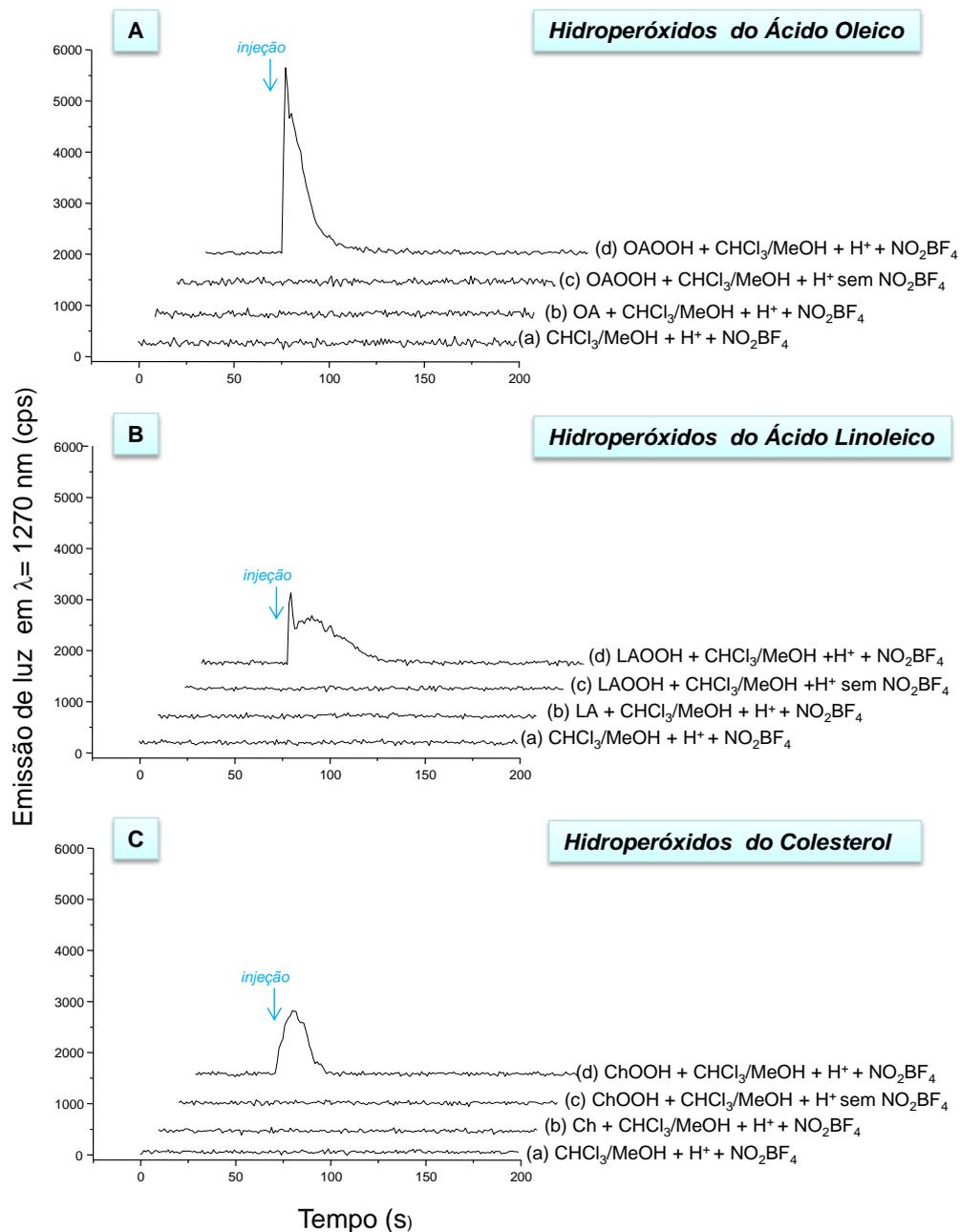


Figura 4.27. Emissão de luz em $\lambda = 1270 \text{ nm}$ para as reações entre os hidroperóxidos de (A) ácido oleico, (B) ácido linoleico, (C) ChOOH e NO_2BF_4 em meio acidificado. Reações controle (a) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v) e NO_2BF_4 (b) $\text{L}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NO}_2\text{BF}_4$ (c) $\text{LOOH}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ sem NO_2BF_4 foram realizadas, em meio acidificado. Preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos e/ou lipídeos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v), com adição de 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) para as reações.

Os espectros de emissão adquiridos para as reações dos hidroperóxidos de lipídeos testados comprovam inequivocamente a geração de $^1\text{O}_2$ (Figura 4.28).

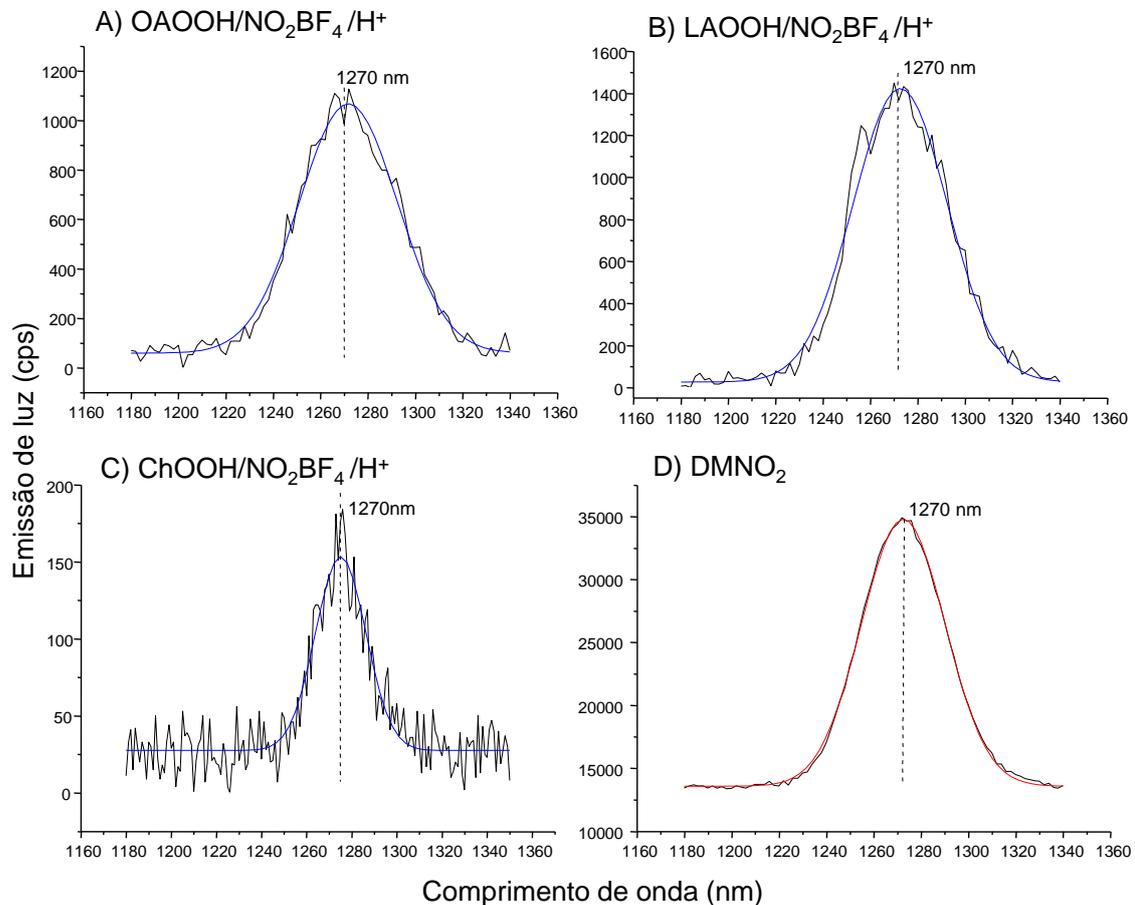


Figura 4.28. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH, (B) LAOOH, (C) ChOOH e NO_2BF_4 em meio acidificado. Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v), contendo 1 μL de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) com NO_2BF_4 . (D) O espectro de emissão de luz do DMNO_2 foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) a 37°C.

A reação entre H_2O_2 e os hidroperóxidos CuOOH e $t\text{-BuOOH}$ em meio acidificado também produziram luz intensa em $\lambda=1270$ nm (Figura 4.29).

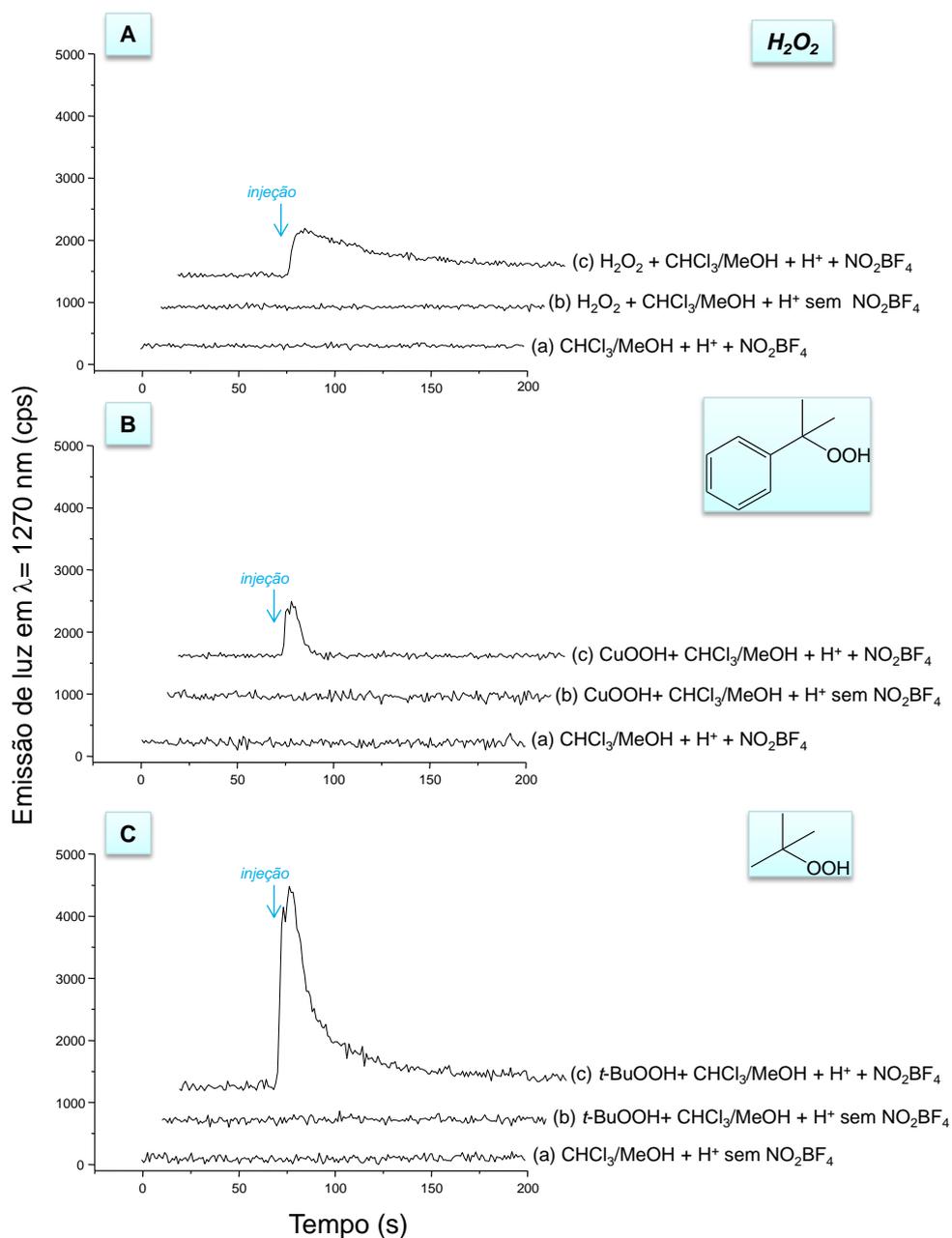


Figura 4.29. Emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm para as reações entre (A) H₂O₂, (B) CuOOH, (C) t-BuOOH e NO₂BF₄. Reações controle (a) CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) e NO₂BF₄ (b) H₂O₂ e/ou ROOH/CHCl₃/MeOH sem NO₂BF₄ foram realizadas em meio acidificado. Empregou-se 3 mL de uma solução 10 mM de H₂O₂ e dos hidroperóxidos em CHCl₃/MeOH (4:1, v/v) com adição de 1 μ L de HCl concentrado (concentração final de 4,1 mM) para as reações.

A prova inequívoca da geração de ¹O₂ por meio das reações entre H₂O₂ e os hidroperóxidos orgânicos terciários com NO₂BF₄ foi obtida através da aquisição

do espectro de emissão de luz no infravermelho, com o máximo de emissão em 1270 nm (Figura 4.30).

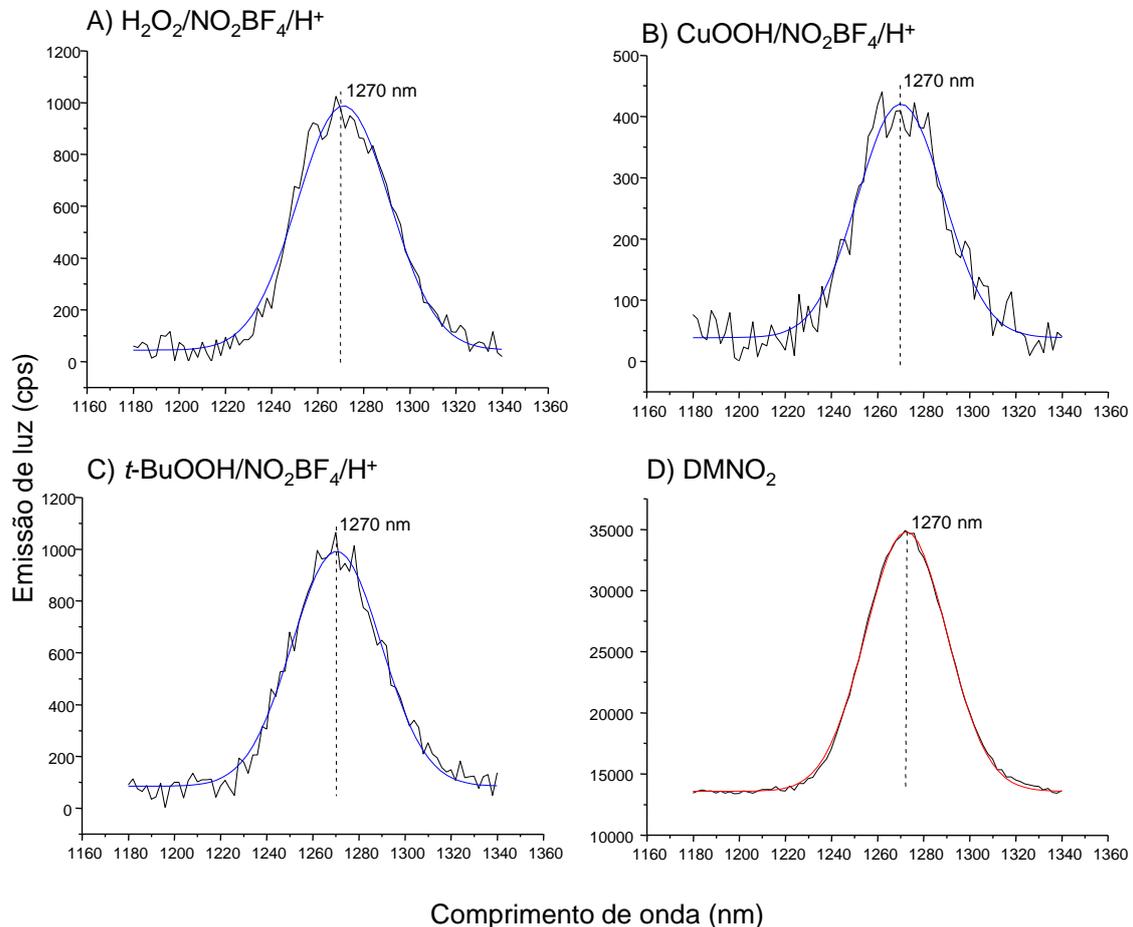


Figura 4.30. Espectro de emissão de luz no infravermelho para as reações entre (A) H_2O_2 e os hidroperóxidos de (B) CuOOH e (C) $t\text{-BuOOH}$, em meio acidificado, com NO_2BF_4 . Os espectros foram obtidos a partir da reação de 3 mL de uma solução 10 mM de H_2O_2 e dos hidroperóxidos orgânicos em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v), contendo 1 μL de HCl concentrado, com NO_2BF_4 . (D) O espectro de emissão de luz do DMNO_2 foi obtido pela termólise de uma solução 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1; v/v).

4.3.3 – Efeito da Azida nas Medidas de Emissão de Luz para Reação entre Hidroperóxidos de Lipídeos e NO_2BF_4

Com o objetivo adicional de verificar a formação de $^1\text{O}_2$, utilizou-se NaN_3 , um supressor físico de $^1\text{O}_2$, nas reações dos hidroperóxidos OAOOH, LAOOH e ChOOH. Para estes experimentos, foram injetados 200 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 em MeOH (concentração final de 1,56 mM) na reação entre OAOOH e NO_2BF_4 em MeOH, e 500 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 em MeOH (concentração final de 3,57 mM) para reação entre LAOOH e NO_2BF_4 em MeOH (Figura 4.31).

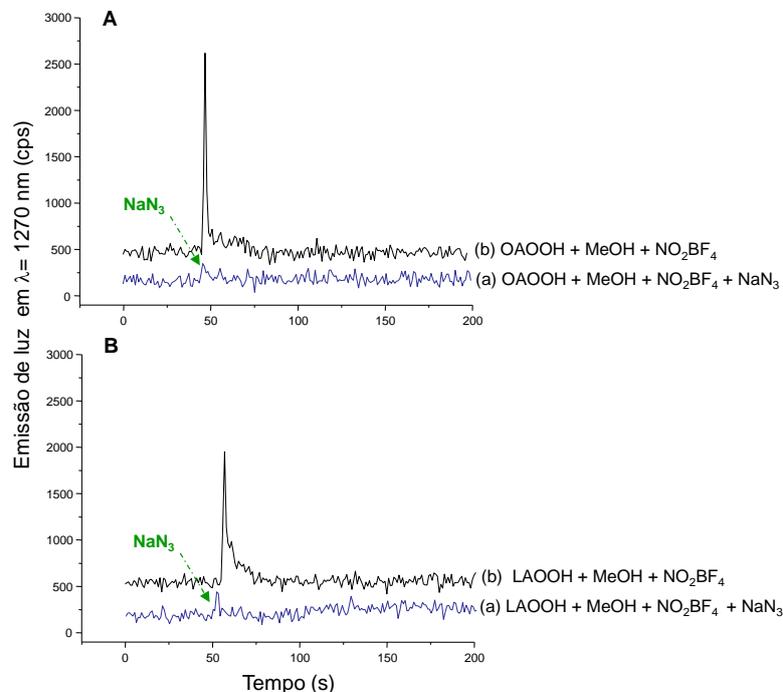


Figura 4.31. Emissão de luz em $\lambda = 1270 \text{ nm}$ para as reações entre os hidroperóxidos de lipídeos (A) OAOOH, (B) LAOOH e NO_2BF_4 . Para verificar o efeito de supressão de NaN_3 , preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM dos hidroperóxidos em MeOH e reagiu-se com NO_2BF_4 (a) na presença de NaN_3 e (b) sem NaN_3 . Para OAOOH foram injetados 200 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 (concentração final de 1,56 mM) e para LAOOH foram injetados 500 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 (concentração final de 3,57 mM).

