UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio
singlete: estudos com marcação isotópica, espectrometria de
massa e luminescência**

Sayuri Miyamoto

Tese de Doutorado apresentada no
Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Paolo Di Mascio

Orientador

SÃO PAULO

04 de Março de 2005

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Miyamoto, Sayuri

M658h Hidroperóxidos de lipídios como fonte biológica de oxigênio
singlete : estudos com marcação isotópica, espectrometria de
massa e luminescência / Sayuri Miyamoto. - São Paulo, 2005.
1v. (paginação irregular)

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Di Mascio, Paolo

1. Espécies reativas de oxigênio no ser vivo : Bioquímica
2. Lipídio : Bioquímica I. T. II. Di Mascio, Paolo, orientador.

574.1921 CDD

Aos meus pais por tudo.

*“A verdadeira viagem do descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ver com novos olhos”*

Marcel Proust

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao Prof. Paolo Di Mascio pela orientação científica, amizade, incentivo constante, confiança e por ter me aberto a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Junji Terao pelos ensinamentos, amizade e pela oportunidade única de trabalhar em seu laboratório.

À Profa. Marisa Helena Gennari de Medeiros pela colaboração científica, pelo apoio e críticas construtivas.

À Gláucia pelas discussões produtivas, colaboração científica e principalmente pela amizade alegre e descontraída.

À Janice por ser minha amiga de todas as horas, pelas dicas e pelas viagens.

Aos amigos de laboratório Miriam, Fernanda, Graziella, Lydia, Isaura, Daniela, Ana Paula Martins, Priscila, Christiane, Sabrina, Claudia, Ana Paula Loureiro, Osmar, Clécio, Eduardo, Lívea, Alexandre, e Camila pelo convívio agradável, pelos momentos de descontração, apoio e amizade.

À Profa. Ohara Augusto pela oportunidade de aprender um pouco sobre EPR, pelas discussões e colaboração científica.

Ao Marcelo G. Bonini, Daniel Rettori, e Edlaine Linares pela colaboração científica e amizade.

Ao Prof. Maurício da Silva Baptista e ao Divinomar pelas discussões e auxílio na utilização do laser.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química que foram sempre bastante prestativos e que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Ao Prof. Massami Shimokomaki pela paciência durante a minha iniciação científica, amizade e colaboração constante.

À Myrian K. Yamamoto pelo auxílio na revisão de texto.

À Regina Maki pela amizade e arranjos especiais.

Aos meus amigos que infelizmente estão distantes pelos momentos agradáveis que fizeram a diferença em minha vida.

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho e pela torcida.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre me deram apoio, carinho e incentivo e sem os quais eu não teria chegado até aqui.

Ao Cláudio pelo carinho, paciência e apoio nas horas mais difíceis.

À Deus por ser o meu guia.

Agradecimentos pelo Apoio Financeiro

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRONEX-FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo Mitsui

The John Simon Guggenheim Memorial Foundation

Resumo

RESUMO

Evidências apontam para o envolvimento da peroxidação lipídica em diversas patologias. Os hidroperóxidos de lipídios (LOOH) são os produtos primários da peroxidação lipídica e sua decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila. Esses radicais desempenham papel importante na propagação da peroxidação lipídica e também podem gerar oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) por meio da combinação de dois radicais peroxila. Neste trabalho investigamos a possibilidade dos LOOH, em particular dos hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH), de servirem como fonte $^1\text{O}_2$ na presença de oxidantes de relevância biológica como metais, peroxinitrito ou ácido hipocloroso. A formação de $^1\text{O}_2$ foi claramente demonstrada na reação de LAOOH com esses oxidantes pelas detecções (i) da emissão bimolecular na região espectral do vermelho ($\lambda > 570$ nm), (ii) da emissão monomolecular no infravermelho-próximo ($\lambda = 1270$ nm), (iii) do espectro de emissão no infravermelho, e (iv) da intensificação e supressão da luminescência na presença de D_2O e azida, respectivamente. Além disso, os mecanismos de reação foram estudados utilizando LAOOH marcados com oxigênio-18 ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) e captadores químicos específicos para $^1\text{O}_2$, aliada à técnica de detecção por HPLC acoplada à espectrometria de massa. Os resultados mostraram a formação de $^1\text{O}_2$ marcado [$^{18}(^1\text{O}_2)$] na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com os três oxidantes, revelando que os átomos de oxigênio do $^1\text{O}_2$ são derivados do hidroperóxido. Em conjunto, as evidências obtidas levam à conclusão de que os LOOH podem servir como fontes potenciais de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos em situações onde haja a coexistência de LOOH e metais, peroxinitrito ou ácido hipocloroso.

Abstract

ABSTRACT

Evidences point to the involvement of lipid peroxidation in several diseases. Lipid hydroperoxides (LOOH) are the primary products of lipid peroxidation and their decomposition generates more reactive and toxic compounds, such as peroxy radicals. These radicals play an important role in the propagation of lipid peroxidation and may also generate singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) by the combination of two peroxy radicals. In this study we have investigated the possibility of LOOH, in particular linoleic acid hydroperoxide (LAOOH), to be a source of $^1\text{O}_2$ in the presence of biologically relevant oxidants such as, metal ions, peroxyxynitrite or hypochlorous acid. The formation of $^1\text{O}_2$ was clearly demonstrated in the reaction of LAOOH with all the three tested oxidants by detecting: (i) the dimol light emission in the red spectral region ($\lambda > 570$ nm), (ii) the monomol light emission in the near-infrared region ($\lambda = 1270$ nm), (iii) the infrared light emission spectrum, and (iv) the enhancing effect of deuterium oxide and the quenching effect of azide on light emission. Furthermore, the mechanism was studied using LAOOH labeled with 18-oxygen isotope ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) and specific $^1\text{O}_2$ chemical traps in combination with HPLC coupled to mass spectrometry detection. The results have showed the formation of 18-oxygen labeled $^1\text{O}_2$ [$^{18}(^1\text{O}_2)$] in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with the three oxidants, indicating that oxygen atoms in $^1\text{O}_2$ are derived from the hydroperoxide. Altogether, the obtained evidences lead to the conclusion that LOOH may serve as a potential source of $^1\text{O}_2$ in biological systems, in situations where LOOH can interact with metals, peroxyxynitrite or hypochlorous acid.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

10-OOH: ácido 10-hidroperóxi-8,13-octadecadienóico
12-OOH: ácido 12-hidroperóxi-9,13-octadecadienóico
13-OOH: ácido 13-hidroperóxi-9,11-octadecadienóico
4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal
8-oxodG: 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina
9-OOH: 9-hidroperóxi-10,12-octadecadienóico
APCI: modo de ionização química a pressão atmosférica
CLOOH: hidroperóxidos de cardiolipina
CuOOH: hidroperóxidos de cumeno
DPA: 9,10-difenilantraceno
DPAO₂: endoperóxido de DPA
DPA¹⁸O¹⁸O: endoperóxido de DPA marcado com oxigênio-18
DHPN: N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftidileno)dipropanamida
DHPNO₂: endoperóxido de DHPN
DMNO₂: endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno
DMPO: 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO: dimetil-sulfóxido
EAS: sulfato mono-{2[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]}-etil}éster de sódio
EASO₂: endoperóxido de EAS
EAS¹⁸O¹⁸O: endoperóxido de EAS marcado com oxigênio-18
EPR: ressonância paramagnética eletrônica
ESI⁻: modo negativo de ionização por *electrospray*
ESI⁺: modo positivo de ionização por *electrospray*
EYPC: fosfatidilcolina de gema de ovo
EYPCOOH: hidroperóxidos de fosfatidilcolina de gema de ovo
FABP: fatty acid binding protein ou proteína ligante de ácidos graxos
GPx: glutatona peroxidase
HOCl: ácido hipocloroso
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
HPLC-MS/MS: HPLC acoplado à espectrometria de massas em tandem
LAOOH: hidroperóxidos de ácido linoléico
LA¹⁸O¹⁸OH: hidroperóxidos de ácido linoleico marcados com oxigênio-18
LH: lipídios
LO[•]: radicais alcóxila de lipídios
LOO[•]: radicais peróxila de lipídios
LOOH: hidroperóxidos de lipídios

LOX: lipoxigenase
MPO: mieloperoxidase
MS: espectrometria de massa
m/z: razão massa/carga
 $^1\text{O}_2$: oxigênio molecular singlete
[$^{18}(^1\text{O}_2)$]: oxigênio molecular singlete marcado com oxigênio-18
ONOO⁻: peroxinitrito
PDA: detector de fotodiodos em série
PHGPx: glutathione peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios
PLA2: fosfolipase A2
PSOOH: hidroperóxidos de fosfatidilserina
RO[•]: radicais alcóxila orgânicos
ROO[•]: radicais peróxila orgânicos
ROOH: hidroperóxidos orgânicos
Tempol: 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-óxila
TLC: cromatografia de camada delgada
t-BuOOH: hidroperóxidos de *tert*-butila
UCP2: proteína desacopladora-2
u.m.a: unidades de massa atômica

Índice

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: implicações biológicas.....	1
1.2. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: oxidação de lipídios.....	5
1.3. Hidroperóxidos de lipídios: aspectos gerais.....	6
1.4. Mecanismos de geração de hidroperóxidos de lipídios.....	8
1.4.1. Formação de LOOH na peroxidação lipídica.....	8
1.4.2. Formação de LOOH na fotooxidação.....	11
1.4.3. Formação de LOOH por reações enzimáticas.....	16
1.5. Mecanismos de defesa e reparo de hidroperóxidos de lipídios.....	17
1.6. Absorção e translocação de hidroperóxidos de lipídios.....	21
1.6.1. Transporte e translocação de ácidos graxos e LOOH nas células.....	21
1.6.2. Transferência de LOOH entre células.....	24
1.7. Reações de decomposição de hidroperóxidos de lipídios.....	24
1.8. Consequências biológicas da formação de LOOH nas células.....	28
1.8.1. Danos em proteínas.....	28
1.8.2. Danos no DNA.....	29
1.8.3. Envolvimento de LOOH na sinalização e morte celular.....	31
1.9. Geração de oxigênio singlete a partir de hidroperóxidos de lipídios.....	34
1.9.1. Oxigênio singlete: aspectos gerais.....	34
1.9.2. Métodos de detecção.....	39

1.9.3. Danos em biomoléculas.....	43
1.9.4. Fontes biológicas de oxigênio singlete.....	44
1.9.5. LOOH e metais.....	50
1.9.6. LOOH e proteínas contendo grupo heme.....	51
1.9.7. LOOH e peroxinitrito.....	52
1.9.8. LOOH e ácido hipocloroso.....	55
2. OBJETIVOS.....	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1. Reagentes.....	59
3.2. Síntese dos hidroperóxidos do ácido linoléico.....	60
3.3. Síntese dos hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18.....	60
3.4. Purificação de LAOOH ou LA ¹⁸ O ¹⁸ OH por cromatografia de coluna.....	61
3.5. Análise de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH por espectrometria de massa.....	62
3.6. Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH com Ce ⁴⁺	62
3.7. Captação química do oxigênio singlete gerado nas incubações de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH com Ce ⁴⁺	63
3.8. Análise e quantificação de DPA ^x O ^x O (x:16 ou 18) por HPLC-MS/MS.....	64
3.9. Medidas de emissão de luz do oxigênio singlete no visível.....	65
3.10. Medidas de emissão de luz do oxigênio singlete no infravermelho.....	66
3.11. Medidas de emissão de luz no visível para a reação de LAOOH com Ce ⁴⁺ ou Fe ²⁺	69
3.12. Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação LAOOH com Ce ⁴⁺ ou Fe ²⁺ : cinética e espectro.....	70

3.13. Síntese do padrão de álcool marcado com oxigênio-18 (LA ¹⁸ OH).....	70
3.14. Síntese do padrão de cetona marcada com oxigênio-18 (LA ¹⁸ O).....	71
3.15. Análise de LA ¹⁸ OH e LA ¹⁸ O por HPLC-MS/MS.....	71
3.16. Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH ou LA ¹⁸ O ¹⁸ OH com peroxinitrito.....	72
3.17. Medidas de emissão de luz no visível para a reação de LAOOH com peroxinitrito.....	73
3.18. Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação LAOOH com peroxinitrito: cinética e espectro.....	73
3.19. Efeito de manitol e DMSO sobre a emissão de luz gerada na reação de LAOOH com peroxinitrito.....	74
3.20. Preparo de hipoclorito destilado.....	75
3.21. Síntese de DHPNO ₂	75
3.22. Síntese dos hidroperóxidos de fosfatidilcolina.....	76
3.23. Análise de fosfatidilcolina e de seus hidroperóxidos por espectrometria de massa.....	77
3.24. Preparo de liposomos.....	77
3.25. Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH e hipoclorito usando EAS.....	78
3.26. Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de hidroperóxidos e hipoclorito.....	78
3.27. Medida do espectro emissão de luz no infravermelho gerado na reação de LAOOH e hipoclorito.....	79
3.28. Cálculo da quantidade de oxigênio singlete utilizando DHPNO ₂	79
3.29. Detecção de radicais peroxila por EPR em fluxo.....	80

3.30. Determinação da constante de supressão ou “quenching”	81
4. RESULTADOS.....	82
4.1. Síntese e caracterização dos hidroperóxidos do ácido linoleico	
marcados com oxigênio-18 ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$).....	82
4.2. Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH	
com metais.....	87
4.2.1. Utilização de DPA como captador químico para oxigênio	
singlete.....	87
4.2.2. Quantificação de oxigênio singlete na reação de LAOOH com Ce^{4+}	
ou Fe^{2+} usando DPA.....	90
4.2.3. Medidas de emissão de luz na reação de LAOOH com Ce^{4+}	
ou Fe^{2+}	93
4.2.3.1. Medidas de emissão de luz na região do visível.....	94
4.2.3.2. Medidas de emissão de luz na região do infravermelho.....	95
4.2.3.3. Medida do espectro de emissão de luz na região	
do infravermelho.....	96
4.2.4. Estudos do mecanismo de geração de $^1\text{O}_2$ utilizando $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$	99
4.2.5. Troca da hidroxila marcada (^{18}OH) de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com água.....	106
4.2.6. Detecção dos produtos álcool marcado (LA^{18}OH) e cetona	
marcada (LA^{18}O) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+}	107
4.2.7. Detecção de radical peroxila na reação de LAOOH ou	
$\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com Ce^{4+} utilizando captador de spin e HPLC-MS/MS....	111
4.2.8. Formação de oxigênio singlete na reação de hidroperóxidos de	
fosfatidilcolina e Ce^{4+}	113
4.2.9. Formação de oxigênio singlete na reação de hidroperóxidos de	

fosfatidilcolina e Ce^{4+} : estudos em lipossomos.....	116
4.3. Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com peroxinitrito.....	118
4.3.1. Caracterização da luminescência na reação de LAOOH com peroxinitrito.....	118
4.3.2. Efeito inibitório de manitol e DMSO sobre a emissão de luz gerada na reação de LAOOH com peroxinitrito.....	123
4.3.3. Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH com peroxinitrito utilizando DPA.....	124
4.3.4. Caracterização de oxigênio singlete gerado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com peroxinitrito.....	127
4.4. Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com ácido hipocloroso.....	130
4.4.1. Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de HOCl com hidroperóxidos.....	130
4.4.2. Efeito de D_2O e NaN_3 sobre a emissão observada na reação de LAOOH com HOCl.....	134
4.4.3. Espectro de emissão no infravermelho da luz gerada na reação de LAOOH com HOCl.....	136
4.4.4. Efeito do pH sobre a geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com HOCl.....	137
4.4.5. Efeito da concentração de LAOOH e de HOCl sobre a geração de oxigênio singlete.....	139
4.4.6. Efeito de Chelex® e manitol.....	142
4.4.7. Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de	

HOCl com hidroperóxidos de fosfatidilcolina em lipossomos.....	144
4.4.8. Caracterização do oxigênio singlete gerado na reação de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH com HOCl utilizando EAS	146
4.4.9. Detecção de radical peroxila por EPR em fluxo.....	151
5. DISCUSSÃO.....	154
5.1. Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18 para fins de estudos mecanísticos.....	154
5.2. Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com metais e confirmação do mecanismo de Russell.....	157
5.3. Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com peroxinitrito.....	163
5.4. Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com ácido hipocloroso.....	167
6. CONCLUSÕES.....	174
7. PERSPECTIVAS.....	177
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178

ANEXOS

CURRICULUM VITAE

ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS COM OS DADOS DA TESE

ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURAS: INTRODUÇÃO</u>	<u>PÁGINA</u>
Figura 1.1. Esquema geral mostrando as vias de formação de LOOH em membranas, os sistemas de defesa e a decomposição de LOOH gerando radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$): e/ou alcóxila ($\text{LO}^\bullet$).	7
Figura 1.2. Esquema representando as etapas de iniciação, propagação e terminação da peroxidação lipídica e a catálise da reação em cadeia mediada por metais (M^{n+} ou M^{n+1}).	8
Figura 1.3. Hidroperóxidos formados na peroxidação do ácido linoléico.	10
Figura 1.4. Fotooxidação de lipídios (LH) pelo mecanismo tipo I e tipo II.	12
Figura 1.5. Produtos formados na reação de $^1\text{O}_2$ com ácido linoléico.	13
Figura 1.6. Estrutura dos hidroperóxidos de colesterol formados na oxidação de colesterol por radicais livres ($\text{X}^\bullet$) e pela reação com o $^1\text{O}_2$.	15
Figura 1.7. Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos pela ação da lipoxigenase (Kühn e Borchert 2002).	17
Figura 1.8. Ciclo catalítico proposto para a redução de hidroperóxidos por GPx (Brigelius-Flohé 1999).	18
Figura 1.9. Os 5 membros da família da glutathione peroxidase (GPx).	19
Figura 1.10. Transporte de ácidos graxos livres através da membrana e translocação para outros compartimentos.	22
Figura 1.11. Mecanismo do rearranjo de Hock-Criegee para hidroperóxidos de ácido linoleico.	25

Figura 1.12. Mecanismo de formação de formação de 4-hidroxi-2-nonenal envolvendo a formação de 4-hidroperoxi-2-nonenal.	27
Figura 1.13. Mecanismo de formação de 4,5-epoxi-2-(E)-decenal na decomposição de 13-OOH catalisada por metais.	27
Figura 1.14. Esquema simplificado que mostra a formação de hidroperóxidos de cardiolipina na mitocôndria e liberação de citocromo c para o citossol na mitocôndria (Esquema de Kagan <i>et al.</i> , 2004 modificado).	33
Figura 1.15. Distribuição de elétrons no orbital atômico e molecular do oxigênio.	35
Figura 1.16. Níveis de energia do oxigênio, mostrando os dois orbitais eletrônicos da camada externa.	36
Figura 1.17. Esquema do mecanismo de Russell mostrando a formação de $^1\text{O}_2$ ou carbonila triplete ($\text{R}=\text{O}^*$).	50
Figura 1.18. Reações de decomposição de peroxinitrito após protonação ou na presença de CO_2 .	54
Figura 1.19. Reações de HOCl com insaturações, grupos amina e tiol.	56
Figura 3.1. Esquema de detecção de $\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$ (x:16 ou 18) por HPLC-MS/MS no modo MRM.	65
<u>FIGURAS: RESULTADOS</u>	
Figura 4.1. Formação de LAOOH durante a fotossensibilização de LA (0,02 g/ml em clorofórmio) com azul de metileno (0,2 mM).	83
Figura 4.2. Espectro de massa de LAOOH (A) e $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (B) adquiridos no modo de ionização <i>electrospray</i> negativa.	84