O efeito de supressão produzido por NaN_3 também foi testado para os ChOOH . Para tanto, foram injetados 500 μL de uma solução 25 mM de NaN_3 na reação composta por uma solução de 3 mL de uma solução 10 mM de ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1) e NO_2BF_4 (Figura 4.32).

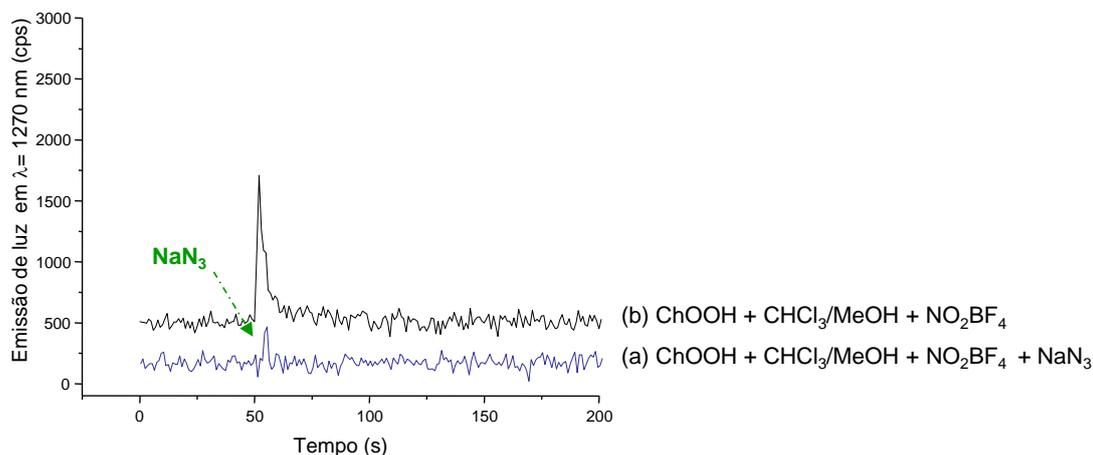


Figura 4.32. Emissão de luz em $\lambda = 1270 \text{ nm}$ para as reação entre os hidroperóxidos de lipídeos ChOOH e NO_2BF_4 . Para verificar o efeito de supressão produzido por NaN_3 , preparou-se 3 mL de uma solução 10 mM de ChOOH em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v) e reagiu-se com NO_2BF_4 (a) na presença de 500 μL de uma solução 25mM de NaN_3 (concentração total 3,57 mM) e (b) sem NaN_3 .

4.3.4 – Análise dos Produtos da Reação entre OAOOH e NO_2BF_4

Na busca de produtos que indicassem um mecanismo para formação de $^1\text{O}_2$, utilizamos a reação entre OAOOH e NO_2BF_4 como modelo para análise por espectrometria de massas, uma vez que o material de partida, o ácido oleico é mais barato que os demais, e se encontrava disponível para uso no laboratório. Na análise por ESI/MS foi encontrado um produto nitrado de m/z 359 $[(M - H) + H]^-$. Selecionando os fragmentos de m/z 359 encontrou-se o íon m/z 327 que corresponde a perda de O_2 $[(M - H) + H - \text{O}_2]^-$, o íon m/z 309 que representa a perda de O_2 e H_2O $[(M - H) + H - \text{O}_2 - \text{H}_2\text{O}]^-$, o íon m/z 295 refere-se a perda de

NO_2 e H_2O $[(\text{M} - \text{H}) + \text{H} - \text{NO}_2 - \text{H}_2\text{O}]^-$, e o íon m/z 277 corresponde a perda de H_2NO_3 e H_2O $[(\text{M} - \text{H}) + \text{H} - \text{H}_2\text{NO}_3 - \text{H}_2\text{O}]^-$ (Figura 4.33).

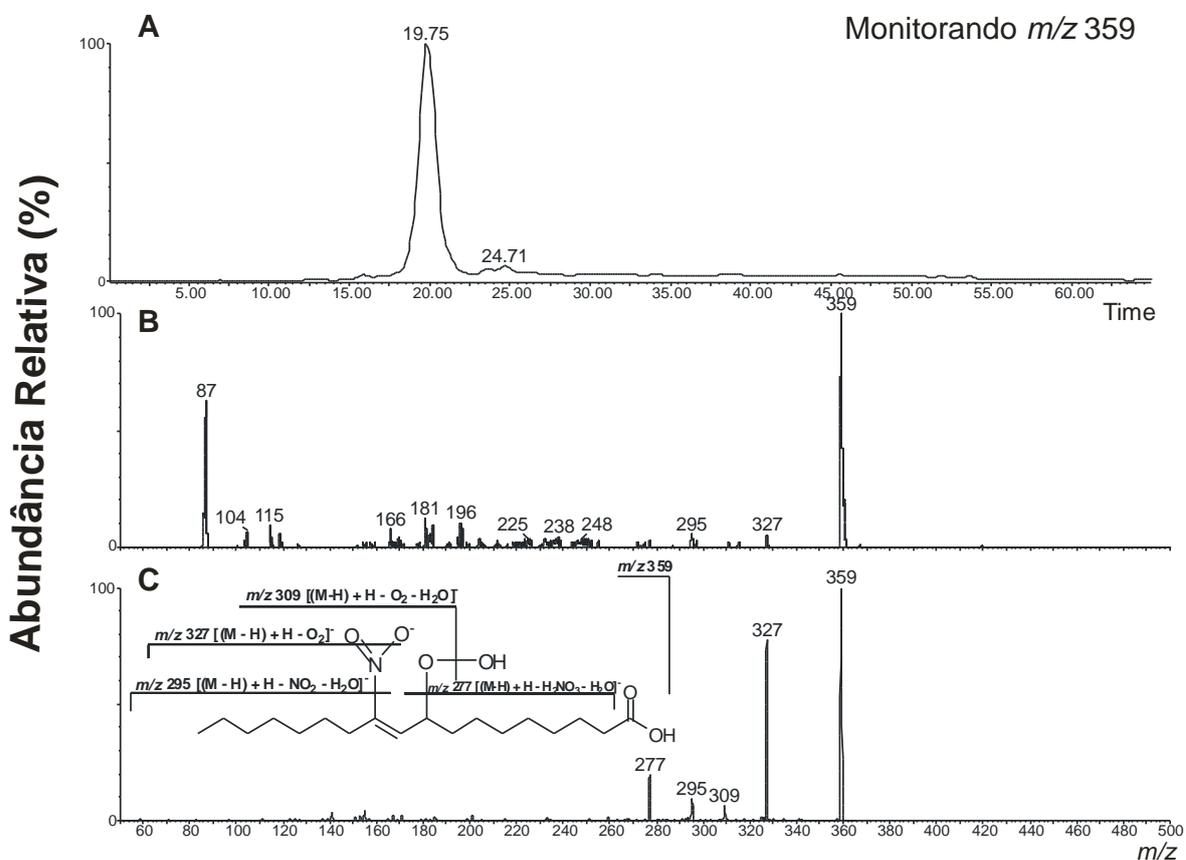


Figura 4.33. Análise por ESI/MS da reação de OAOOH e NO_2BF_4 . (A) cromatograma do monitoramento do íon m/z 359, (B) espectro de massa de m/z 50-500, (C) espectro de fragmentação do íon m/z 359 (representado para o isômero 9-OAOOH).

5 - Discussão

5.1 – Sínteses dos Endoperóxidos Derivados do Naftaleno

O emprego de endoperóxidos naftalênicos como fonte limpa de $^1\text{O}_2$ apresenta diversas vantagens quanto ao uso em sistemas químicos e principalmente biológicos. Ao sofrerem termólise em condições brandas, liberam $^1\text{O}_2$ em quantidades apreciáveis e o composto naftalênico correspondente. Dessa forma, são minimizados os efeitos de componentes tóxicos e oxidantes de outras fontes geradoras de $^1\text{O}_2$, além de serem compatíveis com as condições requeridas por tais sistemas (meio aquoso, temperaturas moderadas, pH neutro).

Os derivados naftalênicos podem reagir com $^1\text{O}_2$ por meio de uma reação de cicloadição [4+2]. Sabe-se que o naftaleno não reage com $^1\text{O}_2$, no entanto, a presença de grupos doadores de elétrons nas posições 1 e 4 do anel naftalênico contribuem para aumento da densidade eletrônica e, conseqüentemente, aumentam a reatividade frente ao $^1\text{O}_2$ de natureza eletrofílica. Funções orgânicas que podem aumentar a hidrofiliabilidade da molécula como álcool (-OH), sais de ácido carboxílico (-COO⁻ Na⁺), sulfonato (SO₃⁻ Na⁺), cloreto de amônio quaternários (-N(R)₃⁺Cl⁻) podem retirar elétrons fortemente do anel, e não devem ser ligadas diretamente a ele. Assim, é necessário fazer uma separação destas funções por grupos doadores de elétrons nas posições 1,4 do naftaleno. Por outro lado, o impedimento estérico dos grupos substituintes pode diminuir a reatividade do anel aromático em relação ao $^1\text{O}_2$. Outra característica importante para os substituintes do anel naftalênico é que eles devem ser inertes ao $^1\text{O}_2$ e as fontes utilizadas para geração desta espécie (Aubry *et al.*, 1996, Pierlot *et al.*, 2000, Martinez *et al.* 2000a).

Na preparação dos endoperóxidos dos derivados naftalênicos duas fontes primárias geradoras de $^1\text{O}_2$ são utilizadas: a reação de fotooxidação e o desproporcionamento de H_2O_2 catalisada pelo Na_2MoO_4 (Aubry *et al.*, 1989). A escolha do método depende das características físico-químicas do composto naftalênico. Assim, o desproporcionamento de H_2O_2 catalisada pelo molibdato é mais adequado para derivados de ácido carboxílico como o NDP, pois a recuperação do endoperóxido pode ser feita através da precipitação da forma ácida. A fotooxidação se dá pela irradiação de luz visível de uma solução do derivado naftalênico, em solvente deuterado preferencialmente, pois $^1\text{O}_2$ tem maior tempo de vida em tais solventes, na presença de um composto fotossensibilizador e oxigênio. A reação de fotooxidação deve ser realizada em baixas temperaturas devido à instabilidade térmica do endoperóxido nascente. Esse método é mais utilizado embora tenha algumas desvantagens como o tempo exigido para reação e a possibilidade de formação de produtos secundários (Pierlot *et al.*, 1996 e 2000).

Foram sintetizados três endoperóxidos hidrossolúveis a partir do composto comercial 1,4-dimetilnaftaleno: DHPNO₂, NDPO₂ (Martinez *et al.*, 2000b; Pierlot *et al.*, 2000; Dewilde *et al.*, 1998; Di Mascio e Sies, 1989) e NBTEO₂ (baseado no derivado naftalênico monocatiônico descrito por Pierlot *et al.*, 1996). A síntese destes três compostos tem o BBMN como intermediário chave. Na Figura 5.1, se encontram as reações utilizadas para preparação dos endoperóxidos a partir deste intermediário e de outro endoperóxido lipossolúvel, o DMNO₂.

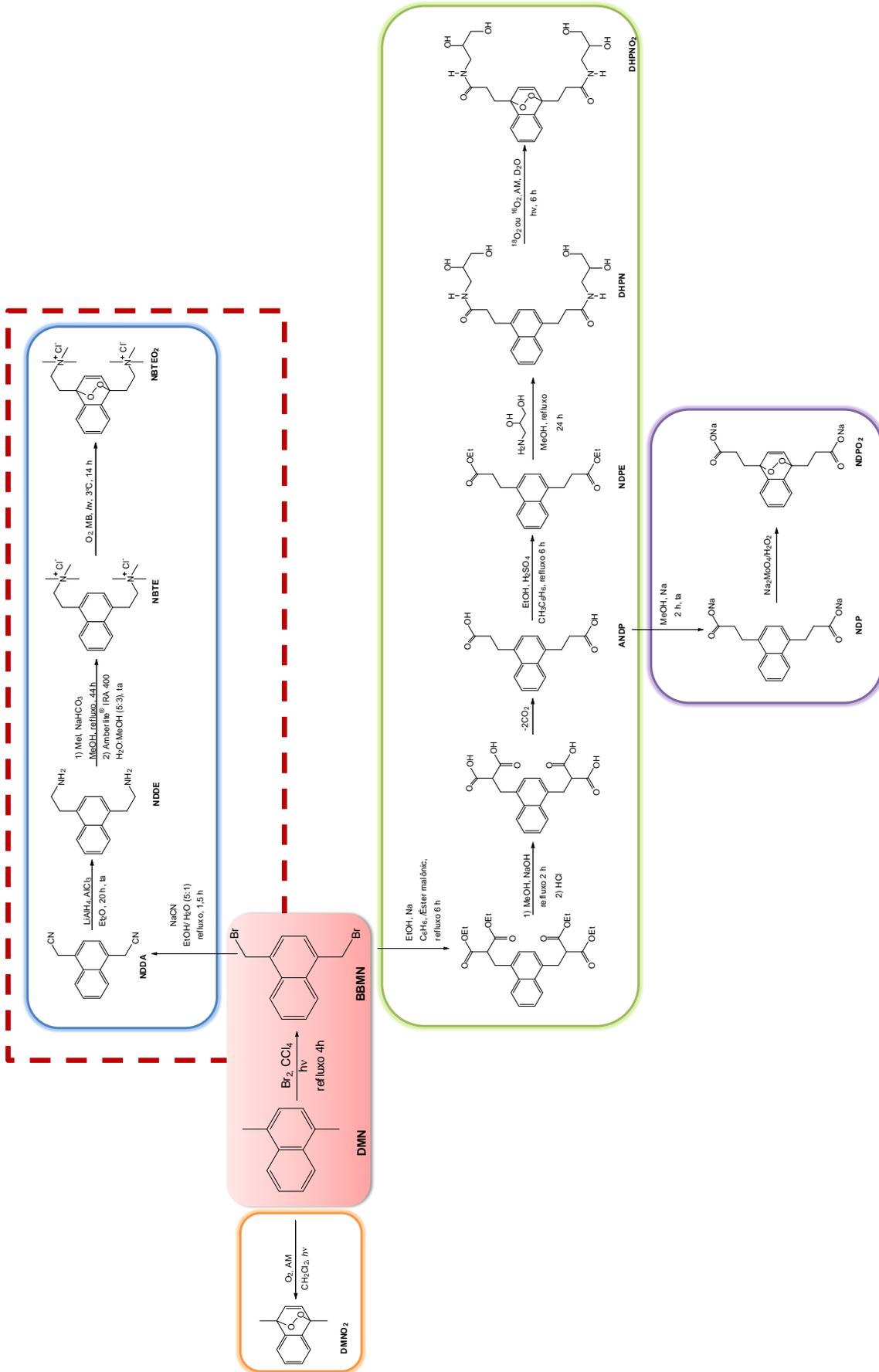


Figura 5.1. Preparação dos endoperóxidos derivados do naftaleno. As reações partem do composto comercial 1,4-dimetilnaftaleno e tem um intermediário, o BBMN (em vermelho), comum à síntese do DHPNO₂ (em verde), NDPEO₂ (em roxo) e NBTEO₂ (em azul). Diretamente do DMN se obtém o endoperóxido derivado DMNO₂ (em laranja).

O BBMN pode ser obtido através da substituição de um hidrogênio do grupo metila por um átomo de bromo, na cadeia lateral do DMN, por meio de uma reação de bromação radicalar. A etapa limitante da reação é justamente a formação do radical alquila que envolve o ataque do bromo radicalar ao grupo metila do DMN. O espectro de ^1H mostra que a reação foi eficiente, uma vez que os sinais e os deslocamentos químicos correspondem ao BBMN.

Na preparação do DHPNO₂ e NDPO₂, a obtenção do ácido dicarboxílico (ANDP) é essencial e foi conseguida através de uma síntese malônica, onde uma base forte (etóxido de sódio) é utilizada para retirar um hidrogênio ácido do malonato de etila formando um enolato. Este enolato pode então atacar o BBMN, no seu carbono eletrofílico, no caso o carbono da cadeia lateral, ao qual está ligado o átomo de bromo, formando um éster malônico substituído. A análise por RMN ^1H confirmou a eficiência da reação. A hidrólise básica do intermediário tetra-éster levou a formação de um tetra-ácido carboxílico correspondente, o qual foi mantido a 120°C, por aproximadamente 12 dias para descarboxilação completa.

A esterificação do ANDP forneceu o éster 3,3'-(1,4-nafitilideno)dipropanoato de etila, que foi submetido a uma reação de amidificação, resultando no composto DHPN, conforme demonstrado pela análise por RMN. O endoperóxido DHPNO₂ foi obtido por fotooxidação.

A preparação do NDP é relativamente simples e ocorre rapidamente em 2 horas. Nesta reação o sódio metálico em metanol forma metóxido de sódio ($\text{MeO}^- \text{Na}^+$), que retira um próton do ácido carboxílico, levando à formação do sal do ácido carboxílico (NDP). As análises do produto por RMN de ^1H e ^{13}C indicaram a

formação do produto. Para obtenção do NDPO₂ foi empregado o método de desproporcionamento do H₂O₂ por MoO₄²⁻.

A estratégia sintética utilizada para preparação de um novo derivado dicatiônico NBTE, partiu de uma reação de substituição nucleofílica dos átomos de bromo do composto BBMN pelo cianeto. A análise por RMN indicou a obtenção do produto substituído desejado, com bons rendimentos. Posteriormente, a redução do composto por LiAlH₄ e AlCl₃ forneceu a amina, conforme indicado por RMN de ¹H e ¹³C.

Para reação de quaternização da amina foram utilizadas duas estratégias diferentes, uma vez que a metodologia proposta por (Pierlot *et al.*, 1996), utiliza um reagente não mais comercialmente disponível, o dimetilsulfato (Me₂SO₄) como agente alquilante. O primeiro método utilizou uma base orgânica e o segundo uma base inorgânica para reagir com o ácido que se forma a medida que a reação se processa.