Figura 4.3. Esquema das principais fragmentações observadas para LA ¹⁸ O ¹⁸ OH no modo do ESI ⁻ -MS/MS.	85
Figura 4.4. Espectro de massa dos filhos de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH (m/z 315) e LAOOH (m/z 311) adquiridos no modo de ionização electrospray negativo.	86
Figura 4.5. Captação química de ¹ O ₂ por 9,10 difenil antraceno (DPA) gerando o endoperóxido correspondente (DPAO ₂).	87
Figura 4.6. Espectro de absorção de DPA (A) e DPAO ₂ (B).	88
Figura 4.7. Captação de ¹ O ₂ gerado na incubação de LAOOH 50 mM com Ce ⁴⁺ 50 mM na presença de diferentes concentrações de DPA a 37°C por 1 hora.	89
Figura 4.8. Cromatograma típico de quantificação de DPAO ₂ formado na incubação de 50 mM LAOOH com 50 mM Ce ⁴⁺ em presença de 60 mM DPA (B).	91
Figura 4.9. Quantificação de DPAO ₂ formado na incubação de LAOOH e Ce ⁴⁺ , LAOOH e Fe ²⁺ , LAOOH e Fe ³⁺ ou LAOOH e Fe ³⁺ na presença de ascorbato (AsA) em diferentes tempos de incubação.	93
Figura 4.10. Emissão de luz na região vermelha do visível, produzida na reação entre H ₂ O ₂ + OCl ⁻ , LAOOH + Ce ⁴⁺ e LAOOH + Fe ²⁺ .	94
Figura 4.11. Emissão de luz no infravermelho gerada na reação de LAOOH com Ce ⁴⁺ .	96
Figura 4.12. Espectro de emissão no infravermelho da luz emitida na reação entre LAOOH/Ce ⁴⁺ e H ₂ O ₂ /MoO ₄ ²⁻ .	98
Figura 4.13. Espectro de massa dos íons derivados da fragmentação de DBA (A), DPA ¹⁶ O ¹⁶ O (B), DPA ¹⁶ O ¹⁸ O (C) e DPA ¹⁸ O ¹⁸ O (D) obtidos no modo de ionização APCI-positivo.	101

Figura 4.14. Cromatograma típico de quantificação de $\text{DPA}^{\text{x}}\text{O}^{\text{x}}\text{O}$ (x: 16 ou 18) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} por HPLC-MS/MS no modo MRM.	102
Figura 4.15. Cromatograma típico de quantificação de $\text{DPA}^{\text{x}}\text{O}^{\text{x}}\text{O}$ (x: 16 ou 18) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Fe^{2+} por HPLC-MS/MS no modo MRM.	103
Figura 4.16. Porcentagem relativa de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (A), $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ (B) e $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (C) formados na incubação de 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (□) ou 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e 25 mM Ce^{4+} (■) em D_2O , D_2O deaerado, DMSO e DMSO deaerado.	105
Figura 4.17. Espectro de massa de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ obtido após incubação em clorofórmio: H_2O à 37°C por 1 h.	107
Figura 4.18. Análise de álcool marcado (LA^{18}OH) formado na incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) com Ce^{4+} (25 mM).	109
Figura 4.19. Análise de cetona marcada (LA^{18}O) na incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) e Ce^{4+} (25 mM).	110
Figura 4.20. Análise de DMPO/OOLA e $\text{DMPO}/^{18}\text{O}^{18}\text{OLA}$ por ESI^+ -MS.	113
Figura 4.21. Emissão de luz monomolecular de oxigênio singlete gerado na reação de LAOOH ou EYPCOOH com Ce^{4+} .	115
Figura 4.22. Espectro de emissão da luz gerada pelo sistema $\text{EYPCOOH}/\text{Ce}^{4+}$ no infravermelho.	116
Figura 4.23. Cinética de formação de oxigênio singlete durante a injeção de Ce^{4+} 40 mM em D_2O (Branco) ou em liposomos (concentração final 1 mM EYPC) controle ou liposomos adicionados de 10 % ou 50 % de EYPCOOH .	117
Figura 4.24. Emissão de luz bimolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação de LAOOH com ONOO^- .	119

Figura 4.25. Emissão de luz monomolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação de LAOOH com ONOO^- .	120
Figura 4.26. Efeito de NaN_3 e D_2O na intensidade de emissão de luz na reação entre LAOOH e ONOO^- .	121
Figura 4.27. Espectro de emissão da luz no infravermelho gerada na reação entre LAOOH/ ONOO^- (A), H_2O_2 / ONOO^- (B) e DMNO_2 (D).	122
Figura 4.28. Efeito de manitol e DMSO sobre a emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre LAOOH e ONOO^- .	124
Figura 4.29. Captação química de $^1\text{O}_2$ gerado na reação de LAOOH e peroxinitrito utilizando DPA.	126
Figura 4.30. Quantificação de DPAO_2 formado na reação de LAOOH (50 mM) e peroxinitrito (50 mM) em presença de DPA (60 mM) após 1 hora de incubação.	127
Figura 4.31. Caracterização de $^1\text{O}_2$ formado na reação entre $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e peroxinitrito, utilizando DPA.	129
Figura 4.32. Estruturas dos hidroperóxidos de cumeno (CuOOH), de terc-butilhidroperóxido ($t\text{-BuOOH}$) e de ácido linoléico (LAOOH).	130
Figura 4.33. Cinética de emissão de luz monitorado em 1270 nm para as reações de HOCl com H_2O_2 , LAOOH, CuOOH ou $t\text{-BuOOH}$.	132
Figura 4.34. Emissão de luz na reação de HOCl com LA, LAOH ou LAOOH.	133
Figura 4.35. Espectro de massa de LAOH sintetizado a partir da redução de LAOOH por NaBH_4 .	134
Figura 4.36. Efeito de D_2O e NaN_3 sobre a emissão de luz em 1270 nm gerada pelo sistema LAOOH/ HOCl .	135

Figura 4.37. Espectro de emissão da luz no infravermelho gerada pelo sistema LAOOH/HOCl e H ₂ O ₂ /HOCl.	136
Figura 4.38. Efeito do pH na geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com HOCl e H ₂ O ₂ com HOCl.	138
Figura 4.39. Efeito da concentração de HOCl sobre a quantidade de ¹ O ₂ gerado na reação com LAOOH.	140
Figura 4.40. Efeito da concentração de LAOOH sobre a quantidade de ¹ O ₂ gerado na reação com LAOOH.	141
Figura 4.41. Efeito de Chelex e manitol sobre a geração de ¹ O ₂ na reação de LAOOH com HOCl.	143
Figura 4.42. Cinética de formação de ¹ O ₂ durante a injeção de HOCl em lipossomos contendo diferentes concentrações de EYPCOOH.	145
Figura 4.43. Análise de EAS ^x O ^x O (x: 16 ou 18) formado na incubação de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH e HOCl na presença de EAS por HPLC-MS/MS.	147
Figura 4.44. Espectro de massa dos íons filhos de (A) m/z 228, (B) m/z 229 e (C) m/z 230.	148
Figura 4.45. Espectro de massa de EAS ^x O ^x O (x: 16 ou 18) formado na reação de HOCl com LA ¹⁶ O ¹⁶ OH ou LA ¹⁸ O ¹⁸ OH na presença de EAS.	150
Figura 4.46. Espectro de EPR em fluxo, experimental e simulado, adquirido para a reação de LAOOH com HOCl.	152
<u>FIGURAS: DISCUSSÃO</u>	
Figura 5.1. Estrutura dos isômeros de posição de LA ¹⁸ O ¹⁸ OH formados na reação de LA e ¹⁸ [¹ O ₂].	156

TABELAS	PÁGINA
Tabela 1.1. Hidroperóxidos formados na reação de ácidos graxos com $^1\text{O}_2$ e pela peroxidação lipídica.	14
Tabela 4.1. Porcentagem relativa de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ formado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 25 mM e Ce^{4+} 25 mM	106
Tabela 5.1. Proporção dos isômeros de hidroperóxidos formados na fotooxidação.	156

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: implicações biológicas

A produção de espécies reativas e as suas implicações biológicas têm sido extensamente estudadas. Sabe-se que espécies reativas derivadas tanto de oxigênio como de nitrogênio podem causar uma série de lesões em biomoléculas, incluindo proteínas (Stadtman e Levine, 2000), DNA (Marnett, 2000) e lipídios. A identificação e caracterização dessas modificações e de seus efeitos biológicos tem sido alvo de estudo de diversos grupos de pesquisadores.

O termo “espécies reativas” utilizado aqui, inclui as derivadas de oxigênio e nitrogênio. As espécies reativas de oxigênio, como o próprio nome diz, incluem espécies radicalares contendo oxigênio, como por exemplo, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical perhidroxila ($^{\bullet}OOH$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), radical alcóxila ($RO^{\bullet}$), radical peróxila ($ROO^{\bullet}$), o radical ânion carbonato ($CO_3^{\bullet-}$) e espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$), oxigênio molecular singlete (1O_2) e ozônio (O_3). As espécies reativas de nitrogênio incluem principalmente o óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO$), o dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), o trióxido de di-nitrogênio (N_2O_3) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).

As espécies reativas citadas acima diferem bastante entre si quanto a reatividade, o tempo de vida, e o destino. Dentre esses radicais o mais reativo é o $^{\bullet}OH$, o qual reage com biomoléculas a uma velocidade próxima ao limite de difusão (Halliwell e Gutteridge 1999). Esse radical pode ser produzido a partir da decomposição de H_2O_2 na presença de metais como o Fe^{2+} (reação de Fenton, Halliwell e Gutteridge 1990), na decomposição de $ONOO^-$ (Beckman *et al.* 1990;

Augusto *et al.* 1994; Merenyi e Lind, 1998), na reação de HOCl com $O_2^{\bullet-}$ ou metais (Long e Bielski, 1980; Folkes *et al.* 1995) e a partir da homólise da H_2O provocada por radiações ionizantes. Já o $O_2^{\bullet-}$ é considerado um oxidante ameno, que funciona como um importante precursor intracelular de outras espécies reativas como, por exemplo, o $^{\bullet}OOH$ que é formado por meio da protonação de $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 que é produzido por meio da dismutação de $O_2^{\bullet-}$ e o $ONOO^-$ o qual é formado na reação de $O_2^{\bullet-}$ com $^{\bullet}NO$. Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o $ONOO^-$ é um dos mais reativos. Sua reatividade deve-se principalmente a formação de outras espécies reativas, como o $^{\bullet}OH$, o $^{\bullet}NO_2$ e $CO_3^{\bullet-}$ (Beckman *et al.* 1990; Augusto *et al.* 1994; Merenyi e Lind, 1998; Bonini *et al.* 1999).

Acredita-se que uma das principais fontes de espécies reativas em sistema biológico seja a mitocôndria, onde o oxigênio molecular é reduzido a água por meio de um processo de transferência de quatro elétrons catalisada pela citocromo oxidase (Cadenas e Davies 2000). Embora a cadeia de transporte de elétrons seja um sistema eficiente, a natureza alternante dos intermediários que são oxidados e reduzidos a todo o momento possibilita as reações secundárias responsáveis pelo chamado “vazamento de elétrons”. Estudos sugerem que esse tipo de vazamento pode acontecer em diferentes pontos da cadeia de transporte de elétrons, principalmente no complexo I, no II e no III (revisão detalhada pode ser encontrada em; Cadenas e Davies, 2000; Turrens, 2003). O produto primário desse vazamento é o $O_2^{\bullet-}$, resultado da redução do oxigênio molecular por um elétron. O $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação rápida espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase, uma enzima antioxidante, produzindo H_2O_2 . Enquanto o $O_2^{\bullet-}$ possui permeabilidade limitada em membranas, o H_2O_2 é mais permeável podendo migrar para outros sítios onde pode dar origem a radicais mais potentes como o $^{\bullet}OH$ na presença de

metais ou pode ser reduzido completamente a água pela catalase ou glutathione peroxidase (GPx).

O $O_2^{\bullet-}$ também pode ser produzido em diversos processos enzimáticos. Os mais relevantes são a produção de $O_2^{\bullet-}$ mediada pelas NAD(P)H oxidases e pela xantina oxidase. As NAD(P)H oxidases estão presentes principalmente em células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) sendo ativadas durante o processo de fagocitose (Babior, 1973 e 1978). A presença desta enzima também foi evidenciada em outros tipos de células como por exemplo nas células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (Lassegue and Clempus 2003) sendo que a sua ativação têm sido relacionada a doenças cardiovasculares. A produção de $O_2^{\bullet-}$ via xantina oxidase acontece principalmente em situações de isquemia e reperfusão, situação em que ocorre a conversão proteolítica da xantina desidrogenase para xantina oxidase (Zimmerman, 1994).

Uma outra via importante de geração de espécies reativas inicia-se com a formação de $^{\bullet}NO$, uma espécie radicalar pouco reativa produzida fisiologicamente por uma classe de enzimas conhecida como óxido nítrico sintases (NOS). Dois membros desta família, a NOS endotelial e a NOS neuronal, são expressas constitutivamente e geram $^{\bullet}NO$ para fins de sinalização celular. Além destas isoformas existe uma outra induzível que promove a formação de $^{\bullet}NO$ em grandes quantidades durante reações inflamatórias e imunológicas, resultando muitas vezes em danos teciduais.

O $^{\bullet}NO$ por si só é pouco reativo, porém sua reação com $O_2^{\bullet-}$ gera um oxidante potente, o $ONOO^-$ (Beckman *et al.*, 1990). O $ONOO^-$ pode reagir diretamente com diversas biomoléculas ou sofrer reações de decomposição homolítica gerando radicais altamente oxidantes como $^{\bullet}OH$ e $^{\bullet}NO_2$ (Augusto *et al.*, 2002). Além disso,

foi demonstrado que o ONOO^- reage com CO_2 , gerando radicais ânion carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) (Bonini *et al.*, 1999).

Visto que espécies reativas são potencialmente tóxicas para a célula, sua sobrevivência depende de sistemas de defesa antioxidante. Sabe-se que as células contam com sistemas de defesa tanto enzimáticos como não enzimáticos. O primeiro inclui principalmente enzimas da família da superóxido dismutase (SOD, McCord e Fridovich, 1969; Weisiger e Fridovich, 1973, Fridovich, 1978), da catalase (Ogura e Yamazaki, 1983), da glutathione peroxidase (Brigelius-Flohé, 1999) e das peroxiredoxinas ou tioredoxina peroxidases (Chae *et al.*, 1999). A defesa não enzimática é composto basicamente por moléculas pequenas, como a vitamina E (Burton e Ingold, 1986), a vitamina C (Frei *et al.*, 1989), glutathione (Munday e Winterbourn, 1989), entre outros.

Desse modo, existe na célula um equilíbrio entre a produção de diversas espécies reativas e os mecanismos de defesa antioxidante, o qual é extremamente importante para que a célula mantenha o seu funcionamento normal. No entanto existem processos que promovem um desequilíbrio levando a célula a um estado conhecido como “estresse oxidativo”. Esse termo foi primeiramente introduzido por Sies (1991) e é definido como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro levando a um potencial dano.

Evidências crescentes apontam para o potencial envolvimento de espécies reativas em diversos processos patológicos como, por exemplo, no desenvolvimento de vários tipos de câncer, doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e envelhecimento. Além disso, sabe-se também que as espécies reativas, quando produzidas de forma controlada, exercem papel benéfico promovendo, por exemplo, a morte de bactérias durante a

fagocitose (Babior, 1978), ou mediando respostas específicas por meio da modulação de processos de sinalização celular (Patel *et al.*, 2000, Marshall *et al.*, 2000).

1.2 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: oxidação de lipídios

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem causar danos em diversas biomoléculas. Em particular, os lipídios ricos em ácidos graxos poliinsaturados, estão entre os alvos mais susceptíveis de ataque por estas espécies. Dentre os ácidos graxos poliinsaturados vale ressaltar a importância do ácido linoléico (18:2 ou LA) e o ácido araquidônico (20:4) como alvo de oxidação por estarem presentes em grande quantidade nas células de humanos (vide **Anexo I**).

O ataque aos lipídios por espécies reativas inicia um processo autocatalítico de oxidação, conhecido como peroxidação lipídica. Esse processo têm sido amplamente estudado, principalmente devido ao seu envolvimento em diversas condições patológicas, como por exemplo no desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Steinberg, 1997, Esterbauer *et al.*, 1992, Naito *et al.*, 1993, Berliner e Heinecke 1996), Alzheimer (Bermejo *et al.*, 1997, Benzi e Moretti 1995, Markesbery, 1997), artrite reumatóide (Rowley *et al.*, 1984), diabetes (Baynes 1991, Sato *et al.*, 1979), doenças gastrointestinais (Otamiri e Sjødahl, 1988, Yoshikawa, 2001), envelhecimento (Sawada e Carlson, 1987, Hirai *et al.*, 1982, Hagihara *et al.*, 1984), entre outras (vide revisão detalhada em Spiteller, 1998).

A peroxidação lipídica gera uma série de produtos, dentre os quais pode-se citar os LOOH. Esses compostos são relativamente estáveis em solução, mas uma vez formados *in vivo*, podem causar uma série de danos, que vão desde uma simples perturbação física na membrana até danos no DNA, que se não reparados podem

ser mutagênicos. Além disso, estudos recentes também sugerem o envolvimento de LOOH na modulação de vias de sinalização celular.

Nos ítems a seguir serão revisados os principais aspectos químicos e bioquímicos de LOOH (**ítem 1.3 – 1.8**), com ênfase final na geração de $^1\text{O}_2$ (**ítem 1.9**). Considerando que o ácido linoléico é um dos principais ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular, neste trabalho enfocamos principalmente no estudo dos hidroperóxidos derivados dele e muitos dos exemplos de reações apresentados serão baseados neste ácido graxo.

1.3 Hidroperóxidos de lipídios: aspectos gerais

Os LOOH são os produtos primários do processo de peroxidação lipídica (Esterbauer, 1993; Frankel 1991). Eles também podem ser formados pela ação de enzimas como a lipoxigenase (Brash 1999) e a ciclooxygenase (Hamberg e Samuelsson 1980) e por oxigênio singlete (Frankel 1985) (**Figura 1.1**). Várias classes de LOOH foram caracterizadas, dentre elas, os mais estudados são os hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, hidroperóxidos de fosfolipídios, hidroperóxidos de colesterol e hidroperóxidos de éster de colesterol.

Uma vez formados, os LOOH podem sofrer reações que reduzem e/ou aumentam a sua toxicidade. O primeiro inclui reações de redução por dois elétrons catalisadas por enzimas antioxidantes como a GPx, resultando na formação do respectivo álcool (LOH) e conseqüente redução da toxicidade do hidroperóxido (Brigelius-Flohé 1999). O segundo envolve reações de oxidação ou redução por um elétron catalisado por metais ou outros oxidantes, levando à formação de radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$) ou alcóxila ($\text{LO}^\bullet$). Esses radicais podem atacar outros lipídios promovendo a propagação da peroxidação lipídica e/ou sofrer

fragmentação gerando compostos secundários de maior reatividade e toxicidade como os aldeídos (Girotti, 1998; Esterbauer *et al.*, 1991; Dix e Marnett, 1985; Gardner e Kleiman, 1981, mais detalhes no **ítem 1.7**). Além disso, os $\text{LOO}^\bullet$ também podem reagir entre si gerando $^1\text{O}_2$ por meio do mecanismo de Russell (Russell, 1957) sendo este o aspecto investigado em detalhes neste trabalho.