No primeiro método foi utilizado a trietilamina (Et₃N) como base, uma vez que é um reagente disponível e tem um pK_a relativamente alto (pK_a= 10,76). Em geral, para o uso de bases orgânicas em reações de alquilação, alguns requisitos devem ser avaliados como sua solubilidade no meio reacional, a sua basicidade, sendo que seu pK_a deve ser maior que aquele da amina a ser alquilada, além da sua velocidade da reação com o agente alquilante, que deve ser menor que o da amina reagente. O sal da base orgânica e o seu sal quaternário, produzidos secundariamente na reação, devem ser de fácil separação do produto desejado (Sommer e Jackson, 1970). A reação de quaternização por este método não foi tão eficiente, fornecendo apenas 5% do produto, mais subprodutos, ao final da substituição do contra-íon.

No segundo método, foi utilizado o NaHCO_3 como base em condições anidras para execução da reação (Avellar *et al.*, 2000). Embora a reação exija condições reacionais e de extração mais drásticas que no método anterior, como refluxo por longo período (44 horas), adições extras do agente alquilante (MeI) e extração a quente com solventes variados, o sal quaternário foi obtido com bom rendimento (58%). A análise por espectrometria de massas confirmou a formação do produto, que posteriormente foi fotossensibilizado com azul de metileno em D_2O para obtenção do endoperóxido NBTEO₂.

5.2 - Síntese dos Hidroperóxidos de Lipídeos

Os hidroperóxidos dos ácidos oleico e linoleico e do colesterol foram preparados por fotooxidação, sendo obtidos os isômeros correspondentes, conforme caracterização feita por espectrometria de massas e RMN.

Na fotossensibilização, três elementos são essenciais: oxigênio, luz em um comprimento de onda apropriado e um composto fotossensibilizador que tenha capacidade de absorver energia e transferi-la para o oxigênio molecular atingir seu estado excitado singlete. Os fotossensibilizadores empregados nas reações para síntese dos hidroperóxidos foram o azul de metileno, cuja faixa de absorção está entre 550-700 nm, e o rosa bengala que apresenta intensa absorção na faixa entre 450-580 nm. Estes compostos apresentam como características um estado triplete com energia suficiente para excitar o oxigênio no estado fundamental e um bom rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (azul de metileno $\Phi_{\Delta} = 0,52$ e rosa bengala $\Phi_{\Delta} = 0,76$, respectivamente) (Kochevar e Redmond, 2000; DeRosa e Crutchely, 2002).

A absorção de fótons de luz pelo fotossensibilizador (FS) promove a sua conversão ao estado excitado singlete (FS^{1*}), que rapidamente passa ao estado

excitado triplete através de um cruzamento intersistemas. A partir daí, há dois destinos possíveis para o fotossensibilizador no estado FS^{3*} . No mecanismo tipo I, ele pode receber elétrons ou de prótons do substrato (S), formando espécies radicalares. No mecanismo tipo II, ele pode transferir energia para oxigênio, levando a formação de 1O_2 (Foote, 1991).

O 1O_2 gerado pode então reagir diretamente com as ligações duplas presentes nos ácidos oleico e linoleico e no colesterol por uma reação tipo ene, produzindo os hidroperóxidos. Contudo, hidroperóxidos também podem ser formados através do mecanismo tipo I, com a produção de radicais lipídicos. Alguns fatores como a natureza e a concentração do fotossensibilizador, as concentrações do oxigênio e do substrato no meio reacional vão influenciar no tipo de mecanismo que irá prevalecer (Foote, 1968)

A velocidade de reação de 1O_2 com os ácidos oleico, linoleico, linolênico e araquidônico foi determinada como 0,74, 1,3, 1,9 e 2,4 $\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$, respectivamente, sendo proporcional ao número de ligações duplas (Doleiden *et al.*, 1974). Outro fato importante é que os hidroperóxidos produzidos pela reação com 1O_2 tem a mesma posição das ligações duplas sem ocorrência de migrações (Min e Boff, 2002).

5.3 - Geração de Oxigênio Singlete na Reação entre os Hidroperóxidos de Lipídeos e NO_2BF_4

A luminescência é uma forma de dissipação de energia e é definida como emissão da radiação eletromagnética, por moléculas, de comprimentos de onda que vão do ultravioleta ao infravermelho no espectro eletromagnético. Essas radiações são fruto da transição e um estado eletronicamente excitado para um estado de energia mais baixa (Santos *et al.*, 1993).

Em sistemas biológicos há diversas reações que emitem luz, denominando-se este fenômeno como quimiluminescência. Nestas reações, a energia excedente de uma molécula em um estado eletrônico singlete ou triplete, é dissipada na forma de luz fraca (radiação eletromagnética) ao retornar ao estado fundamental (Cilento e Adams, 1995, Medeiros *et al.*, 1995, Santos *et al.*, 1993).

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie excitada, este pode decair para o estado fundamental com emissão de luz, por duas maneiras conhecidas como decaimento bimolecular (com bandas de emissão intensa em 634 nm e 703 nm) e monomolecular (emissão de luz no infravermelho próximo centrada em $\lambda = 1270$ nm) (Khan e Kasha, 1963; Browne e Ogryzlo, 1964).

Os estudos realizados das medidas de emissão de luz no infravermelho próximo em $\lambda = 1270$ nm indicaram que a emissão de luz é característica da geração de $^1\text{O}_2$, pelas reações entre os hidroperóxidos de lipídeos e orgânicos e o NO_2BF_4 , uma vez que nas reações controle realizadas não foi observada emissão de luz. A prova inequívoca da geração de $^1\text{O}_2$ foi obtida através da aquisição de espectros de emissão de luz destas reações, onde o máximo de emissão ocorreu em 1270 nm.

Inicialmente, a reação entre OAOOH e NO_2BF_4 foi testada em MeOH, CHCl_3 , MeCN e uma mistura de solventes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção de 4:1 (v/v). O tempo de meia-vida de $^1\text{O}_2$ é dependente do solvente, uma vez que a energia de excitação de $^1\text{O}_2$ é transformada em energia vibracional das moléculas de solvente. Assim, solventes que possuem ligações C-H e O-H, como MeOH, são capazes de desativar $^1\text{O}_2$ mais efetivamente (Merkel e Kearns). Por este motivo, verifica-se a existência de uma diferença no tempo de emissão de luz nas reações realizadas, com CHCl_3 apresentando maior tempo para o decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$, se comparados as reações conduzidas em MeOH e MeCN. No entanto, foi a mistura de solventes que se apresentou mais adequada para condução das reações, já que todo NO_2BF_4 foi dissolvido, proporcionando uma melhor interação entre os reagentes.

Uma explicação para formação de $^1\text{O}_2$ para as reações dos hidroperóxidos de lipídeos é apresentada na Figura 5.3. Inicialmente, há o ataque eletrofílico do íon nitrônio ao hidroperóxido, com conseqüente formação de um intermediário nitrado. Com a saída de um próton, há formação de um composto alquil peroxinitrato (ROONO_2) e HBF_4 . O composto ROONO_2 pode sofrer homólise produzindo duas espécies radiculares: um radical peroxila (ROO^\bullet) e um radical nitrito (NO_2^\bullet) (Goldstein e Merényi, 2004). Os radicais ROO^\bullet podem combinar-se, formando um intermediário tetraóxido, o qual por sua vez pode se decompor através de uma mecanismo concertado, produzindo uma cetona, um álcool e $^1\text{O}_2$ (Russell, 1957).

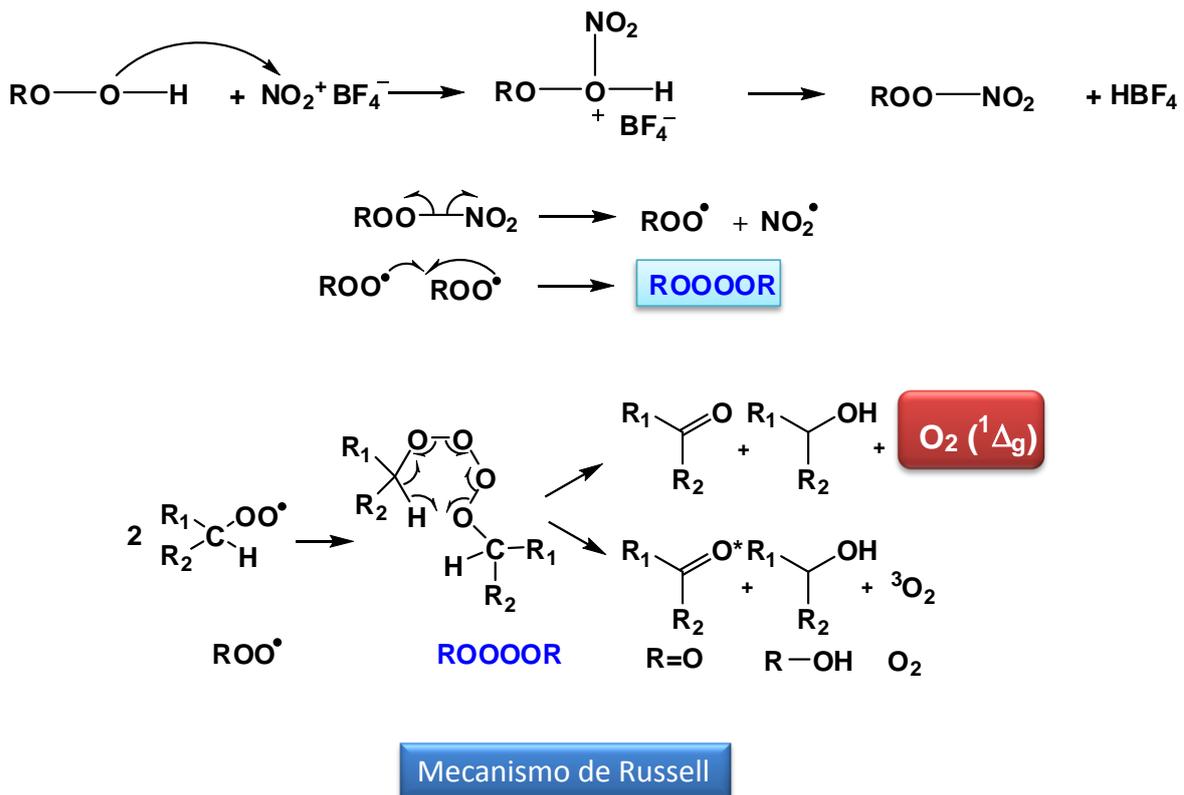


Figura 5.2. Mecanismo proposto para formação de $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre os hidroperóxidos de lipídeos e NO_2BF_4 .

Para propor um mecanismo baseado em evidências concretas, foi realizada a análise por espectrometria de massas da reação entre OAOOH e NO_2BF_4 . Em princípio, seria esperado encontrar os produtos oriundos do mecanismo proposto por Russell (1957), a cetona e o álcool derivados de OAOOH. No entanto, no espectro de massas nenhum produto com massas características desses produtos foi detectado. Este fato pode ser explicado pelo baixo rendimento estimado de $^1\text{O}_2$ (menor que 1%) das reações entre as reações dos hidroperóxidos com NO_2BF_4 , comparando-se com o padrão DMNO_2 . Uma informação importante, que pode ser observada no espectro de massas é a formação de um íon m/z 359, que condiz com a formação de um produto nitrado. Na Figura 5.3 é mostrada uma proposta para formação deste produto, com o

ataque eletrofílico do íon nitrônio à ligação dupla do hidroperóxido, com adição do íon nitrônio e restauração da ligação dupla (Figura 5.3).

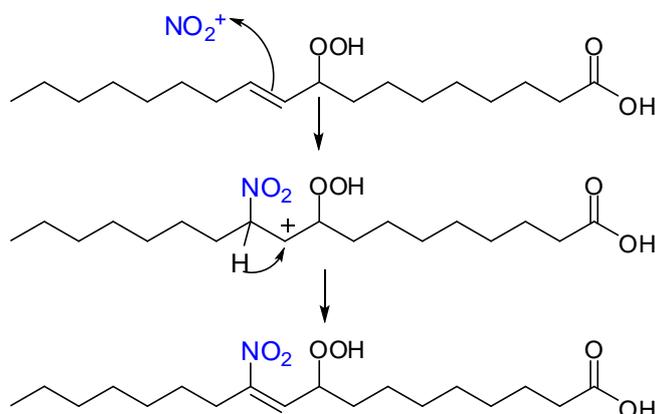
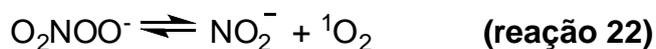
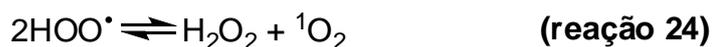
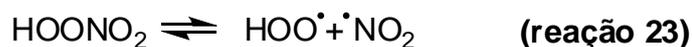


Figura 5.3. Mecanismo proposto para formação do produto nitrado de *m/z* 359 (representado para o isômero 9-OA-OH).

A geração de $^1\text{O}_2$ também foi verificada na reação de H_2O_2 com NO_2BF_4 . O ácido peroxinítrico (HOONO_2) é formado nesta reação (reação 20). Um estudo sobre a termodecomposição de HOONO_2 indicou que este pode se decompor em O_2 e NO_2^- . Entretanto, um mecanismo radicalar também deve ter contribuição importante (Kenley *et al.*, 1981). Cálculos termodinâmicos e cinéticos sugerem que O_2NOO^- pode se decompor em nitrito e oxigênio molecular no estado singlete excitado (Goldstein *et al.*, 1998, Olson *et al.*, 2003). Assim, o HOONO_2 pode se decompor por processo polar ou iônico, com produção de NO_2^- e $^1\text{O}_2$, conforme apresentado nas reações 21 e 22, respectivamente:



No mecanismo por via radicalar ocorre hólise de HOONO_2 , gerando um radical hidropoxila (HOO^\bullet) (reação 23). O radical HOO^\bullet pode se combinar com outro radical idêntico, formando H_2O_2 e $^1\text{O}_2$ (reação 24) (Kenley *et al.*, 1981, Lammel *et al.*, 1990).



As reações dos hidropéroxidos orgânicos terciários, CuOOH e $t\text{-BuOOH}$, com NO_2BF_4 produziram $^1\text{O}_2$, conforme cinética e espectro de emissão adquiridos para o decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$. O mecanismo de Russell (1957) é aplicável apenas para hidropéroxidos primários e secundários, os quais possuem hidrogênio ligado ao carbono α . Um estudo sobre a geração de $^1\text{O}_2$ a partir de radicais alquil peroxila, obtidos pela reação entre hidropéroxidos orgânicos terciários em uma solução hidroclicrica de nitrato cérico de amônio, utilizando medidas de emissão de luz no infravermelho próximo, observou que $^1\text{O}_2$ é produzido pelos radicais cumil peroxila (CuOO^\bullet) e t -butil peroxila ($t\text{-BuOO}^\bullet$) (Kanofsky, 1986). Estes dados estariam de acordo com um estudo prévio sobre as reações do $t\text{-BuOO}^\bullet$ e sua cinética, utilizando técnicas de ESR (electron spin resonance), onde foi sugerida a formação de um intermediário tetróxido pela combinação dos radicais peroxila e sua decomposição levando à formação de um peróxido e $^1\text{O}_2$ (Thomas, 1965). Além disso, poderia haver a formação de carbonila triplete, que por transferência de energia ao O_2 molecular, também geraria $^1\text{O}_2$ (Figura 5.4, exemplificado para $t\text{-BuOOH}$).

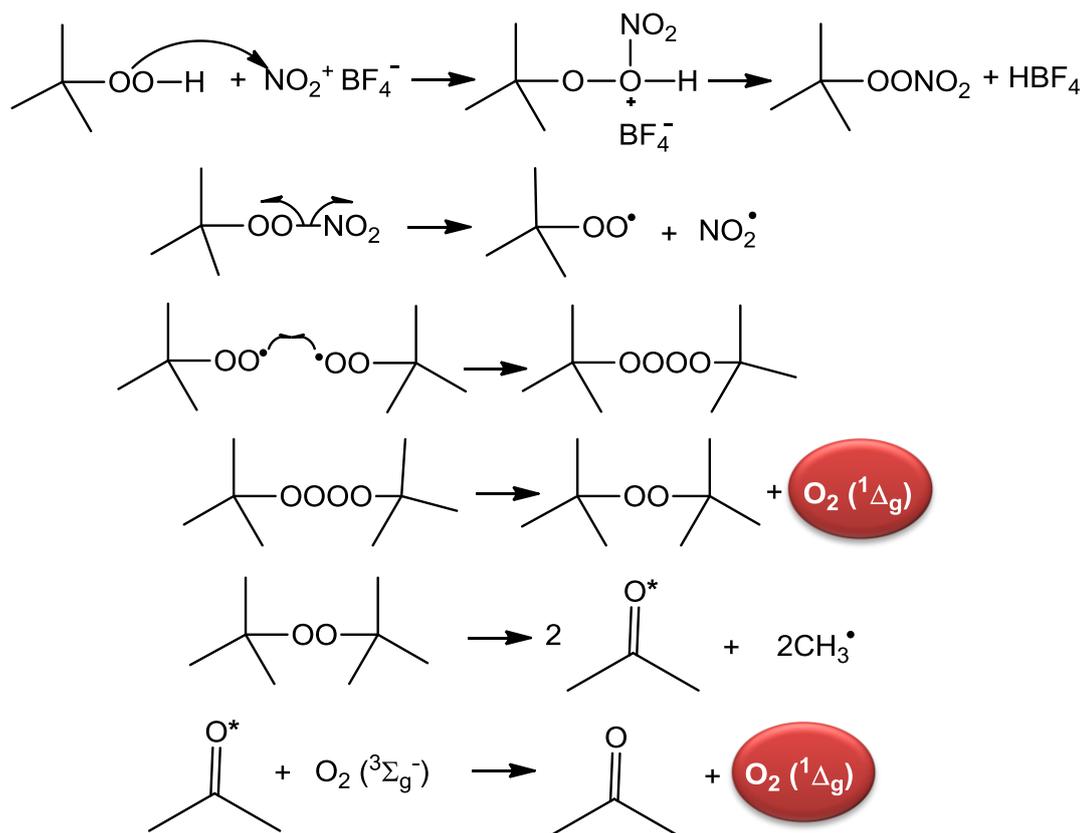


Figura 5.4. Mecanismo proposto para geração de $^1\text{O}_2$ na reação entre os hidroperóxidos terciários e NO_2BF_4 (exemplificado para $t\text{-BuOOH}$).

Em meio acidificado, ocorreu um aumento aparente na geração de $^1\text{O}_2$, que foi verificado por meio de medidas de emissão do decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$ e da aquisição de espectros de emissão. Sabe-se que em meio ácido pode ocorrer o aumento da reatividade de eletrófilos (como o íon NO_2^+), o que originou o termo “super-eletrófilo”. Quando um eletrófilo catiônico interage com um ácido de Brønsted ou um ácido de Lewis, pode ocorrer uma protonação total ou parcial do par de elétrons não ligante do oxigênio, provocando uma ativação do eletrófilo (Figura 5.5) (Olah *et al.*, 1975, Klump, 2009).