Figura 1.1. Esquema geral mostrando as vias de formação de LOOH em membranas, os sistemas de defesa e a decomposição de LOOH gerando radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$) e/ou alcóxila ($\text{LO}^\bullet$). LOH corresponde ao álcool derivado da redução de LOOH . PHGPx (glutathiona peroxidase de hidropéroxido de fosfolipídios), PLA2 (fosfolipase A2) e GPx (glutathiona peroxidase) são as enzimas responsáveis pela neutralização dos LOOH .

Além das reações descritas acima, estudos recentes sugerem que os LOOH podem sofrer transferência, espontânea e/ou mediada por proteínas, para outros compartimentos celulares ou células (Vila *et al.*, 2002, 2004; Ek-von Mentzer *et al.*, 2001), e modular processos de sinalização celular (Girotti e Kriska, 2004).

1.4 Mecanismos de geração de hidroperóxidos de lipídios

1.4.1 Formação de LOOH na peroxidação lipídica

O conceito de que a peroxidação lipídica é composta de uma cadeia de reações radicalares foi primeiramente proposta na década de 40 (revisado por Uri, 1961). Desde então a reação foi estudada em detalhes, e atualmente sabe-se que ela é composta basicamente de três etapas: iniciação, propagação e terminação (Porter, 1986 e 1995; Frankel, 1991; Esterbauer, 1993) (**Figura 1.2**).

Figura 1.2. Esquema das etapas de iniciação, propagação e terminação da peroxidação lipídica e da catálise mediada por metais (M^{n+} ou M^{n+1}). $X^\bullet$ é qualquer radical capaz de abstrair um átomo de hidrogênio do lipídio (LH). $L^\bullet$ é um radical centrado no carbono formado na cadeia do lipídio. $LO^\bullet$ e $LOO^\bullet$ são os radicais

alcoxila e peroxila, respectivamente. LOOH são os hidroperóxidos de lipídios e LOH o álcool correspondente.

Na etapa de iniciação espécies suficientemente reativas ($X^\bullet$) promovem a abstração de um átomo hidrogênio bis-alílico ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) da cadeia do lipídio (LH) gerando um radical no lipídio ($L^\bullet$) centrado no átomo de carbono ($-\text{CH}=\text{CH}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}=\text{CH}-$). A habilidade de $X^\bullet$ em abstrair o átomo de hidrogênio está relacionada ao seu potencial de redução. Estima-se que o potencial de redução para o par $L^\bullet/\text{LH}$ seja de 0,6 V. Baseado neste valor as seguintes espécies reativas são capazes de iniciar a peroxidação lipídica: radical hidroxila ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{OH}$, $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O} = 2,31 \text{ V}$), perhidroxila ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{OOH}$, $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O}_2 = 1,06 \text{ V}$), alcoxila ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{RO}$, $\text{H}^+/\text{ROH} = 1,60 \text{ V}$), peroxila ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{ROO}$, $\text{H}^+/\text{ROOH} = 0,77 - 1,44 \text{ V}$), dióxido de nitrogênio ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{NO}_2/\text{NO}_2 = 0,99 \text{ V}$), peroxinitrito ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{ONOOH}$, $\text{H}^+/\text{ }^\bullet\text{NO}_2, \text{H}_2\text{O} = 1,6-1,7 \text{ V}$) e ozônio ($E^\circ \text{ }^\bullet\text{O}_3/\text{O}_3^{\bullet-} = 0,89$ e $E^\circ \text{ }^\bullet\text{O}_3^{\bullet-}, 2\text{H}^+/\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = 1,8 \text{ V}$) (Koppenol, 1990; Buettner, 1993).

O radical formado na cadeia do lipídio ($L^\bullet$) é estabilizado através de um rearranjo na estrutura 1,4-pentadieno (dieno interrompido por um grupo metilênico) formando um dieno conjugado. Em condições aeróbicas, $L^\bullet$ reage rapidamente ($k = 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; Hasegawa e Patterson, 1978) com o O_2 , produzindo radicais peroxila ($\text{LOO}^\bullet$). Estes são capazes de abstrair hidrogênio de lipídios vizinhos, gerando um outro $L^\bullet$, iniciando assim a reação de propagação em cadeia. A etapa de abstração de hidrogênio por $\text{LOO}^\bullet$ é lenta ($k = 10 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), permitindo que antioxidantes como a vitamina E possam reagir com $\text{LOO}^\bullet$ ($k = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) interrompendo a reação em cadeia (Buettner 1993). Em ambos os casos, os $\text{LOO}^\bullet$ combinam-se com um átomo de hidrogênio abstraído, formando como produto primário, LOOH.

É interessante notar, que a peroxidação lipídica gera hidroperóxidos em diferentes pontos da cadeia do lipídio. Sabe-se que a quantidade de LOOH formados a partir de diferentes ácidos graxos depende do número de duplas ligações (n) sendo igual a $2n-2$ (Esterbauer, 1993). Assim, a peroxidação do ácido linoléico (18:2), que possui duas duplas ligações, gera dois isômeros de LOOH resultantes da adição de oxigênio na posição C-9 e C-13 do radical pentadienila (Bergström, 1945) (**Figura 1.3**). Do mesmo modo a peroxidação do ácido araquidônico (20:4), que contém quatro duplas ligações, leva à formação de 6 isômeros de LOOH, resultante da adição de oxigênio na posição C-5, C-8, C-9, C-11, C-12 e C-15.

Figura 1.3. Hidroperóxidos formados na peroxidação do ácido linoléico. O composto 13-OOH corresponde ao ácido 13-hidroperóxi-9,11-octadecadienóico e o

9-OOH corresponde ao ácido 9-hidroperóxi-10,12-octadecadienóico.

A reação de propagação pode ser catalisada por metais (M^{n+}). Estes promovem a quebra de LOOH gerando $LOO^{\bullet}$ e/ou $LO^{\bullet}$ (Halliwell e Gutteridge, 1990). Normalmente, a reação catalisada por metais no estado de oxidação mais baixo, como o Fe^{2+} , promovem a formação de $LO^{\bullet}$, enquanto a reação com metais no estado de oxidação mais alto, como o Fe^{3+} , levam a formação de $LOO^{\bullet}$.

Finalmente, na etapa de terminação ocorrem reações de combinação entre radicais ($LOO^{\bullet}$ e/ou $LO^{\bullet}$) gerando dímeros e polímeros, reações intramoleculares gerando peróxidos cíclicos, endoperóxidos e epóxidos e reações de fragmentação levando a formação de aldeídos, cetonas e outros produtos secundários de cadeia mais curta (Esterbauer, 1993).

1.4.2 Formação de LOOH na fotooxidação

A fotooxidação é um processo que ocorre na presença de fotossensibilizadores luz e oxigênio. Sabe-se que as radiações não ionizantes, principalmente os raios UVA (320-400 nm) agem sobre fotossensibilizadores endógenos, gerando espécies reativas de oxigênio (Foote, 1968 e 1991). Como exemplos de fotossensibilizadores endógenos podem-se citar a riboflavina, a protoporfirina e derivados, a nicotinamida e a bilirrubina (Dalle Carbonare e Pathak, 1992; Tyrrell, 1994).

O processo de fotooxidação inicia-se com a absorção fótons de luz pelo fotossensibilizador (S), o qual é convertido ao seu estado excitado singlete ($^1S^*$). Esse estado (de meia-vida curta), por sua vez, passa rapidamente ao estado excitado tripleto ($^3S^*$) de tempo de vida maior, por meio de um cruzamento

intersistemas. O fotossensibilizador no estado $^3S^*$ pode seguir duas vias distintas, que recebem o nome de tipo I e tipo II. No mecanismo do tipo I ocorre uma transferência de elétrons ou de prótons do substrato para o fotossensibilizador formando espécies radicalares ($R^\bullet$). Já no mecanismo do tipo II ocorre uma transferência de energia do fotossensibilizador no estado $^3S^*$ para o oxigênio resultando na formação de 1O_2 (Foote, 1991).

Desse modo, os lipídios submetidos à fotooxidação podem gerar LOOH tanto pelo mecanismo do tipo I (envolvendo radicais livres) como pelo do tipo II (envolvendo 1O_2) (**Figura 1.4**). No tipo I, o sensibilizador no estado $^3S^*$ reage com o ácido graxo gerando radicais de lipídio, dando início ao processo de peroxidação lipídica, produzindo LOOH como produto primário. No tipo II, a formação de LOOH ocorre pela reação direta do 1O_2 com o ácido graxo. A importância relativa desses dois mecanismos em meio biológico vai depender de fatores como; a localização do fotossensibilizador, a cinética de reação do $^3S^*$ com substratos ou oxigênio, e a concentração relativa do substrato e do oxigênio no sistema (Foote, 1968).

Figura 1.4. Fotooxidação de lipídios (LH) pelo mecanismo tipo I e tipo II. S=fotossensibilizador, $^1S^*$ =fotossensibilizador no estado singlete excitado, $^3S^*$ =fotossensibilizador no estado triplete excitado, 3O_2 =oxigênio molecular triplete, 1O_2 =oxigênio molecular singlete, LH=lipídio, LOOH=hidroperóxido de lipídio.

É interessante notar que os LOOH gerados na reação com o $^1\text{O}_2$ são diferentes dos produtos formados na peroxidação lipídica. Por exemplo, a reação de $^1\text{O}_2$ com ácido linoléico gera uma mistura de quatro isômeros de posição de hidroperóxidos de linoleato (**Figura 1.5**) enquanto a peroxidação lipídica gera apenas dois isômeros de hidroperóxido (**Figura 1.3**).