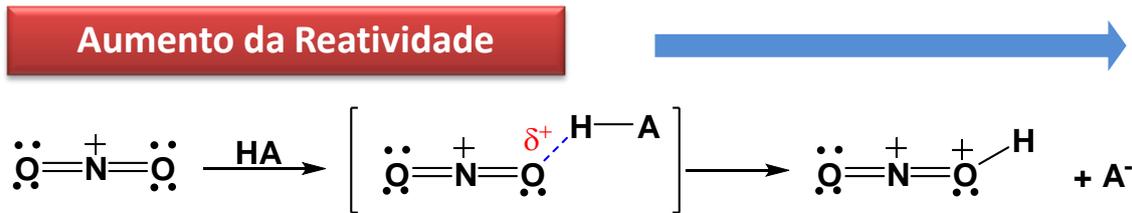


Figura 5.5. Formação do “super eletrófilo” NO_2^+ (Adaptado de Klump, 2009).

Quando o meio é acidificado, uma combinação de mecanismos pode contribuir para geração de $^1\text{O}_2$. Deste modo, pode ocorrer uma protonação do hidroperóxido, com formação do íon alcóxila e água (caminho a), ou formação de um íon alquila e H_2O_2 (caminho b). O H_2O_2 pode reagir com NO_2^+ e formar HOONO_2 , o qual poderá se decompor e gerar $^1\text{O}_2$ por um mecanismo iônico ou radicalar, conforme discutido anteriormente (Kenley *et al.*, 1981, Lammel *et al.*, 1990, Goldstein *et al.*, 1998, Olson *et al.*, 2003). O ácido clorídrico adicionado ao meio reacional, também pode ativar o eletrófilo diretamente, ou pode reagir com NO_2BF_4 , produzindo o superácido ácido tetrafluorbórico (HBF_4) (Olah *et al.*, 1974). Ademais, como já discutido, pode ocorrer à formação de um alquil peroxinitrato a partir da reação do hidroperóxido com NO_2^+ , e consequente formação de um intermediário tetraóxido, cuja decomposição pode gerar $^1\text{O}_2$ via mecanismo de Russell (hidroperóxidos de lipídeos), ou como observado por Thomas (1965) e Kanofsky (1986) para hidroperóxidos terciários. Alternativamente, poderia ocorrer uma protonação no composto alquil peroxinitrato (ROONO_2), com formação de um carbocátion (R^+) e produção de HOONO_2 , que por decomposição levaria a formação de $^1\text{O}_2$. Na Figura 5.6 estão resumidos estes mecanismos.

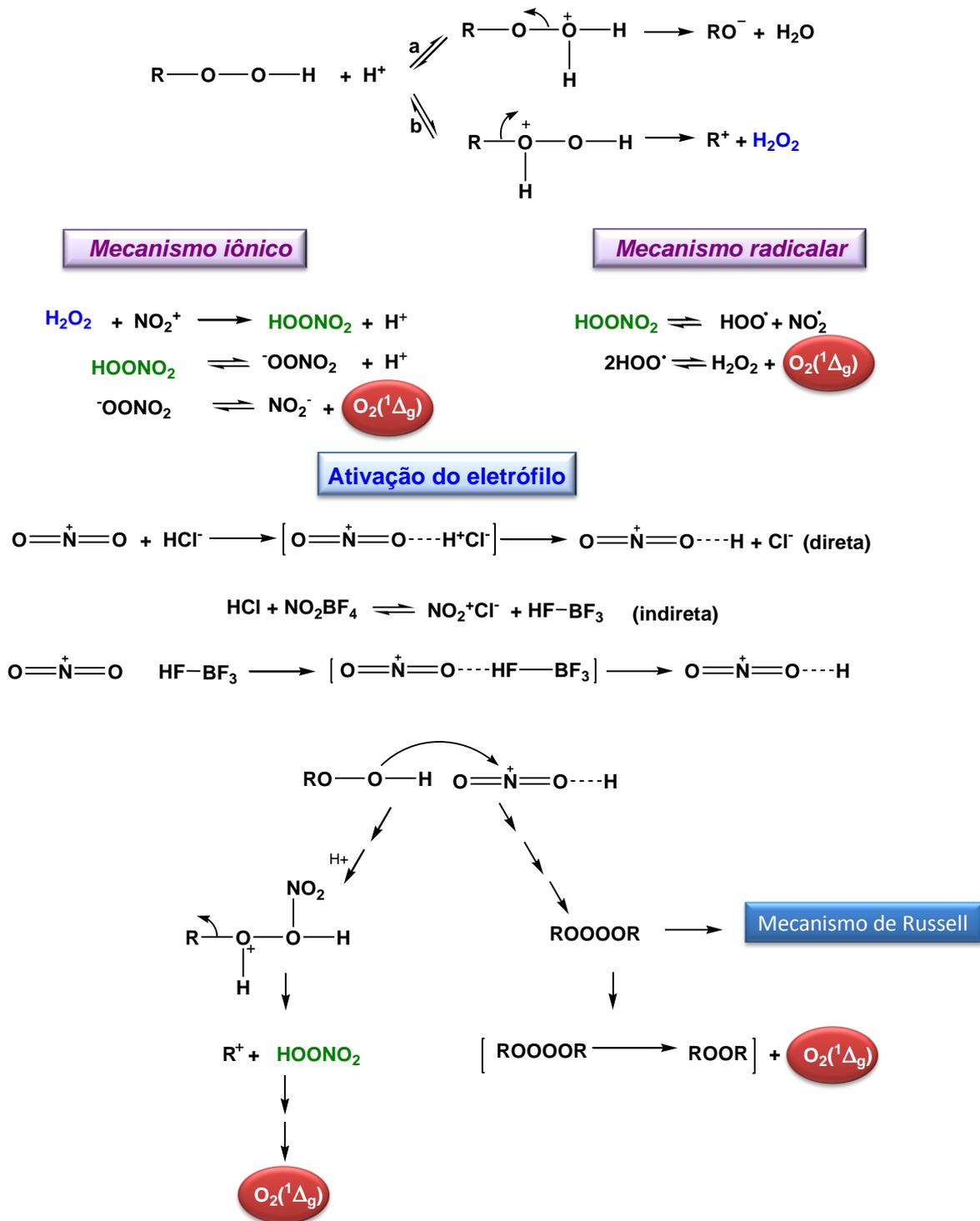


Figura 5.6. Propostas para formação de 1O_2 gerado na reação entre os hidroperóxidos e NO_2BF_4 em meio acidificado.

Adicionalmente, para auxiliar na caracterização da geração de 1O_2 nas reações entre os hidroperóxidos de lipídeos e NO_2^+ , foi utilizado NaN_3 , um supressor físico de 1O_2 . Este supressor atua pelo mecanismo de transferência de

carga, com formação de um complexo de transferência de carga entre $^1\text{O}_2$ e supressor, e com liberação de O_2 molecular no estado triplete ao final do processo (Lissi *et al.*, 1993).

Pela natureza eletrofílica do íon nitrônio (NO_2^+), o uso de outra técnica indireta, a captação de $^1\text{O}_2$ por derivados antracênicos não pode confirmar a geração de $^1\text{O}_2$ pelo sistema reacional $\text{ROOH}/\text{NO}_2\text{BF}_4$, uma vez que há prevalência da reação de nitração, em relação à formação do endoperóxido.

6 – Conclusão

Os endoperóxidos derivados do naftaleno obtidos são apropriados para estudos tanto em sistemas químicos como biológicos. A rota sintética para DHPNO₂ e NDPO₂ encontra-se consolidada na literatura e, portanto, sua síntese não apresenta grandes dificuldades. Contudo, a preparação do novo endoperóxido naftalênico dicatiônico NBTEO₂ apresentou alguns desafios a serem superados, como a reação de quaternização do derivado naftalênico diamina e a reação de fotooxidação. Este endoperóxido tem especificamente um potencial uso no estudo de danos ao DNA mitocondrial provocado por ¹O₂.

A geração de ¹O₂ pelas reações entre hidroperóxidos de lipídeos e hidroperóxidos orgânicos com NO₂BF₄ foi confirmada por técnicas experimentais de detecção direta (emissão de luz em $\lambda = 1270$ nm) e por um método indireto através do uso do supressor físico. Estes resultados, embora tenham um enfoque químico, adicionam informações importantes sobre a peroxidação lipídica mediada por ERN. Assim, o ¹O₂ poderia ser gerado como um subproduto da peroxidação lipídica em condições onde ERN interagem com hidroperóxidos lipídicos, contribuindo para disseminação de modificações ou danos oxidativos causados por este complexo evento, com possíveis implicações fisiológicas ou patofisiológicas.

7 – Perspectivas

A preparação do endoperóxido naftalênico dicatiônico NBTEO₂ precisa ser otimizada quanto aos rendimentos. Posteriormente, estudos *in vitro* com biomoléculas como DNA e *in vivo* com mitocôndrias isoladas podem ser realizados com NBTEO₂.

Estudos sobre o mecanismo de geração do ¹O₂ pela reação de hidroperóxidos de lipídeos com o íon nitrônio podem ser estendidos a outros hidroperóxidos de importância biológica, ou ainda, ser investigada a reatividade de cada isômero isolado dos hidroperóxidos incluído derivados do ácido araquidônico.

Referências

- Amarego, W.L.F., Chai, C.L.L. **2003**. Purification of laboratory chemicals, 5th ed. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Ashan, H., Ali, A., Ali, R. **2003**. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 398-404.
- Aubry, J. Cazin, B., Duprat. F. **1989**. Chemical sources of singlet oxygen. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with the hydrogen peroxide molybdate system. *J. Org. Chem.* 54, 726-728
- Aubry, J.M., Pierlot, C., Rigaudy, J., Schmidt, R. **2003**. Reversible binding of oxygen to aromatic compounds. *Acc. Chem. Res.* 36, 668-675.
- Avellar, I.G.J., Godoy, K., Magalhães, G.C. **2000**. New quaternary ammonium salts derived from cardanol and their use as phase transfer catalyst. *J. Braz. Chem. Soc.* 11, 22-26.
- Bartlett, P.D., Schaap, A.P. **1970**. Stereospecific formation of 1,2-dioxetanes from cis and trans-diethoxyethylenes by singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3223-3225.
- Bartlett, P.D., Landis, M.E. **1979**. The 1,2-Dioxetanos, in singlet Oxygen, Wasserman, H.H., Murray, R.W., Eds, Academic Press, New York, 244-286.
- Beckwith, A.L.J., Davies, A.G., Davison, I.G.E., Maccoll, A., Mruzek, M.H. **1989**. The mechanism of the rearrangement of allylic hydroperoxides: 5 α -hydroperoxy-3 β -hydrocholest-6-ene and 7 α -hydroperoxy-3 β -hydrocholest-5-ene, *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, 815-824.

- Buege, J.A., Aust, S.D. **1978**. Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52, 302-310.
- Brash, A.R. **1999**. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682.
- Briviba, K, Saha-Moller, C.R., Adam, W., Sies, H **1996**. Formation of singlet oxygen in the thermal decomposition of 3-hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane, a chemical source of triplet-excited ketones. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, 647-651.
- Browne, R.J., Ogrylo, E.A. **1964**. Chemiluminescence from reaction of chlorine with aqueous hydrogen peroxide, *P. Chem. Soc. London*, 117.
- Cadenas, E. **1989**. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 79-10
- Cadet, J., Di Mascio, P. **2006**. Peroxydes in biological systems. In: *The chemistry of peroxides*. Org. Z. Rapport, 1ed, London: Wiley & Sons, v.2, 915-999.
- Cilento, G., Adams, W. **1995**. From free radicals to electronically excited species. *Free Rad. Biol. Med.* 19, 103-114.
- Cui, T., Schopfer, F.J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, P.R.S., Batthyany, C., Chacko, B.K., Feng, X., Patel, R.P., Agarwal, A., Freeman, B.A. and Chen, Y.E **2006**. Nitrated fatty acids: endogenous anti-inflammatory signaling mediators, *J. Biol. Chem.* 281, 35686-35698.
- Davies, A.G., Davison, G.E. **1989**. The rearrangements of allylic hydroperoxides derived from (+) α -valencene, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II*, 825-830.
- DeRosa, M.C., Crutchley, R.J. **2002**. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem.* 233-234, 351-371.

- Dewilde, A., Pellieux, C., Pierlot, C., Wattré, P., Aubry, J.M., **1998**. Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperóxido. *Biol. Chem.* 379, 1377.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. **1989**. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys.* 274, 532-538.
- Di Mascio, P., Sies, H., **1989**. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylidene) dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2909-2914.
- Di Mascio, Catalani, L.H., Bechara, E.J.H. **1992**. Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipoperoxidation? *Free Rad. Biol. Med.* 12,471-478.
- Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Catalani, L.H. **1995**. Singlet molecular oxygen: generation, reactivity, identification and biological effects. *Ciência e Cultura* 47, 297-311.
- Doleiden, F.H., Farenholtz, S.R., Lamola, A.A., Trozzolo, A.M. **1974**. Reactivity of cholesterol and some fatty acids toward singlet oxygen. *Photochem. Phothobiol.* 20, 519-521.
- Esterbauer, H., Shaur, J.S., Zollner, H., **1991**. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11, 81-128.
- Esterbauer, H., **1993**. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation-products. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (suppl), 779S-786S.
- Frankel, E.N., **1991**. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food. Agr.* 54, 495-511.

- Freeman, B.A, Baker, P.R.S., Schopfer, F.J., Woodcok, S.R., Napolitano A., d'Ischia, M. **2008**. Nitro-fatty acid formation and signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 15515-15519.
- Fridovich, I **1978**. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide -dismutases provide an important defense. *Science* 201, 875-880.
- Fukuto, J.M., Cho, J.Y., Switzer, C.H. **2000**. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: *Nitric Oxide Biology and Pathobiology*. L. Ignarro, editor. Academic Press, San Diego, p. 23-40.
- Foote, C.S. **1968**. Photosensitized Oxygenations and the Role of Singlet Oxygen. *Accounts Chem. Res.* 1, 104-110.
- Foote, C.S. **1991**. Definition of type I and II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659.
- Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J.; Merényi, G. **1998**. Mechanism of decomposition of peroxyxynitric ion (O_2NOO^-). Evidence for the formation of $O_2^{\bullet-}$ and $^{\bullet}NO_2$ radicals. *Inorg. Chem.* 37, 3943-3947.
- Gallon, A.A., Pryor, W.A. **1993**. The identification of allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate by negative chemical ionization mass spectroscopy. *Lipids* 28, 125-133.
- Gallon, A.A., Pryor, W.A. **1994**. The reaction of low levels of nitrogen dioxide with methyl linoleate in the presence and absence of oxygen. *Lipids* 29, 171-176.
- Gilbert, A., Baggott, J. **1991**. Photo-oxygenation reactions, In *Essentials of molecular photochemistry*, Blackwell Scientific Publications.

- Girotti, A.W., **1985**. Mechanism of lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 1, 87-95.
- Korytowski, W., Girotti, A.W., **1999**. Singlet oxygen adducts of cholesterol: photogeneration and reductive turnover in membrane system. *Photochem. Photobiol.* 70, 484-489.
- Goldstein, S., Lind, J., Merényi, G. **2004**. Reaction of organic peroxy radicals with $\cdot\text{NO}_2$ and $\cdot\text{NO}$ in aqueous solution: intermediacy of organic peroxyxynitrate and peroxyxynitrite species. *J. Phys.Chem. A.* 108, 1719-1725.
- Halliwell, G. **2006**. Reactive species and antioxidants **2006**. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312-322.
- Halliwell, G., Gutteridge, J.M.C., **2007**. Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed., Oxford University Press, Inc., New York.
- Hasegawa, K., Patterson, L.K., **1978**. Pulse radiolysis studies in model lipid system: formation and behavior of peroxy radicals in fatty acids. *Photochem. Photobiol.* 28, 817–823
- Held, A.M.; Halko, D.J.; Hurst J.K. **1978** Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5732-5740.
- Hoog, N., Kalyanaraman, B. **1999**. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 378-384.
- Ji, L.L. **1999**. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Proc. Soc Exp. Biol. Med.* 222, 283-292.
- Kajiwara, T., Kearns, D.R. **1973**. Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5886.

- Kalyanaraman, B. **2013**. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* 1, 244-257.
- Kanofsky, J.R. Wright, J., Miles-Richardson, E , Tauber, A.I. **1984**. Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *J. Clin. Invest.* 74, 1489-1495.
- Kanofsky, J.R. **1986**. Singlet oxygen production from the reaction of alkylperoxy radicals. Evidence from 1268 nm chemiluminescence. *J. Org. Chem.* 51, 3386-3388.
- Kanofsky, J.R. **1989**. Singlet oxygen production by biological systems. *Chem. Biol. Interactions* 70, 1-28.
- Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K, Volger, O.L, Leinonen, H., Kivela, A. M., Häkkinen S-K., Woodcock, S.R, Schopfer, F.J., Horrevoets, A.J., Yla-Herttuala, S., Freeman, B.A., Levonen, A.-L. **2009**. Nrf2-dependent and-independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 284, 33233-33241.
- Kearns, D.R. **1971**. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chem. Rev.* 71, 395-427.
- Kenley, R.A., Trevor P.L., Lan, B. Y. **1981** . Preparation and thermal decomposition of pernitric acid (HOONO₂) in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2203- 2206.
- Khan, A.U.; Kasha, M. **1963**. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 39, 2105.
- Klumpp, D.A. **2009**. Superreletofiles in heterocycles ring-forming reactions. *Arkivoc* 63-80.

- Kochevar, I.E.; Redmond, R.W. **2000**. Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 319, 20-28.
- Kühn, H. Wiesner, R., Lankin, V.Z., Nekraso, A., Alder, L., Schewe, T. **1987**. Analysis of the stereochemistry of lipoxygenase-derived hydroperoxy fatty acids by means of chiral phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 160, 24.
- Kühn, H., Borchert, A. **2002**. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 154-172.
- Kulig, M.J., Smith, L. **1973**. Sterol metabolism. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *J. Org. Chem.* 38, 3639-3642.
- Landino, L.M., Crews, B.C., Gierse, J.K., Hauser, S.D., Marnett, L.J. **1997**. Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction and cyclooxygenase activation. *J. Biol. Chem.* 272, 21565-21574.
- Lammel, G., Perner, D., Warneck, P., **1990**. Decomposition of pernitric acid in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 94, 6141-6144.
- Lissi E.A., Encinas, M.V., Lemp, E., Rubio, M.A. **1993**. Singlet Oxygen $O_2 (^1\Delta_g)$ bimolecular process. Solvent and compartmentalization effects. *Chem. Rev.* 93, 699-723.
- Mac Millan, D. K., Murphy, R.C. **1995**. Analysis of lipid hydroperoxides and long-chain conjugated keto acids by negative ion electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6, 1190-1201.

- Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. **2000a**. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Quim. Nova* 23, 686-689.
- Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P. **2000b**. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ^{18}O -labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 10212-10213.
- McKeown, E., Waters, W.A.J. **1966**. The oxidation of organic compounds by "singlet" oxygen. *Chem. Soc. B*, 1040-1046
- Medeiros, M.H.G; Baptista, R.C., Di Mascio, P. **1995**. Quimiluminêscencia Fraca em Sistemas Biológicos. *Rev. Ciênc. Farm.* 16, 23-35.
- Merkel, P.B., Kearns, D.R **1972**. Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic to vibrational energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 7244-7253.
- Min, D., Boff, J.M. **2002**. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev Food Sci. Food Safety* 1, 58-72.
- Minami, Y., Yokoyama, K., Bando, N. ,Kawai Y., Terao, J. **2008**. Ocurrência de singlet oxygen oxygenation of oleic acid and linoleic acid in the skin of live mice. *Free Rad. Res.* 42, 197-204.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., **2003a**. Direct evidence of singlet molecular oxygen [$\text{O}_2(^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxid with peroxyxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4510-4517.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., **2003b**. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6172-6179.

- Miyamoto, S., **2005**. Hidroperóxidos de lipídicos como fonte biológica de oxigênio singlete: estudos com marcação isotópica, espectrometria de massa e luminescência. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Miyamoto, S. Ronsein, G.E., Corrêa, T.C., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. **2009**. Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxyxynitrate, a decomposition product of peroxyxynitrite. *Dalton Trans.*, 5720-5729.
- Moan, J., Berger, K. **1991**. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the life time of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53, 549-553.
- Monroe, B.M. **1985**. Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constant, In Singlet O₂, Frimer, A.A., Ed., CRC Press, Boca Raton, Vol.1.
- Murray, R.W., Kaplan, M.L. **1968**. Singlet oxygen sources in ozone chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 537-538.
- Müller, K., Ziereis, K. **1990**. Naphthalenes as water-soluble singlet oxygen carriers and detectors: hydrophobic and kinetic properties. *Arch. Pharm (Weinheim)* 325, 219-223.
- Naqui, A, Chance, B., Cadenas, E. **1986**. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 137-166.
- Nieuwint, A.W.M., Aubry, J.M., Arwert, F., Kortbeek, H., Herzberg, S., Joenge, H. **1985**. Inability of chemically generate singlet oxygen to break DNA backbone. *Free Rad. Res. Commun.* 1, 1-9.
- Niki, E. **2009**. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Rad. Biol. Med.* 47, 469-484.
- O'Donnel, V.B., Chumley, P.H., Hogg, N., Bloodsworth, A, Darley-Usmar, V.M., Freeman, B.A. **1997**. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of

reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 36, 15216-15223.

Olah, G.A., Germain, A., Lin, H.C., Forsyth, D. **1975**. Electrophilic reactions at single bonds. Indication of protosolvated de facto substituting agents in the reactions of alkanes with acetylium and nitronium ions in superacid media. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 2928-2929.

Olson, L.P., Bartberger, M.D., Houk, K. N. **2003**. Peroxynitrite: a complete basis set investigation of similarities and differences between these NO_x species. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 3999-4006.

Osada, K., Sevanian, A. **2000**. Cholesterol photodynamic oxidation by ultravioleta irradiation and cholesterol ozonization by ozone exposure. *Methods Enzymol.* 319, 188-196.

Pierlot, C.; Hajjam, S., Barthélémy, C., Aubry, J. M. **1996**. Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (¹O₂, ¹Δ_g) carriers for biological media, *J. Photochem. Photobiol. B*, 36, 31-39.

Pierlot, C., Aubry, J. M., Briviba, K., Sies, H., Di Mascio, P. **2000** Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Method Enzymol.* 319, 3 – 20.

Pryor, W.A., Lightsey, J.W. **1981**. Mechanism of nitrogen dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science* 214, 435-437.

Pryor, W.A., Lightsey, J.W., church, D.F. **1982**. Reaction of nitrogen dioxide with alkenes and polyunsaturated fatty acids: addition and hydrogen abstraction mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6685-6692.

- Pryor, W.A., Houk, K. N., Foote, C.S., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., Squadrito, G.L., Davies, J.A. **2006**. Free radical biology and medicine: it's a gas man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R491-R511.
- Qi, Y.B., Garrem, E.J., Shu, X., Tsien, R.Y., Jin, Y **2012**. Photo-inducible cell ablation in *Caenorhabditis elegans* using the genetically encoded singlet oxygen generating protein miniSOG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 7499-7504.
- Rubbo, H., Radi, R, Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A. **1994**. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 269, 26066-26075.
- Russell, G.A., **1957**. Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocabons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3871-3877.
- Salvayre, A.N., Coatrieux, C., Ingueneau, C, Salvayre, R. **2008**. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 153, 6-20.
- Santos, R.M.S.; Santos, M. F.; Costa, M. F. **1993**. Quimioluminescência e Bioluminescência. *Quím. Nova* 16, 200-209.
- Schmidt, R., Afshari, E. **1992**. Collisional deactivation of $O_2(^1\Delta_g)$ by solvent molecules. Comparative experiments with $^{16}O_2$ and $^{18}O_2$, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 96, 788.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A, Brash, A.R. **2007**. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* 14, 473-488.
- Shu, X., Ram, V.L., Deerinck, T.J., Qi, Y., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Jin, Y., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y. **2011**. A genetically encoded tag for correlated

- light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *Plos Biol.* 9, e1001041.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., Garavito, R.M. **2000**. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69,145-182.
- Smith, W.L., Urade, Y., Jakobsson, P.-J. 2011. Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis. *Chem. Rev.* 111, 5821-5865.
- Sommer, H.Z., Jackson, L.L. **1970**. Alkylation of amines. A new method for the synthesis of quaternary ammonium compounds from primary and secondary amines. *J. Org. Chem.* 35, 1558-1562.
- Terao, J. Matsushita, S., **1977**. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54, 234-238.
- Thomas, J.R. **1965**. The self-reaction of *t*-butylperoxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3935-3940.
- Trostchansky, A., Bonilla, L., Thomas, C.P., O'Donnel, V.B., Marnett, L.J., Radi, Rubbo, H. **2011**. Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxidase synthases 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 286, 12891-12900.
- Trostchansky, A., Bonilla, L., Gonzáles-Perilli, L., Rubbo, H. **2013**. Nitro-fatty acids: formation, redox signaling and therapeutic potential. *Antioxid. Redox Signaling* 19, 1257-1265.
- Turro, N.J., Chow, M.F., Rigaudy, J. **1981**. Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7218-7224.
- Uemi, M., Ronsein, G.E., Prado, F.M., Motta, F.D., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. **2011**. Cholesterol hydroperoxides generate singlet

- molecular oxygen [O_2 ($^1\Delta_g$): near-IR emission, ^{18}O -Labeled hydroperoxides, and mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 887-895.
- Ursini, F., Maiorino, M., Sevanian, A., **1991**. Membrane hydroperoxides. In: *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies, editor. Academic Press, New York, p. 319-336.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. **2007**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol* 39, 44-84.
- Van Kujik, F.J.G.M., Sevanian, A. Handelman, G.J., Dratz, E.A., **1987**. A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends. Biochem. Sci.* 12, 31-34.
- Wasserman, H.H.; Larsen, D.L. **1972**. Formation of 1,4-endoperoxides from the dye-sensitized photooxygenation of alkyl-naphthalenes. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 253-254.
- Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A.B. **1995**. Rate constants for molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, 663-1021.
- Winterborn, C. **2008**. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* 4, 278-286.

Apêndice I

Espectros de RMN

1,4-bis(bromometil)naftaleno

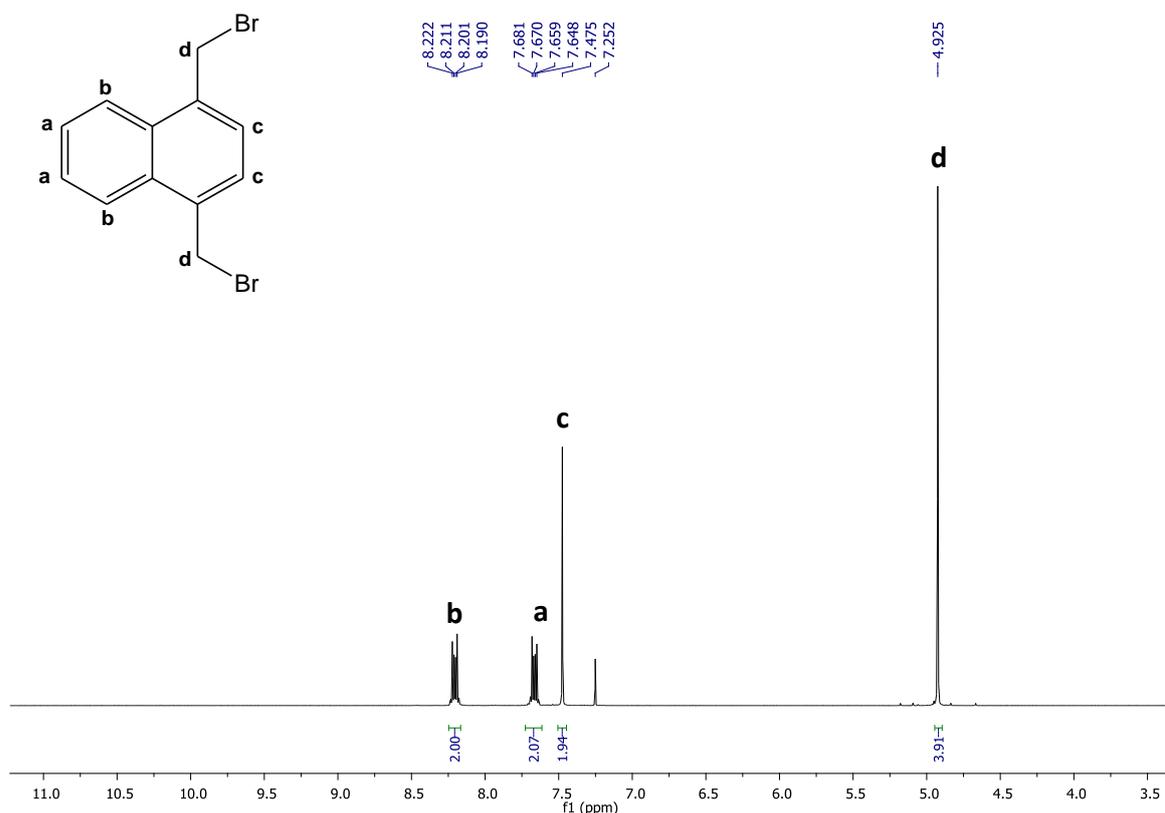


Figura I.1. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) do bis(bromometil)naftaleno.

Tabela I.1. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz do 1,4-bis(bromometil)naftaleno em CDCl_3 .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,67 (dd, $J= 6,6$ e $3,3$ Hz)
b	8,21 (dd, $J= 6,3$ e $3,3$ Hz)
c	7,47 (s)
d	4,93 (s)

1,4-bis(bromometil)naftaleno

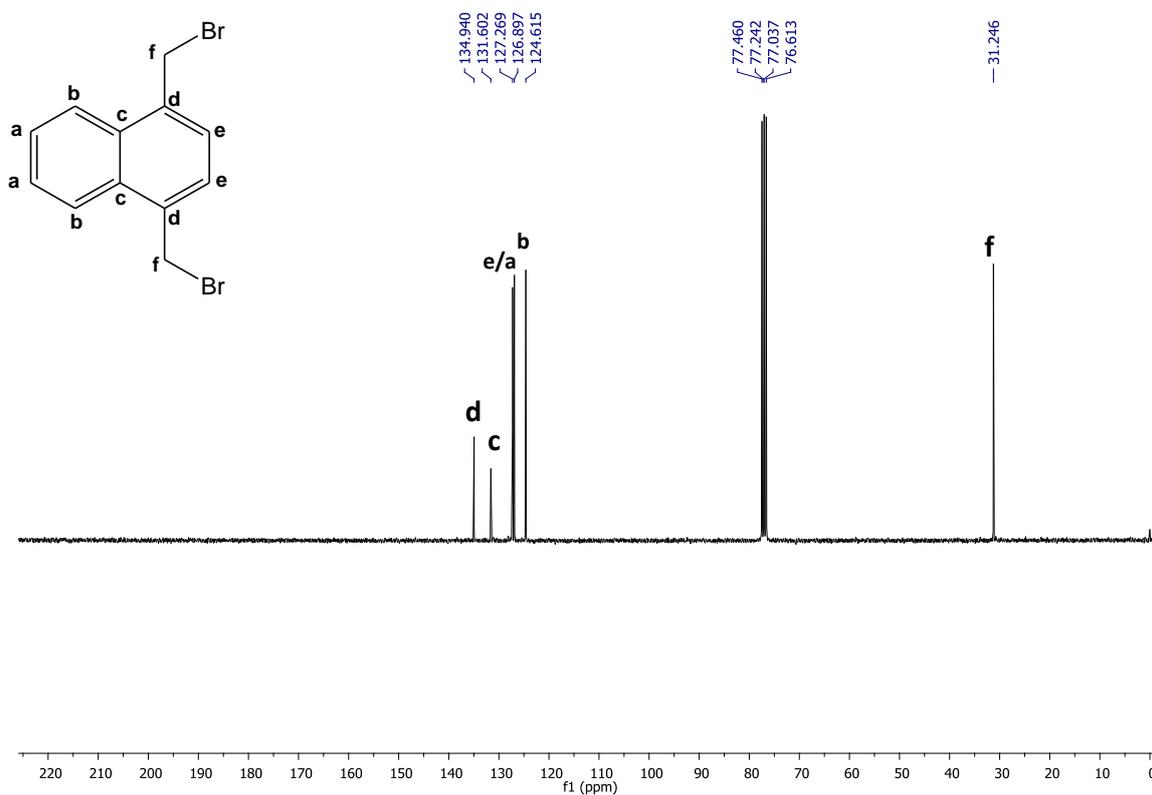


Figura I.2. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) de 1,4-bis(bromometil)naftaleno.

Tabela I.2. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz do 1,4-bis(bromometil)naftaleno em CDCl_3 .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	126,9*
b	124,6*
c	131,6#
d	134,9#
e	127,3
f	31,2

*:# Os valores podem estar trocados.

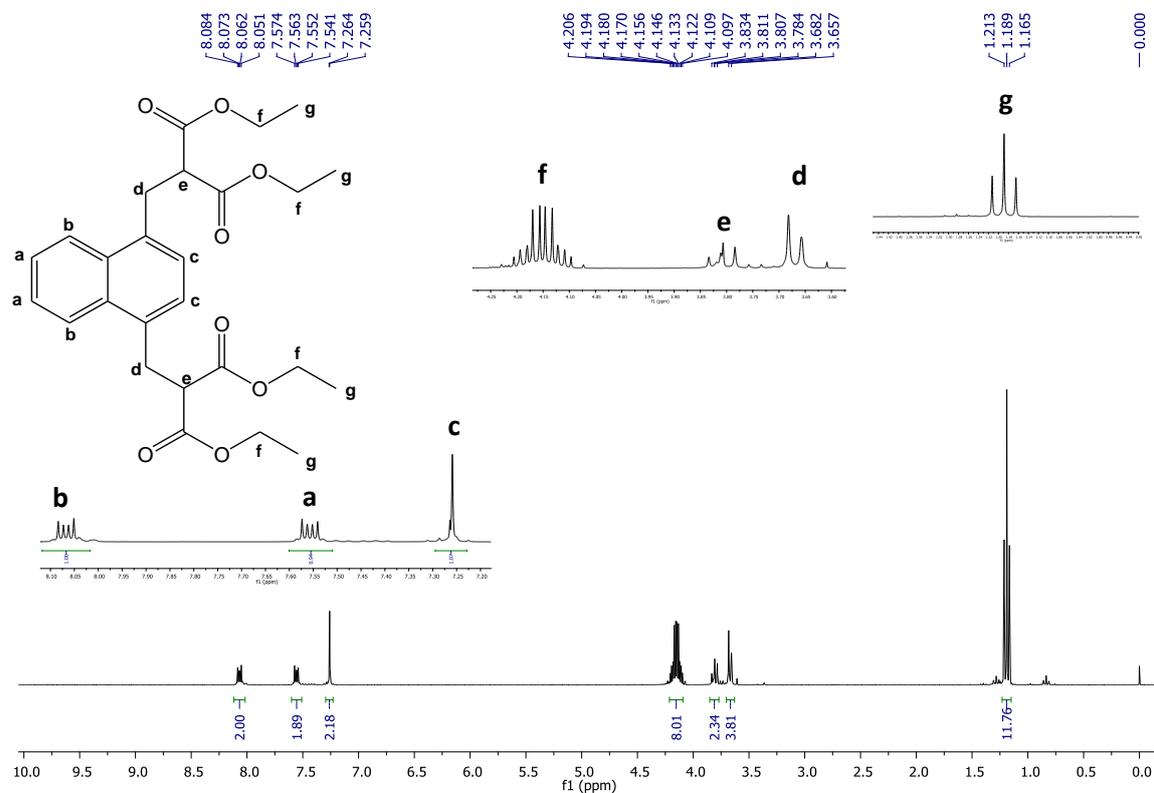
éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila

Figura 1.3. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) do éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila.