Figura 1.5. Produtos formados na reação de $^1\text{O}_2$ com ácido linoléico. O composto 13-OOH corresponde ao ácido 13-hidroperóxi-9,11-octadecadienóico, o 12-OOH ao ácido 12-hidroperóxi-9,13-octadecadienóico, o 10-OOH ao ácido 10-hidroperóxi-8,13-octadecadienóico e o 9-OOH ao ácido 9-hidroperóxi-10,12-octadecadienóico.

Os LOOH formados na reação do $^1\text{O}_2$ com diferentes ácidos graxos foram caracterizados por Terao e Matsushita (1977 e 1980) e Frankel (1985). A **Tabela 1.1** mostra os diferentes isômeros de posição dos hidroperóxidos obtidos na fotooxidação e na peroxidação lipídica. Comparando-se os produtos formados, pode-se notar a presença de alguns isômeros formados exclusivamente na reação com o $^1\text{O}_2$, como é o caso do isômero 10-OOH e 12-OOH dos hidroperóxidos de

ácido linoléico (LAOOH), formados apenas na reação com $^1\text{O}_2$. Essa particularidade faz com que a detecção desses isômeros sirva como indicador da participação de $^1\text{O}_2$ no mecanismo de oxidação.

Tabela 1.1. Hidroperóxidos formados na reação de ácidos graxos com $^1\text{O}_2$ e pela peroxidação lipídica. Dados publicados por Terao e Matsushita (1977) e Frankel (1985).

Ácido Graxo	Posições dos hidroperóxidos	
	Oxigênio singlete	Peroxidação lipídica
Ácido Oleico (18:1) $\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{COOH}$	9 / 10	8 / 9 / 10 / 11
Ácido Linoleico (18:2) $\text{C}_5\text{H}_{11}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{COOH}$	9 / 10 / 12 / 13	9 / 13
Ácido Linolênico (18:3) $\text{C}_2\text{H}_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_7\text{H}_{14}\text{COOH}$	9 / 10 / 12 / 13 / 15 / 16	9 / 12 / 13 / 16
Ácido Araquidônico (20:4) $\text{C}_5\text{H}_{11}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}_3\text{H}_6\text{COOH}$	5 / 6 / 8 / 9 / 11 / 12 / 14 / 15	5 / 8 / 9 / 11 / 12 / 15

Produtos em negrito indicam os hidroperóxidos utilizados como marcadores de oxidação por $^1\text{O}_2$.

Os hidroperóxidos gerados na reação de $^1\text{O}_2$ com fosfolipídios e colesterol também foram caracterizados. Nos fosfolipídios, a reação de $^1\text{O}_2$ se dá com os ácidos graxos insaturados. Por exemplo, a reação de $^1\text{O}_2$ com 1-palmitoil-2-linoleoil-fosfatidilcolina resulta na formação de quatro isômeros de posição de hidroperóxidos no linoleato (Terao *et al.*, 1981). No colesterol a reação

com o $^1\text{O}_2$ produz três hidroperóxidos de colesterol característicos: o $5\alpha\text{-OOH}$, $6\alpha\text{-OOH}$ e $6\beta\text{-OOH}$ (Kulig e Smith, 1973). A via radicalar, por sua vez, produz os hidroperóxidos $7\alpha\text{-OOH}$ e $7\beta\text{-OOH}$, além de outros produtos como dióis $7\alpha\text{-OH}$ e $7\beta\text{-OH}$, 5,6-epóxidos e 7-cetona (Girotti, 1992) (**Figura 1.6**). Estima-se que o rendimento do produto $5\alpha\text{-OOH}$ seja normalmente cinco vezes maior fazendo deste hidroperóxido um indicador sensível do envolvimento de $^1\text{O}_2$ na reação (Girotti e Kriska, 2004). No entanto, existem condições que favorecem o rearranjo de $5\alpha\text{-OOH}$ a $7\alpha\text{-OOH}$, prejudicando a sua detecção. Recentemente o $5\alpha\text{-OOH}$ foi detectado na pele de ratos submetidos a fotooxidação indicando a formação de $^1\text{O}_2$ *in vivo* (Yamazaki *et al.*, 1999).

Figura 1.6. Estrutura dos hidroperóxidos de colesterol formados na oxidação de colesterol por radicais livres ($\text{X}^\bullet$) e pela reação com o $^1\text{O}_2$.

1.4.3 Formação de LOOH por reações enzimáticas

Os LOOH também podem ser formados pela ação de enzimas como as lipoxigenases ou LOX (Brash, 1999) e as ciclooxygenases ou COX (Hamberg e Samuelsson, 1980). A reação enzimática envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do grupamento bis-alílico do ácido graxo poliinsaturado numa reação altamente regioespecífica e estereoespecífica (Yamamoto, 1992). Os produtos resultantes são mais simples em termos de isômeros de LOOH produzidos quando comparados à peroxidação lipídica e à fotooxidação (Hamberg e Samuelson, 1980). Um exemplo é uma isoforma da LOX encontrada na soja que oxida o ácido linoléico, gerando como produto principal o isômero 13-OOH. De forma similar, a ação de 15-LOX e a de 12-LOX humanas sobre o ácido linoléico produzem 13-OOH e 9-OOH, respectivamente (Hamberg, 1998). Esses hidroperóxidos foram detectados em LDL oxidado e têm sido implicados na patogênese da aterosclerose (Folcik *et al.*, 1995).

Estudos mostram que as LOX podem oxidar tanto os ácidos graxos livres como os esterificados em fosfolipídios presentes em lipoproteínas. O mecanismo proposto para a formação de LOOH na reação catalisada por LOX se dá primeiramente pela sua ativação por pequenas quantidades de peróxidos. Neste processo o Fe^{2+} presente no centro catalítico é oxidado a Fe^{3+} (Schilstra *et al.*, 1992) (**Figura 1.7**). Em seguida, a forma férrica de LOX (cataliticamente ativa), promove a abstração de um átomo de hidrogênio do sistema 1,4-*cis,cis*-pentadieno do ácido graxo, gerando radical pentadienila ($\text{L}^{\bullet}$). Este, por sua vez, reage rapidamente com o oxigênio para formar um radical peroxila ($\text{LOO}^{\bullet}$). A reação completa-se com a redução de $\text{LOO}^{\bullet}$ por Fe^{2+} formando Fe^{3+} e ânion peroxila (LOO^-). Finalmente, LOO^- associa-se a um próton gerando como produto final o

LOOH. É importante ressaltar que o radical intermediário gerado durante o ciclo catalítico mantém-se em grande parte ligado a enzima o que explica a formação de produtos estereoespecíficos.

Os LOOH formados pela via enzimática, em particular os hidroperóxidos derivados ácido araquidônico, são de grande relevância biológica pois desempenham papel importante em processos fisiológicos, servindo como intermediários na síntese de prostaglandinas e outros eicosanóides biologicamente ativos.

Figura 1.7. Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos pela ação da lipoxigenase (Kühn e Borchert 2002).

1.5 Mecanismos de defesa e reparo de hidroperóxidos de lipídios

Os LOOH formados nas células podem ser convertidos a álcool (uma forma menos reativa) por meio de enzimas da família da GPx, fosfolipases e glutathione

S-transferase tipo α (Ursini *et al.*, 1991; van Kujik *et al.*, 1987) (**Figura 1.1**).

As enzimas da família da GPx são capazes de reduzir uma variedade de hidroperóxidos tanto orgânicos como inorgânicos, utilizando glutathiona (GSH) e/ou outros redutores equivalentes. Elas contêm selenocisteína no sítio ativo, o qual é sucessivamente oxidado e reduzido durante o ciclo catalítico. Nesse processo o hidroperóxido é reduzido enquanto a GSH é oxidada a sua forma disulfeto (GSSG). A GSSG, por sua vez, pode ser reduzida novamente a GSH pela glutathiona redutase na presença de NADPH (**Figura 1.8**).

Figura 1.8. Ciclo catalítico proposto para a redução de hidroperóxidos por GPx (Brigelius-Flohé 1999). ROOH representa hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos.

A GPx foi primeiramente descrita por Mills em 1957 e desde então, 5 subtipos já foram identificados (**Figura 1.9**) (revisão detalhada pode ser encontrada em: Kühn e Borchert, 2002; Brigelius-Flohé, 1999; Imai e Nakagawa, 2003). Em seu artigo, Mills (1957) sugere que a GPx possui uma função protetora contra a hemólise induzida por oxidação. Atualmente, esta enzima é considerada a GPx número 1, sendo conhecida também como GPx clássica ou citosólica (cGPx ou GPx1). É uma proteína tetramérica de 85 kDa contendo 4 subunidades idênticas de 22-23 kDa

cada uma contendo um resíduo de selenocisteína. Esta enzima encontra-se amplamente distribuída em células de diferentes tecidos. Sua principal função parece ser a redução de hidroperóxidos relativamente polares, incluindo hidroperóxidos de ácidos graxos.

A segunda forma de GPx é a GPx gastrointestinal (GPx-GI ou GPx-2), que é muito parecida com a cGPx em termos de especificidade de substratos. Também é uma proteína tetramérica, sendo encontrada principalmente no citosol de células do sistema gastrointestinal em ratos e no fígado e intestino grosso em humanos.

A terceira forma de GPx é encontrada no plasma, sendo conhecida como GPx plasmática (pGPx ou GPx-3). É uma glicoproteína tetramérica encontrada predominantemente no rim e no plasma.

Figura 1.9. Os 5 membros da família da glutathione peroxidase (GPx). A localização e as funções biológicas mais importantes de cada uma estão descritas.