Tabela 1.3. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz do éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila em CDCl_3 .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,55 (dd, $J= 6,4$ e $3,4$ Hz)
b	8,21 (dd, $J= 6,4$ e $3,4$ Hz)
c	7,25 (s)
d	3,64 a 3,68 (m)
e	3,77 a 3,84 (m)
f	4,14 (m),
g	1,18 (t, $J= 7,0$ Hz)

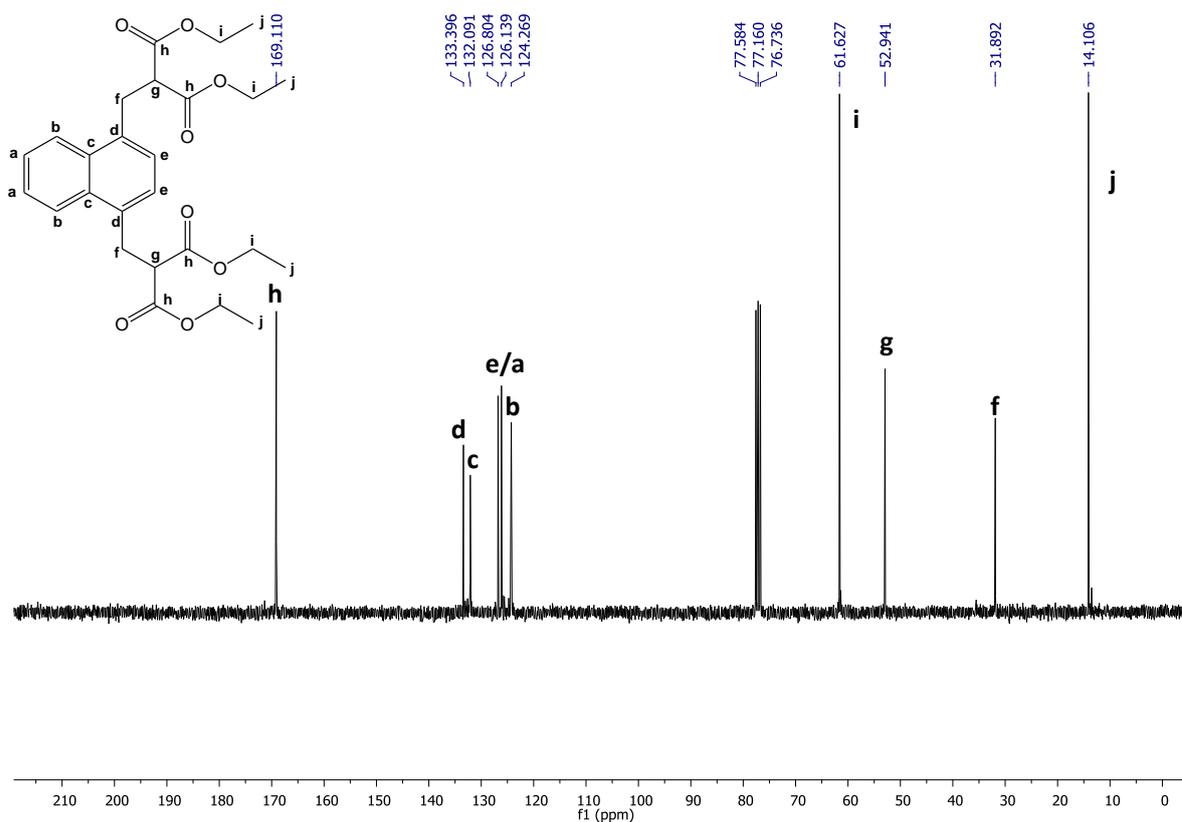
éster α,α' -dicarbetoxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila

Figura I.4. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) do éster α,α' -dicarbetoxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila.

Tabela I.4. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz do éster α,α' -dicarbetoxi-1,4-naftalenobispropanoato de etila em CDCl_3 .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	126,1*
b	124,3*
c	132,1#
d	133,4#
e	126,8
f	31,9
g	52,9
h	169,1
i	61,6
j	14,1

*. # Os valores podem estar trocados.

ácido-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico

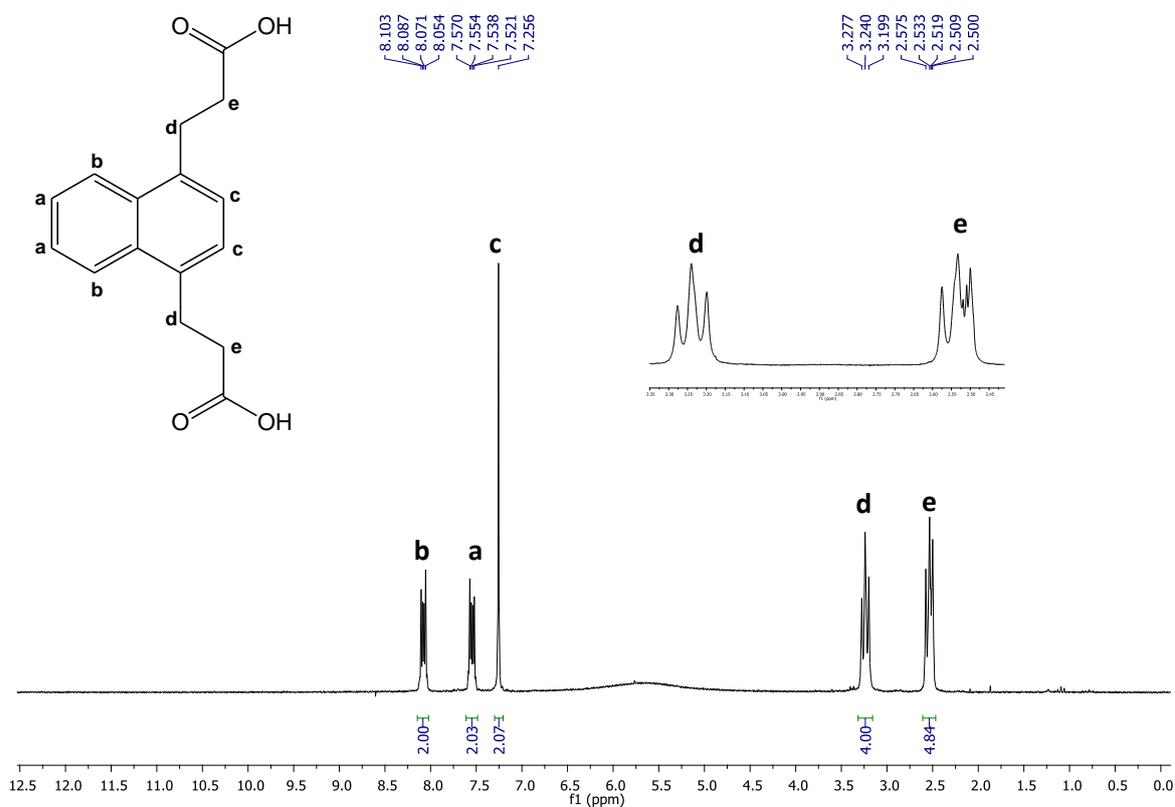


Figura I.5. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico.

Tabela I.5. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 200 MHz do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico em DMSO-d_6 .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,54 (dd, $J = 6,4$ e $3,2$ Hz)
b	8,08 (dd, $J = 6,4$ e $3,2$ Hz)
c	7,26 (s)
d	3,24 (t, $J = 7,4$ Hz)
e	3,28 a 2,50 (m)

ácido-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico

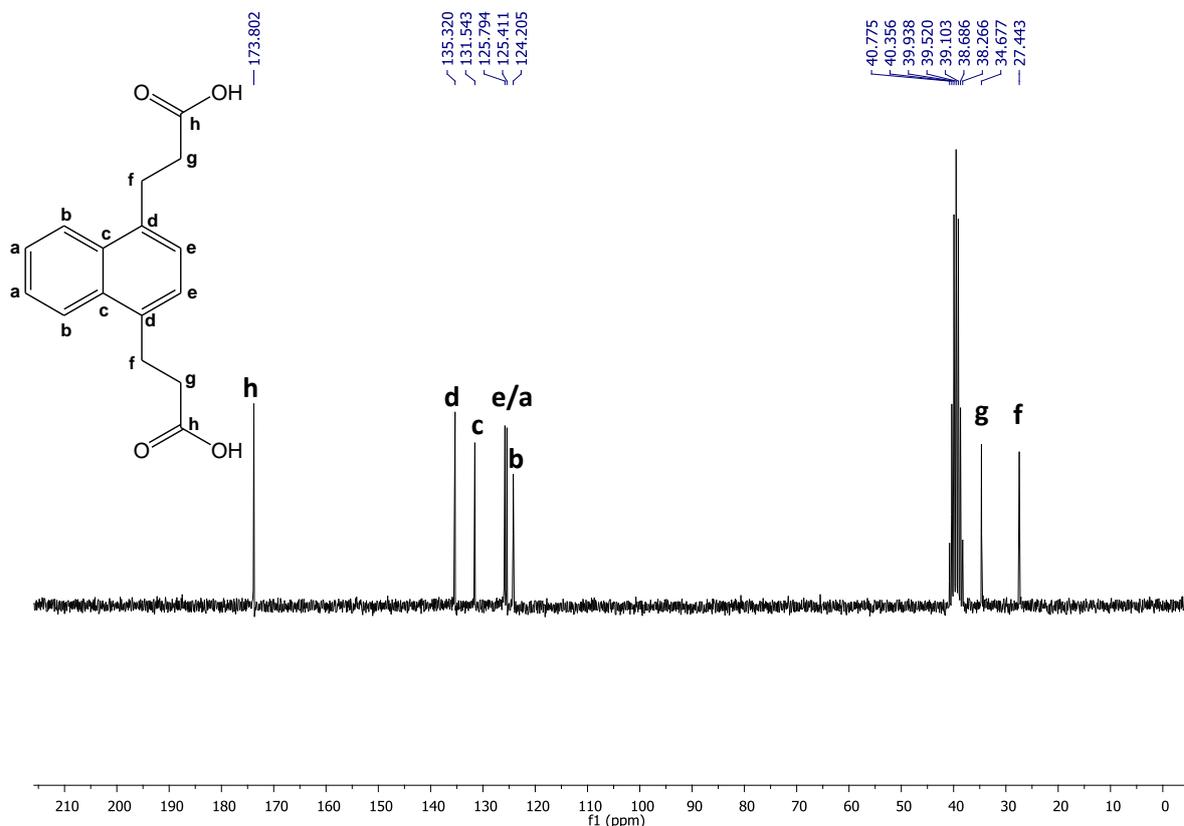


Figura I.6. Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico.

Tabela I.6. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 50 MHz do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico em DMSO-d_6 .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	125,4*
b	124,2*
c	131,5 [#]
d	135,3 [#]
e	125,8
f	27,4
g	34,5
h	173,8

*Os valores podem estar trocados.

3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila

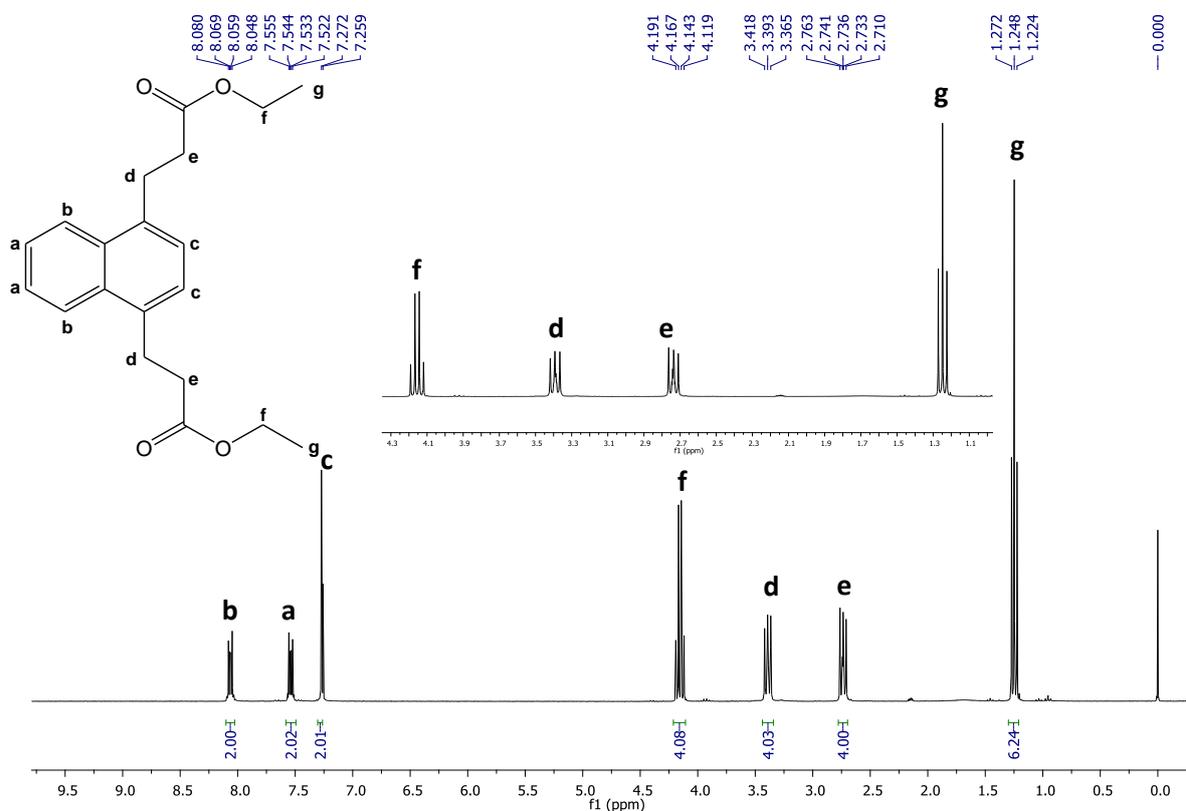


Figura I.7. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila.

Tabela I.7. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila em CDCl_3 .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,54 (dd, $J= 6,6$ e $3,3$ Hz)
b	8,06 (dd, $J= 6,3$ e $3,3$ Hz)
c	7,27 (s)
d	3,39(m)
e	2,76 a 2,71 (m)
f	4,15 (q, $J= 7,2$ Hz)
g	1,25 (t, $J= 7,2$ Hz)

3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila

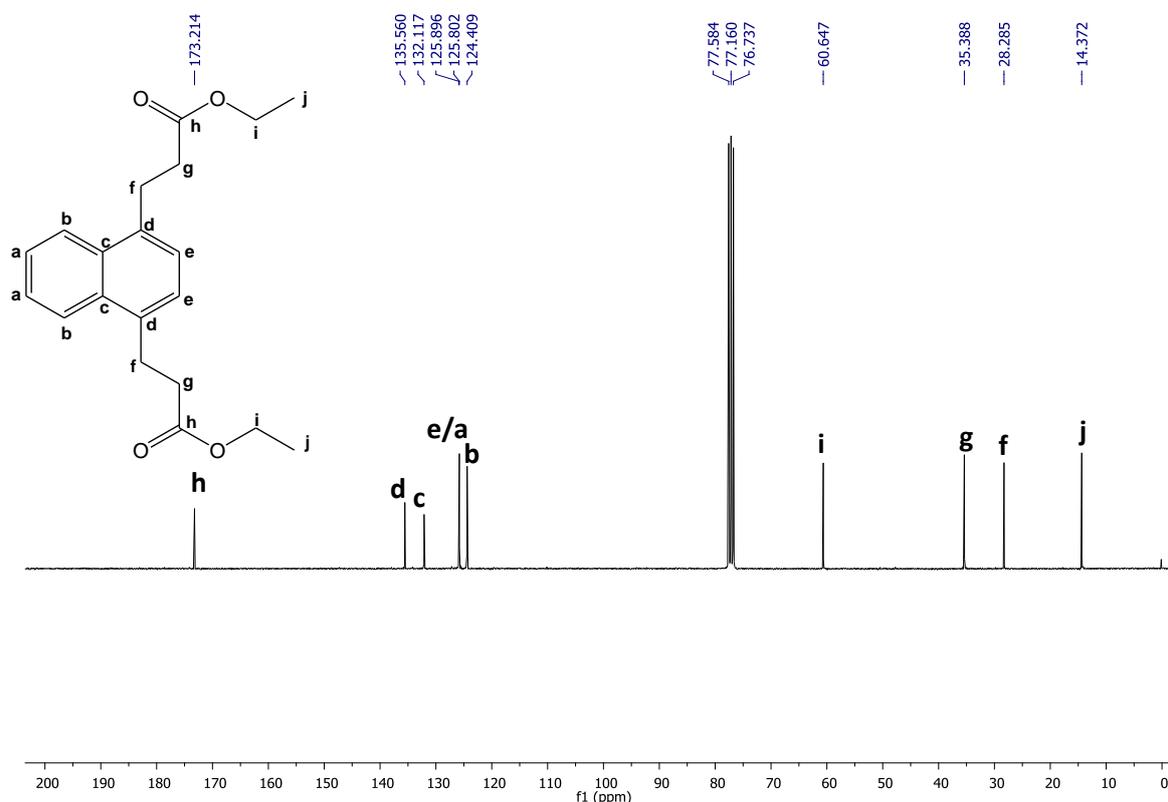


Figura I.8. Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm, TMS) de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila.

Tabela I.8. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ¹³C 75 MHz de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila em CDCl₃.

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ, ppm)
A	125,8*
B	124,4*
C	132,1#
D	135,6#
E	125,9
f	28,3
g	35,4
h	173,2
i	60,6
j	14,4

*, # Os valores podem estar trocados.

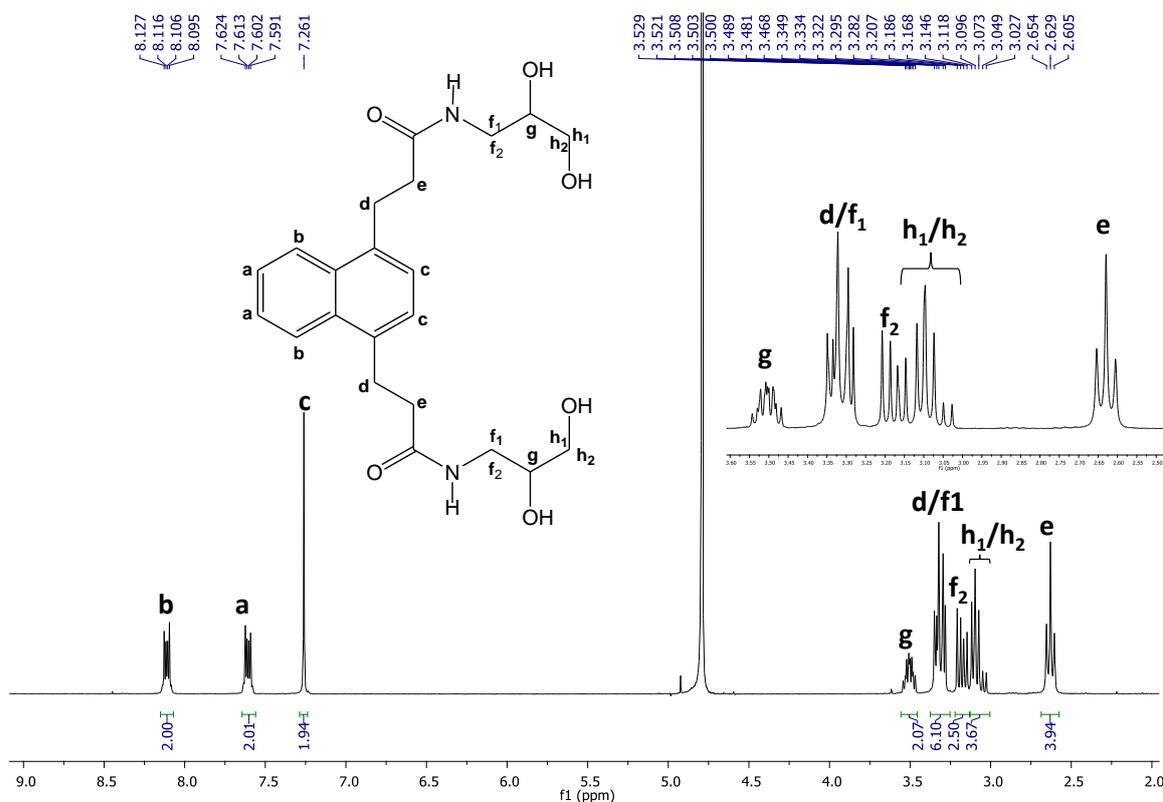
***N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida**

Figura I.9. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

Tabela I.9. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida em D_2O .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,61 (dd, $J = 6,6$ e $3,3$ Hz)
b	8,11 (dd, $J = 6,3$ e $3,3$ Hz)
c	7,26 (s)
d	3,35 a 3,28 (m)
e	2,63 (t, $J = 7,5$ Hz)
f ₁	3,35 a 3,28 (m)
f ₂	3,18 (dd, $J = 11,7$ e $6,3$ Hz)
g	3,54 a 3,03 (m)
h ₁ /h ₂	3,12 a 3,03 (m)

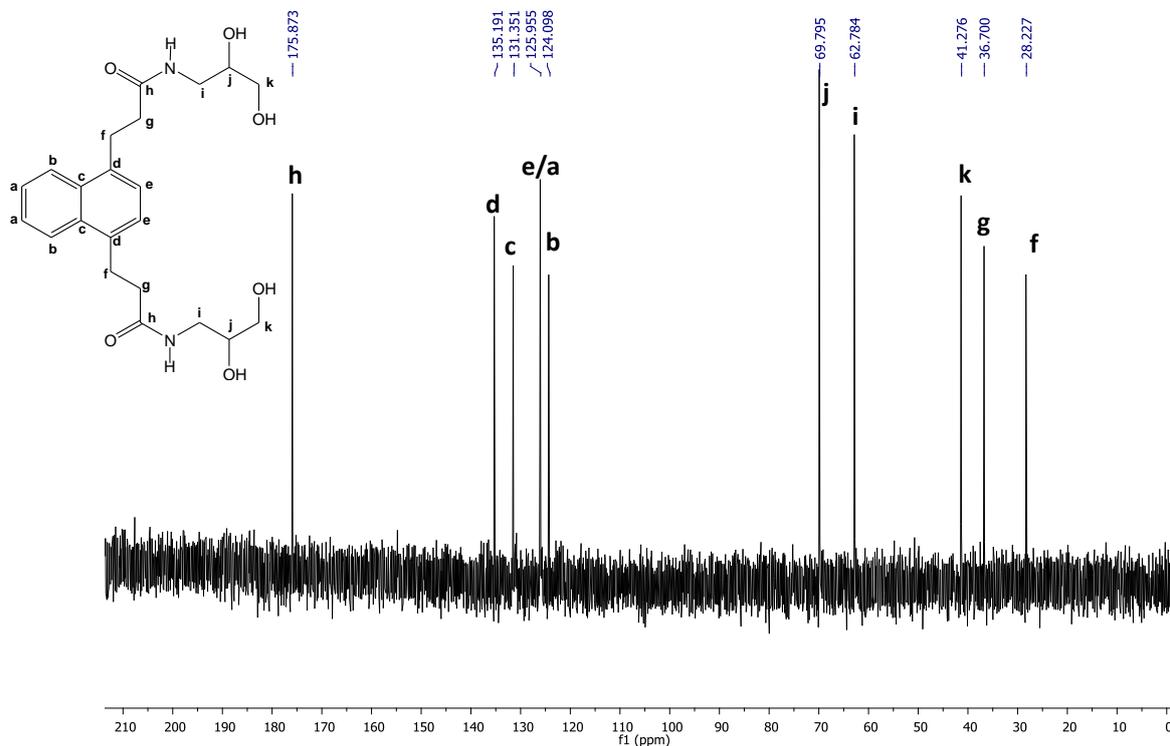
***N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida**

Figura I.10. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

Tabela I.10. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz de *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida em D_2O .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	125,9*
b	124,1*
c	135,2 [#]
d	131,3 [#]
e	125,9
f	28,2
g	36,7
h	175,8
i	62,8
j	69,8
k	41,3

*. # Os valores podem estar trocados.

3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

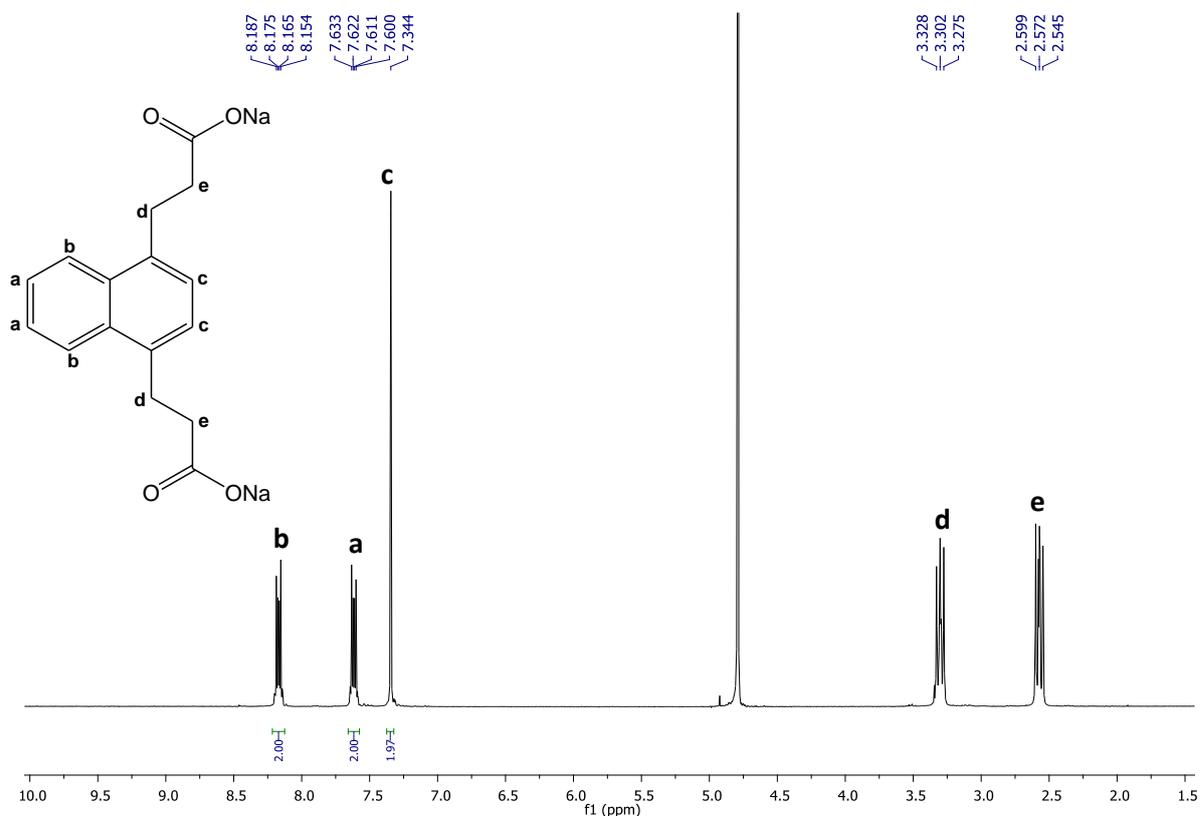


Figura I.11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio.

Tabela I.11. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio em D_2O .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,62 (dd, $J= 6,6$ e $3,3$ Hz)
b	8,17 (dd, $J= 6,6$ e $3,3$ Hz)
c	7,34 (s)
d	3,02 (t, $J= 8,1$ Hz)
e	2,57 (t, $J= 8,1$ Hz)

3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de sódio

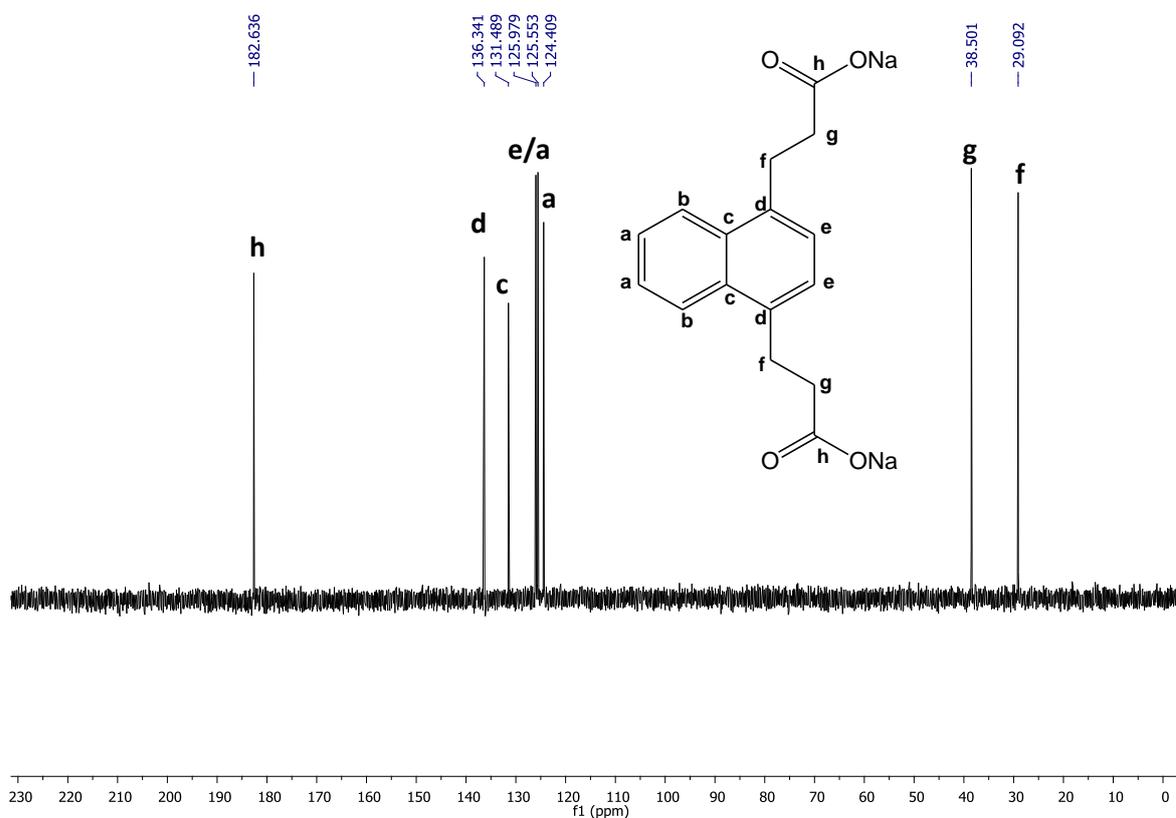


Figura I.12. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de etila.

Tabela I.12. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropoato de sódio em D_2O .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	125,5*
b	124,4*
c	131,5#
d	136,3#
e	126,0
f	29,1
g	38,5
h	182,6

*,# Os valores podem estar trocados.

2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetônitrila

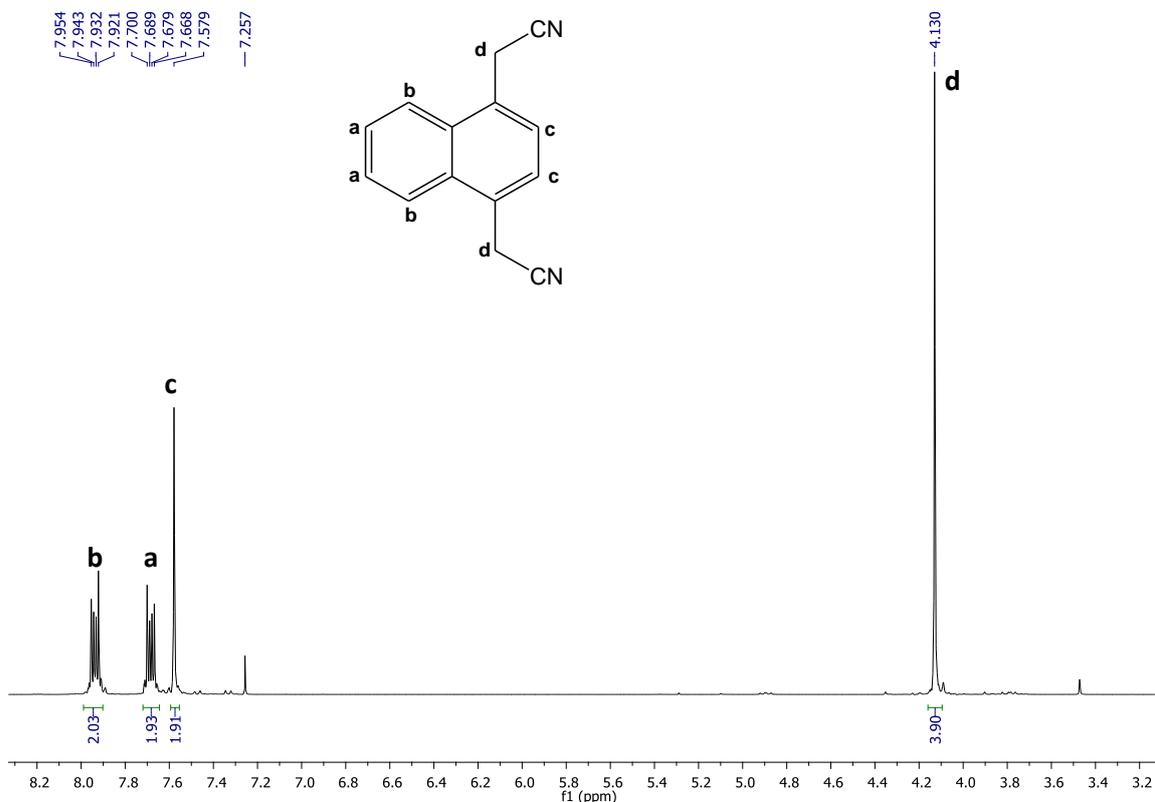


Figura I.13. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm, TMS) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetônitrila.

Tabela I.13. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ¹H 300 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetônitrila em CDCl₃.

Posição	Deslocamentos Químicos (δ, ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,66 (dd, J= 6,3 e 3,3 Hz)
b	7,94 (dd, J= 6,6 e 3,3 Hz)
c	7,58 (s)
d	4,13 (s)

2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetoneitrila

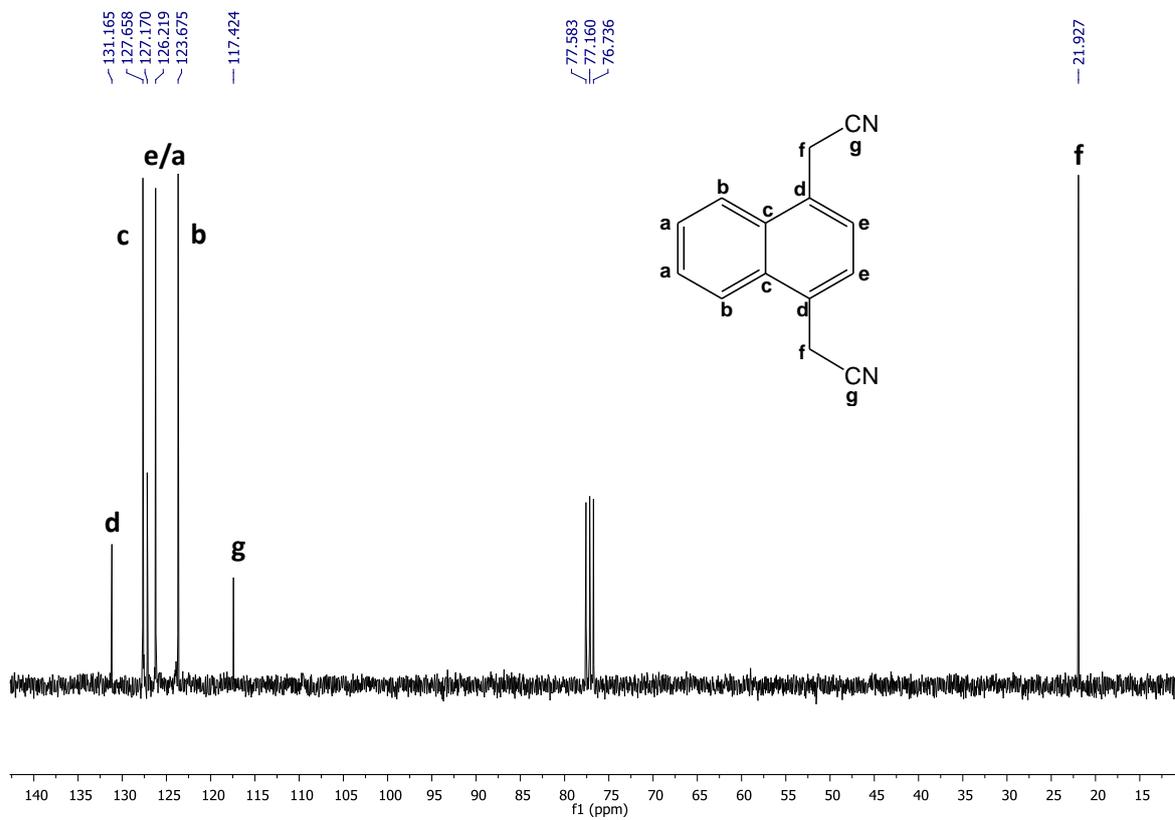


Figura I.14. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetoneitrila.

Tabela I.14. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)diacetoneitrila em CDCl_3 .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
a	126,2*
b	123,7*
c	127,6#
d	131,2#
e	127,2
f	21,9
g	117,4

*: # Os valores podem estar trocados.