A quarta forma de GPx é a GPx de hidroperóxidos de fosfolipídios (PHGPx ou GPx-4). Esta enzima foi primeiramente purificada por Ursini *et al.*, (1982) e descrita como uma proteína inibidora da peroxidação lipídica. A PHGPx difere das outras GPx por ser uma proteína monomérica de 20-22 kDa e por ser a única capaz de reduzir hidroperóxidos de fosfolipídios. Ela é encontrada no citosol e mitocôndria, sendo capaz de reduzir também o H_2O_2 , hidroperóxidos de timina (Bao *et al.*, 1997), hidroperóxidos de colesterol e de éster de colesterol (Thomas *et al.*, 1990).

A quinta e última forma de GPx é a GPx de núcleo de esperma (snGPx ou GPx-5), uma proteína de 34 kDa localizada no núcleo, recentemente identificada por Pfeifer *et al.*, (2001). Suas funções ainda não estão claras mas acredita-se que tenha um papel importante na proteção do DNA contra danos oxidativos.

Como descrito acima, LOOH simples tais como os hidroperóxidos de ácidos graxos podem ser reduzidos a hidróxidos pela GPx. Por outro lado, LOOH mais complexos como os hidroperóxidos de fosfolipídios requerem sistemas de defesa mais sofisticados, e podem envolver a ação de diversas enzimas. Os hidroperóxido de fosfolipídios podem ser reduzidos diretamente pela PHGPx. Uma outra possibilidade, envolve a ação combinada da fosfolipase A2 (PLA2) e da GPx. A PLA2 cliva a ligação éster da posição *sn*-2 onde se encontra o ácido graxo insaturado oxidado. Após liberação o ácido graxo contendo o grupamento hidroperóxido é reduzido pela GPx.

A importância da PLA2 como enzima de defesa contra hidroperóxidos de fosfolipídios foi primeiramente descrita por Sevanian (1981). Seu grupo realizou estudos onde observaram uma clivagem preferencial de membranas oxidadas em relação a não oxidadas (Salgo *et al.*, 1993) e uma atividade duas vezes maior de PLA2 em relação a lipossomos contendo hidroperóxidos de fosfolipídios

(Rashba-Step *et al.*, 1997). Baseado nesses estudos foi proposto que a clivagem preferencial de hidroperóxidos mediada pela PLA2 constituiria um importante mecanismo de reparo fosfolipídios oxidados (van Kujik *et al.*, 1987). Porém essa proposta foi recentemente criticada por Nigam e Schewe (2000), os quais não observaram uma atividade preferencial de PLA2 em relação a hidroperóxidos de fosfolipídios (Nigam e Schewe, 2000). Resultado similar a este, também foi obtido em estudo de caracterização dos mecanismos de detoxificação de hidroperóxidos de fosfolipídios na mucosa gastrointestinal de ratos (Miyamoto *et al.*, 2003c).

1.6 Absorção e translocação de hidroperóxidos de lipídios

1.6.1 Transporte e translocação de ácidos graxos e LOOH nas células

Os ácidos graxos são transportados até as células normalmente associados à albumina ou a lipoproteínas e sua concentração no sangue varia entre 0,25 a 3,0 mM dependendo do estado físico e nutricional do indivíduo (Cistola e Small 1991). O transporte desses ácidos graxos para o interior da célula e a sua translocação para outros compartimentos celulares ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo alvos de muitas pesquisas. Até o momento, ainda existem controvérsias com relação ao mecanismo de transporte de ácidos graxos através da membrana. Há estudos sugerindo que o transporte ocorra principalmente por meio de um mecanismo simples de difusão passiva ou “flip-flop” e outros sugerem que o transporte requeira o envolvimento de proteínas transportadoras, ou ambos (**Figura 1.10**) (revisão detalhada em Hamilton e Kamp, 1999).

A translocação dos ácidos graxos dentro das células também é alvo de debate. Novamente, existem duas vertentes, uma sugerindo a difusão passiva dos ácidos graxos na forma de monômeros e a outra a translocação mediada por proteínas

ligantes de ácidos graxos (fatty acid binding protein ou FABP) (Vork *et al.*, 1997, Glatz *et al.*, 1997). Algumas FABP foram isoladas e identificadas, os quais são proteínas intracelulares pequenas (~15kDa) com um ou dois sítios de ligação para ácidos graxos (Glatz *et al.*, 1997).

Figura 1.10. Transporte de ácidos graxos livres através da membrana e translocação para outros compartimentos. O ácido graxo (free fatty acids ou FFA) dissocia-se da albumina ou lipoproteína (a). Em seguida, ele atravessa a membrana por meio de um processo envolvendo uma proteína transportadora (b) ou por um processo de difusão simples conhecido como flip-flop (c). Uma vez dentro da célula, ele pode se difundir para outros compartimentos celulares ligados a proteínas ligantes de ácidos graxos (fatty acid binding protein ou FABP) (d) ou na forma de monômeros (e). Esquema adaptado de Hamilton e Kamp (1999).

Um estudo realizado com ácidos graxos oxidados derivados de ácido linoléico e do ácido araquidônico sugere que os produtos da oxidação de ácido graxos podem atravessar a membrana plasmática ou nuclear por meio de um mecanismo espontâneo e rápido (flip-flop, $t_{1/2} < 1s$) sem a participação de proteínas transportadoras (Ek-von Mentzer *et al.*, 2001). Em concordância, Jaburek *et al.* (2004) demonstraram recentemente que hidroperóxidos de ácido linoléico (LAOOH) sofrem rápido flip-flop em lipossomos, liberando prótons no interior da vesícula. A quantidade de prótons transferidos para o interior do lipossomo por LAOOH foi semelhante ao do ácido linoléico não oxidado (LA), sugerindo que a tanto o LAOOH como o ácido linoléico sofrem translocação de forma similar.

Uma vez dentro da célula, os ácidos graxos oxidados podem se ligar à FABP e serem translocados para outros compartimentos como o núcleo onde podem se ligar a receptores e modular a transcrição de genes (Glatz *et al.*, 1995). É interessante notar que a afinidade da FABP pelo produto oxidado mostrou ser maior do que pelo não-oxidado (Ek-von Mentzer *et al.*, 2001), sugerindo um efeito antioxidante dessa proteína.

Em um estudo recente foi demonstrado que uma outra proteína conhecida como proteína carreadora de esteróis ou SCP-2 (sterol carrier protein-2), um transportador de lipídios não específico, facilita a transferência intermembranas de hidroperóxidos de colesterol e de fosfolipídios (Vila *et al.*, 2004). Nesse estudo a SCP-2 aumentou a velocidade de transferência de hidroperóxidos de colesterol contidos em lipossomos para a mitocôndria, aumentando a perda de potencial de membrana mediada por hidroperóxidos (Vila *et al.*, 2004).

1.6.2 Transferência de LOOH entre células

Além da translocação intracelular de lipídios oxidados, evidências experimentais apontam para a possibilidade de transferência de LOOH entre células (Vila *et al.*, 2002, 2004). Estudos realizados com membranas de eritrócitos fotooxidados como fonte de LOOH e lipossomos como membranas aceptoras, mostraram que os hidroperóxidos de colesterol podem ser translocados a uma velocidade aproximadamente 65 vezes maior do que o colesterol não-oxidado (Vila *et al.*, 2000). Situação também observada para hidroperóxidos de fosfolipídios com relação aos fosfolipídios não-oxidados (Vila *et al.*, 2002). A constante de velocidade de primeira-ordem para a transferência espontânea determinado para os diferentes isômeros de hidroperóxidos de colesterol mostrou ser maior para os isômeros contendo o grupamento OOH (Vila *et al.*, 2001). Por essa observação sugere-se que o aumento da polaridade propicia a movimentação dos hidroperóxidos contidos na membrana para o compartimento aquoso, resultando na transferência dos hidroperóxidos para outras células (Girotti e Kriska 2004).

1.7 Reações de decomposição de hidroperóxidos de lipídios

Em situações normais, a maioria dos LOOH formados nas células são reduzidos a álcool pela GPx, porém, em situações em 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.

Os LOOH são normalmente estáveis em solução e podem ser estocados a -80°C por vários meses. No entanto, eles podem sofrer decomposição térmica ou química na presença de metais e outros oxidantes, gerando produtos tóxicos capazes de causar danos em biomoléculas. As reações de decomposição de

hidroperóxidos podem ser divididas em dois tipos: homolítica e heterolítica. A homolítica gera radicais $\text{LOO}^\bullet$ ou $\text{LO}^\bullet$ e pode ocorrer tanto pelo rompimento da ligação O-O, considerada a mais fraca nos hidroperóxidos ($\text{RO-OH} \sim 175.5 \text{ kJmol}^{-1}$ ou 40 kcal/mol), ou pelo rompimento da ligação O-H ($\text{ROO-H} \sim 368 \text{ kJmol}^{-1}$ ou 90 kcal/mol) (Gardner 1989). A heterolítica resulta em produtos não radicalares, os quais podem ser formados por meio de reações de conversão nucleofílica de hidroperóxidos a hidróxidos e pelo rearranjo de Hock/Criegee, catalisado por ácidos próticos e de Lewis (Gardner, 1989). Este rearranjo ocorre facilmente com hidroperóxidos alílicos, ou seja, hidroperóxidos que têm uma insaturação no carbono vizinho ao do hidroperóxido. No caso de 13-OOH, este rearranjo produz hexanal e 12-oxo-9-dodecenoato (**Figura 1.10**)

Figura 1.11. Mecanismo do rearranjo de Hock-Criegee para hidroperóxidos de ácido linoleico. A estruturas indicadas correspondem à 13-OOH (A), hexanal (B) e 12-oxo-9-dodecenato. R_1 : $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ e R_2 : $-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$.