2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina

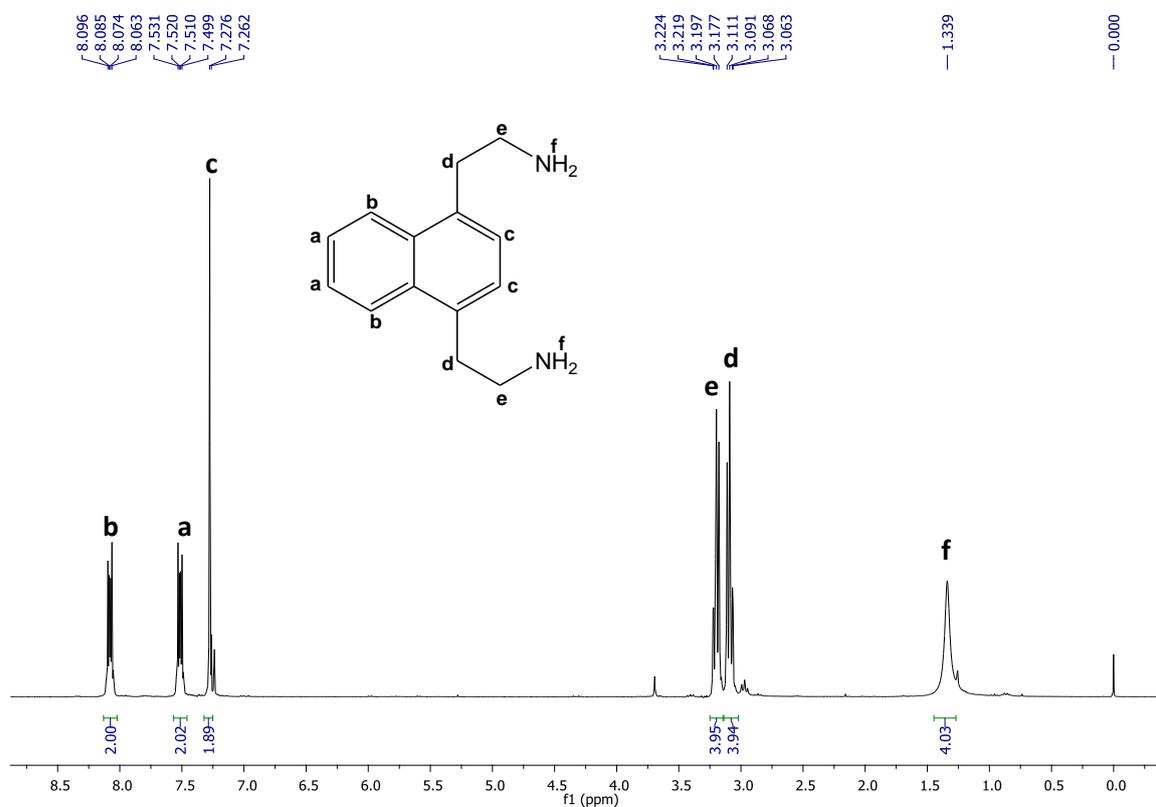


Figura I.15. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm, TMS) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina.

Tabela I.15. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina em CDCl_3 .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,51 (dd, $J = 6,6$ e $3,3$ Hz)
b	8,08 (dd, $J = 6,3$ e $3,3$ Hz)
c	7,28 (s)
d	3,11 a 3,06 (m)
e	3,22 a 3,18 (m)
f	1.34 (sl.)

2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina

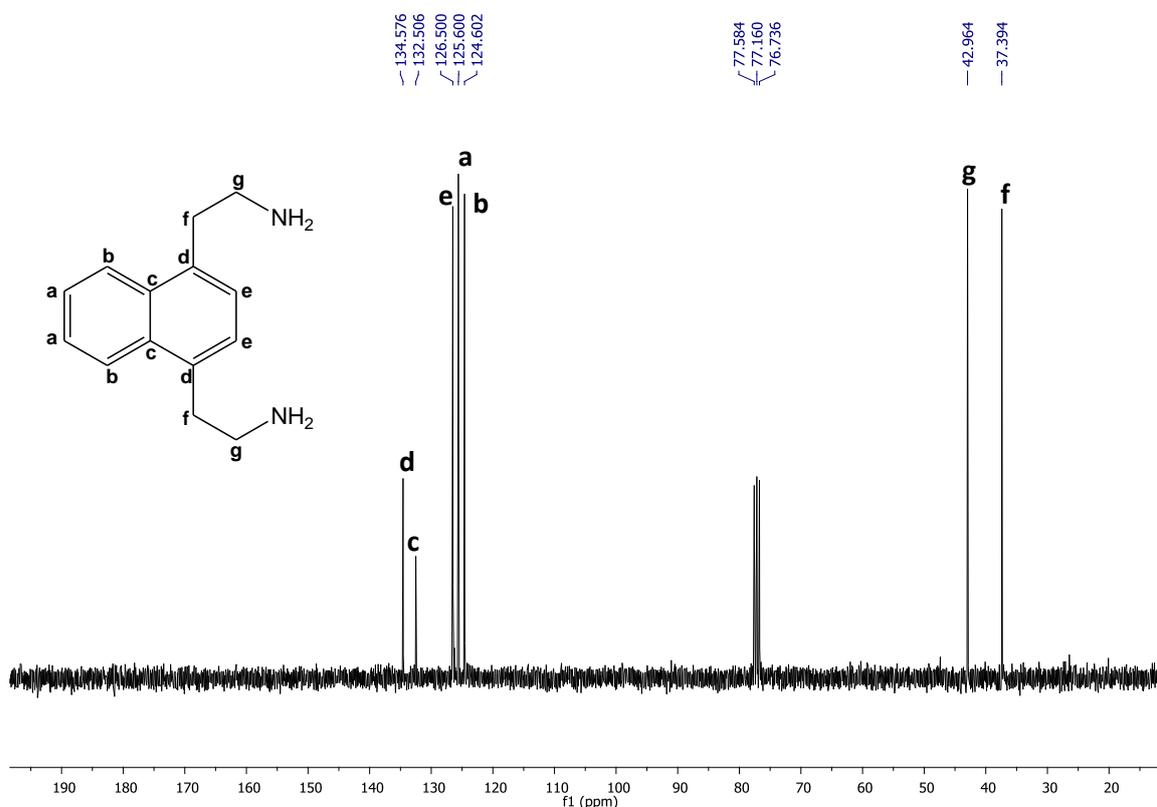


Figura I.16. Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm, TMS) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina.

Tabela I.16. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ¹³C 75 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)dietanamina em CDCl₃.

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ, ppm)
A	125,6*
B	124,6*
C	132,5 [#]
D	134,6 [#]
E	126,5
F	37,4
G	43,0

*. # Os valores podem estar trocados.

2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio)

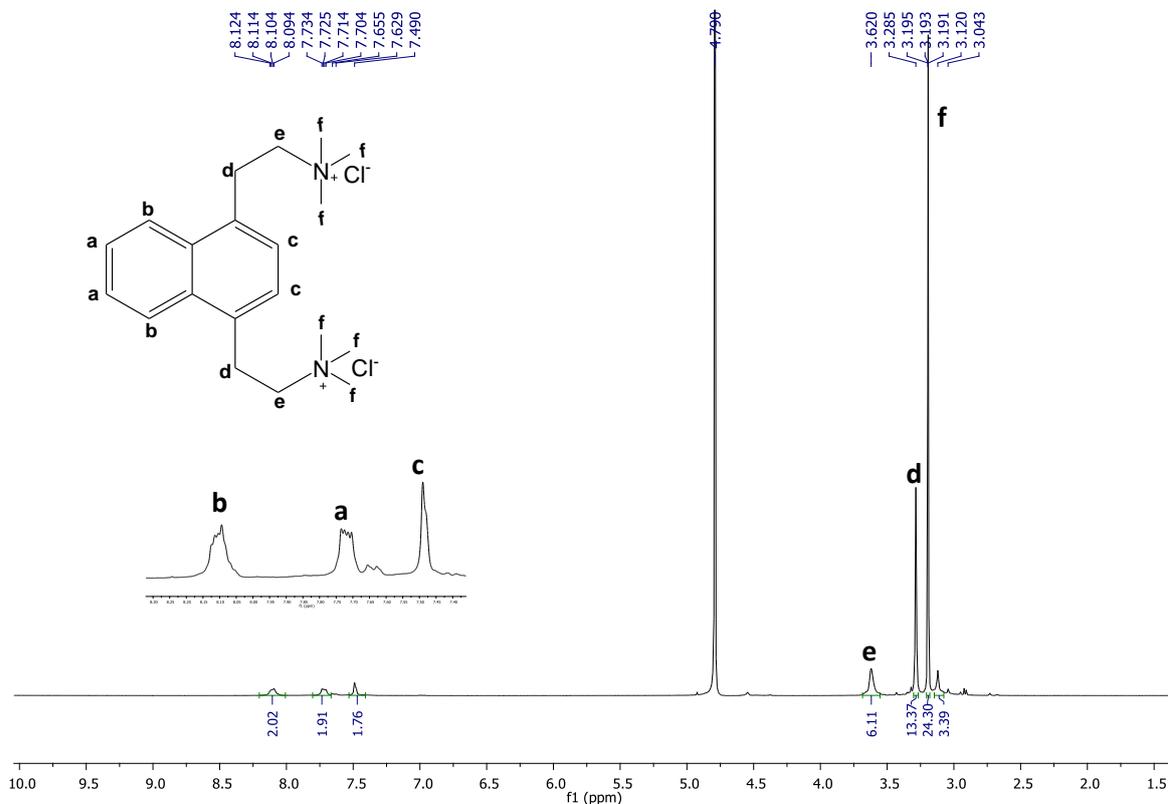


Figura I.17. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, D_2O , δ ppm) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio).

Tabela I.17. Deslocamentos químicos, desdobramento de sinais e constantes de acoplamento para o espectro de RMN ^1H 300 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio) em D_2O .

Posição	Deslocamentos Químicos (δ , ppm), Desdobramento de Sinais e Constantes de Acoplamento (J)
a	7,72 (dd, $J= 6,0$ e $3,0$ Hz)
b	8,11 (dd, $J= 6,0$ e $3,0$ Hz)
c	7,49 (s)
d	3,28 (sl)
e	3,61 (s)
f	3,2 (sl)

2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio)

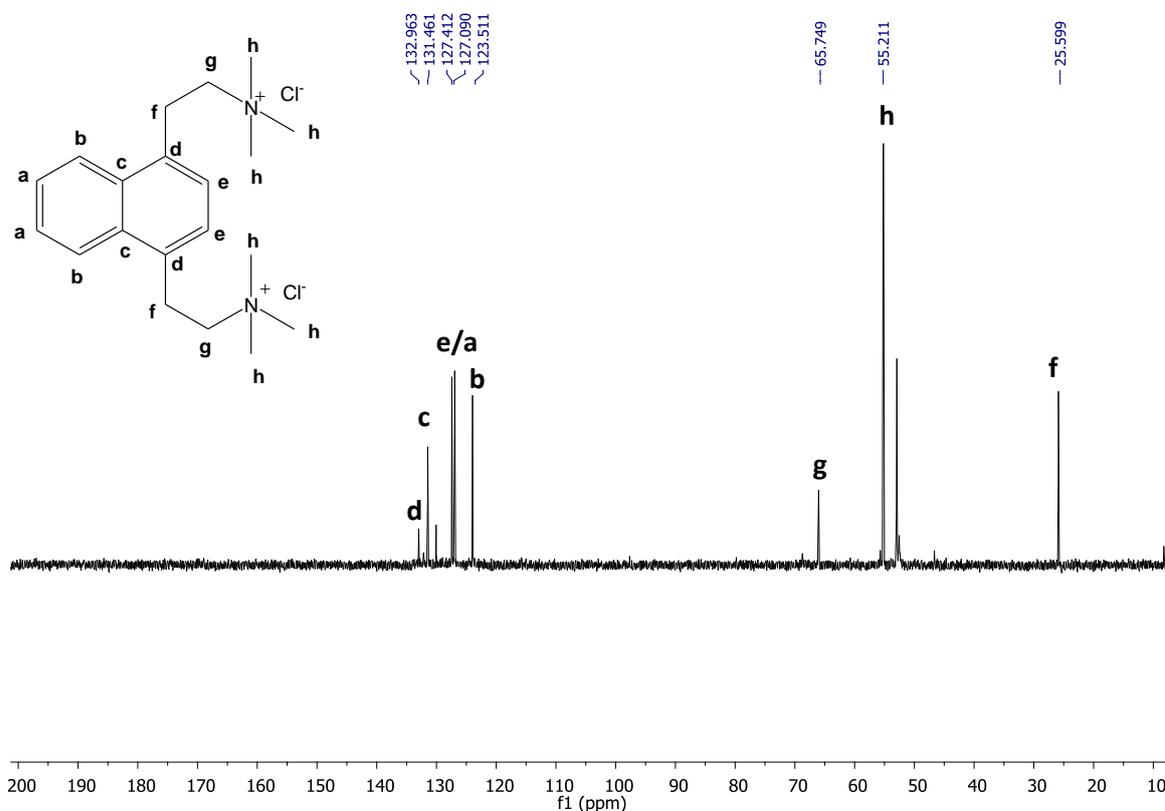


Figura I.18. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio).

Tabela I.18. Deslocamentos químicos para espectro de RMN ^{13}C 75 MHz de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio) em D_2O .

Carbono	Deslocamentos Químicos (δ , ppm)
A	127,1*
B	123,5*
C	131,5#
D	133,0#
E	127,4
F	25,6
G	65,0
H	55,2

*:# Os valores podem estar trocados.

2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio)

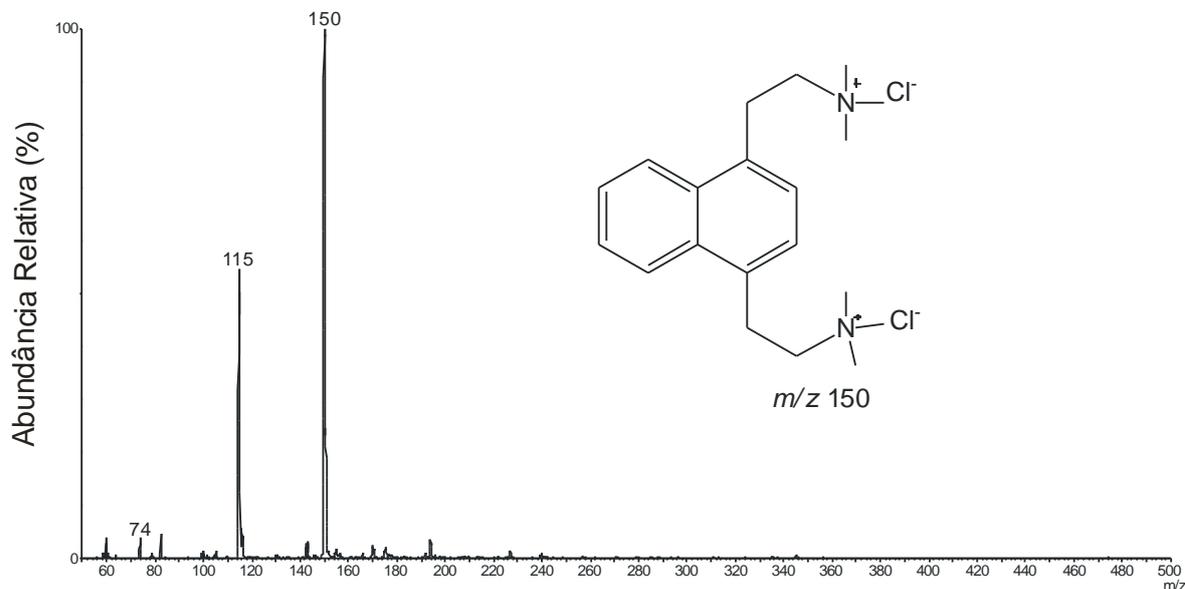


Figura I.19. Espectro ESI^+/MS de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio).

Tabela I.19. Espectro ESI^+/MS de 2,2'-(naftalen-1,4-dil)bis(cloreto de N,N,N-trimetil etanaminio).

m/z	Estrutura do íon
150	$[1/2 ((M + 2H) - 2H)]^+$
115	$[1/2 ((M + 2H) - N(CH_3)_3 - CH)]^+$
74	$[1/2 (M + 2H - 2(N(CH_3)_3) - 2CH_3 - 6H)]^+$

Apêndice II

Cálculo do Rendimento de Oxigênio Singlete

O rendimento de $^1\text{O}_2$ gerado nas reações dos hidroperóxidos de lipídeos, hidroperóxidos orgânicos e H_2O_2 com NO_2BF_4 foi calculado empregando-se como padrão o endoperóxido DMNO_2 , que por termodecomposição a 37°C libera $^1\text{O}_2$ com 76% de rendimento ($k = 2,67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Müller e Ziereis, 1990). As medidas de emissão de luz no infravermelho próximo ($\lambda = 1270 \text{ nm}$) foram realizadas para termólise de 10 mM de DMNO_2 em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v).

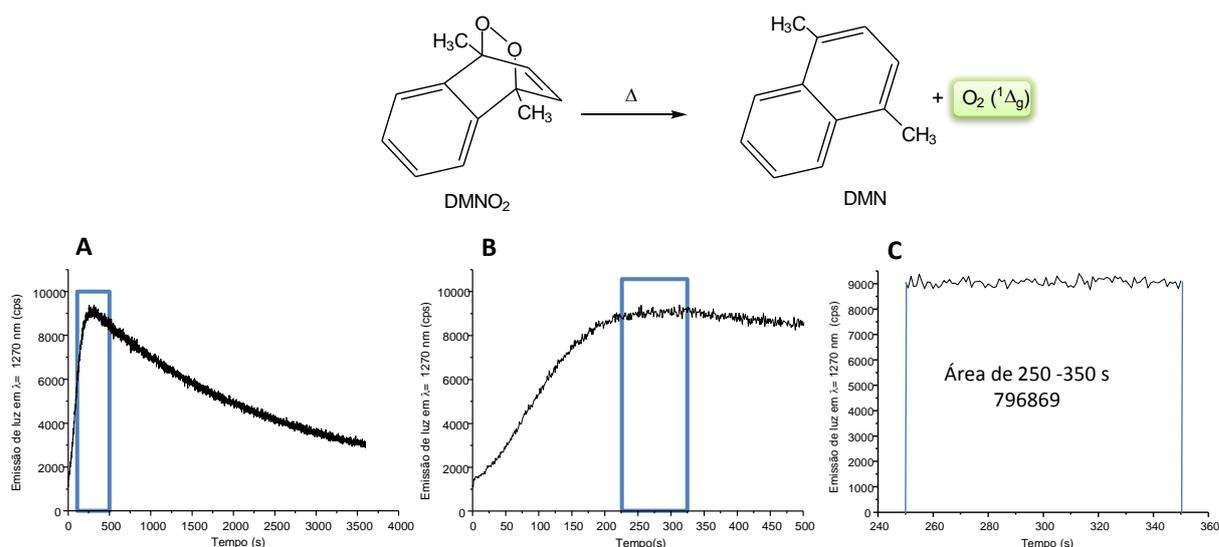


Figura II.1. Termólise do DMNO_2 e medidas da emissão de luz em $\lambda = 1270 \text{ nm}$, para termólise de uma solução de DMNO_2 10 mM em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1, v/v).

Primeiramente, para o cálculo da quantidade de $^1\text{O}_2$, integrou-se a área sob a curva de emissão de luz em que houve geração constante de $^1\text{O}_2$ (250-350s). Foi encontrado um valor de aproximadamente 796869 (unidades arbitrárias). A termólise de DMNO_2 gera $2,03 \mu\text{M}$ de $^1\text{O}_2$ por segundo, então para 100s, ou seja, uma área de 796869 unidades arbitrárias, a geração de $^1\text{O}_2$ seria de $203 \mu\text{M}$.

Portanto, 1 unidade de área corresponde a $2,55 \times 10^{-10}$ M de $^1\text{O}_2$. Com esse valor obtido foi possível estimar as quantidades de $^1\text{O}_2$ comparando-se a área sob a curva com das emissões das reações dos ROOH com NO_2BF_4 .