Enquanto a homólise térmica ocorre a temperaturas relativamente altas, a homólise catalisada por metais acontece facilmente à temperatura ambiente. A

decomposição de LOOH catalisada por metais é importante em sistema biológico, pois além de gerar radicais ($\text{LO}^\bullet$ e/ou $\text{LOO}^\bullet$) que propagam a peroxidação lipídica, gera produtos secundários não radicalares (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) que podem causar danos em proteínas e DNA (Esterbauer *et al.*, 1991; Gardner, 1989; Frankel, 1984).

Sabe-se que a decomposição de hidroperóxido de ácido linoléico induzida por metais, como o Fe^{2+} e o Cu^+ , resultam em $\text{LO}^\bullet$, os quais sofrem fragmentação gerando principalmente 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e 4,5-epoxi-2-(*E*)-decenal (Blair, 2001). O mecanismo de formação de 4-HNE tem sido alvo de debate. Em 1990, Porter e Pryor propuseram a formação de 4-HNE, iniciando-se com a formação de um radical $\text{LO}^\bullet$, o qual sofre uma série de rearranjos e adição de oxigênio para finalmente formar o aldeído. Posteriormente, Gardner e Hamberg (1993) postularam uma outra via envolvendo 4-hidroperoxi-2-nonenal (4-HPNE), como precursor de 4-HNE. A formação de 4-HPNE como intermediário na decomposição de 13-OOH e 9-OOH foi recentemente confirmada pelo grupo de Brash (Schneider *et al.*, 2001). O mecanismo inicia-se com a abstração de um hidrogênio alílico da posição C-8 de 13-OOH, resultando em um radical localizado na posição C-10, onde ocorre a adição de uma molécula de oxigênio. Forma-se então um dihidroperóxido instável que sofre quebra (rearranjo de Hock-Criegee) na posição C-9 e C-10 resultando em 4-HPNE e ácido 9-oxo-nonâmico (**Figura 1.12**). A formação de 4,5-epoxi-2-(*E*)-decenal ocorre por meio de reações envolvendo um intermediário epóxi-hidroperóxido, que após decomposição catalisada por metais a radicais epoxi-alcoxil, sofre cisão- β (quebra da ligação C-C adjacente ao radical acoxila) originando o aldeído e um radical de hidrocarboneto que é estabilizado pela abstração de hidrogênio de outra molécula (Pryor e Porter, 1990) (**Figura**

1.13).

Figura 1.12. Mecanismo de formação de formação de 4-hidroxi-2-nonenal envolvendo a formação de 4-hidroperoxi-2-nonenal.

Figura 1.13. Mecanismo de formação de 4,5-epoxi-2-(E)-decenal na decomposição de 13-OOH catalisada por metais. R_1 : $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ e R_2 : $-(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$.

A decomposição de LOOH catalisada por metais no estado de oxidação mais

alto, resulta em $\text{LOO}^\bullet$. Esses radicais podem abstrair hidrogênio de um outro lipídio, sofrer cisão- β , gerar peróxidos cíclicos e/ou reagir com outros radicais $\text{LOO}^\bullet$ gerando $^1\text{O}_2$.

1.8 Consequências biológicas da formação de LOOH nas células

A introdução de um grupamento hidroperóxido polar na cadeia do lipídio promove modificações físicas na membrana, que resultam em alterações na fluidez e permeabilidade da membrana, comprometendo a homeostase celular (Pradham *et al.*, 1990; Girotti, 1998). Essas alterações podem resultar em perdas no balanço iônico de íons cálcio e potássio (Sugihara *et al.*, 1991), e/ou promover inativação ou ativação de receptores e enzimas ancoradas na membrana.

Além disso, conforme descrito nos itens anteriores, os LOOH podem migrar para outros sítios onde podem sofrer decomposição catalisada por metais gerando radicais ($\text{LO}^\bullet$ e $\text{LOO}^\bullet$) e uma série de produtos secundários (aldeídos, cetonas, epóxidos, entre outros) capazes de danificar uma série de biomoléculas como, por exemplo, proteínas e DNA.

1.8.1 Danos em proteínas

Dentre os danos causados por LOOH em proteínas podem-se citar as modificações causadas por hidroperóxidos de ácido linoléico em resíduos de lisina (Fruebis *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999; Refsgaard *et al.*, 2000). Essa modificação é importante, pois esse aminoácido está presente na apoproteína B-100, e mostrou-se bastante susceptível a modificações durante a oxidação de lipoproteínas (Fong *et al.*, 1987). O estudo da reação de 13-OOH (um dos isômeros de posição do hidroperóxido de ácido linoléico) com resíduos de

lisina mostrou a formação de dois tipos de adutos, a *N*^ε-hexanoil-lisina (Kato *et al.*, 1999) e a *N*^ε-azelail-lisina (Kawai *et al.*, 2003).

Várias modificações em aminoácidos causadas pelos aldeídos resultantes da decomposição de LOOH foram caracterizadas, dentre os quais os adutos formados na reação de 4-hidroxi-2-nonenal com cisteína, histidina e lisina (Uchida 2003) são os mais estudados. Uma abordagem recente utilizando técnicas de espectrometria com ionização *electrospray* e MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization - Time Of Flight / Mass Spectrometry) permitiu uma identificação direta desses adutos nas enzimas tratadas com 4-HNE (Crabb *et al.*, 2002; Musatov *et al.*, 2002).

1.8.2 Danos no DNA

As propriedades genotóxicas de LOOH têm sido bastante estudadas. Os LOOH promovem uma série de danos no DNA por meio de sua decomposição catalisada por metais gerando radicais LOO[•] e LO[•], e pela geração de produtos secundários, como, por exemplo, os aldeídos. Os principais danos reportados foram quebras na fita de DNA, oxidação de bases de guanina e formação de adutos exocíclicos.

Estudo realizado com plasmídio pBR322 mostrou que LOOH podem induzir quebra na fita de DNA (Inouye, 1984; Yang e Schaich 1996), sendo esta dependente de metais (Yang e Schaich, 1996) e localizada especificamente nos nucleotídeos de guanina (Inouye 1984). Resultado similar a este, foi observado em plasmídios incubados com ácido linoléico metilado auto-oxidado, no qual houve predomínio de modificações nas bases contendo de guanina (60 %) (Ueda *et al.*, 1985).

Níveis elevados de 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), produto de

oxidação da desoxiguanosina, foram detectados em DNA de timo de bezerro incubados com uma mistura de ácidos graxos insaturados autooxidados (Park e Floyd, 1992) e em fibroblastos incubados com hidroperóxidos de ácido linoléico e íons ferro (Kaneko e Tahara, 2000). O mecanismo químico responsável pelos danos observados ainda não está claro, mas acredita-se que ocorra por meio da formação de radicais $\text{LOO}^\bullet$ e/ou $\text{LO}^\bullet$ (Baker e He, 1991).

Os aldeídos derivados da quebra de LOOH podem formar adutos mutagênicos com as bases de DNA (Marnett, 2000; Burcham, 1999). Os principais aldeídos formados na peroxidação lipídica são o malonaldeído (MDA), o crotonaldeído (2-butenal), acroleína (2-propenal) e o 4-hidroxinonenal. Suas propriedades químicas e biológicas têm sido largamente estudadas (Esterbauer *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 2003). Estudos mostram que esses aldeídos podem danificar o DNA por meio da formação de adutos exocíclicos (adutos de MDA-DNA, etenoadutos, propanoadutos, entre outros), muitos deles tendo sido detectados em diferentes tecidos de indivíduos sadios (Marnett, 1999 e 2000; Burcham 1999; revisão detalhada em Loureiro *et al.*, 2002).

Foi verificado também, a partir da replicação de células humanas de vetores previamente modificados por $\text{LOO}^\bullet$, que esses radicais induzem predominantemente substituições nos pares de base G:C, sendo que transversões $\text{G} \rightarrow \text{T}$ foram as principais substituições observadas (Burcham e Harkin, 1999). As lesões pró-mutagênicas que levam a essas substituições ainda não foram identificadas e a identificação dos eventos químicos responsáveis pelos efeitos mutagênicos tem sido investigadas (Burcham, 1999; Valentine *et al.*, 1998).

1.8.3 Envolvimento de LOOH na sinalização e morte celular

Além de causar danos em biomoléculas, estudos recentes sugerem que os LOOH estão envolvidos em processos de sinalização celular, mediando respostas celulares específicas e causando alterações na expressão gênica (Aw, 1999; Hwang e Rhee, 1999; Rao *et al.*, 1996; Girotti e Kriska, 2004).

Alguns estudos têm sugerido um papel importante de LOOH nos mecanismos de desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons (Goglia e Skulachev, 2003, Jaburek *et al.*, 2004) e, nos mecanismos iniciais de sinalização da apoptose (CLOOH) (Kagan *et al.*, 2004).

Foi proposto que a ativação da proteína desacopladora-2 (UCP2) resulta na diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (Goglia e Skulachev 2003, Echtay *et al.*, 2002). O grupo coordenado por Brand, sugeriu que o $O_2^{\bullet-}$ e os produtos da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxinonenal, promovem a ativação direta da UCP, funcionando como um mecanismo de *feedback* de controle da produção de espécies reativas (Echtay *et al.*, 2002, 2003). De modo similar, Jaburek *et al.*, (2004) demonstraram que LAOOH servem como substratos preferenciais para a UCP2 e que a translocação rápida de LAOOH (via mecanismo flip-flop) estaria associada a um maior desacoplamento da cadeia de transporte de elétrons, e conseqüente diminuição da produção de espécies reativas. Sugerindo portanto, o potencial envolvimento de hidroperóxidos de ácidos graxos no mecanismo de controle por “*feedback*” de produção de espécies reativas na mitocôndria.

Um outro papel de importante LOOH em mitocôndrias está relacionado ao envolvimento de hidroperóxidos de cardiolipina (CLOOH) no mecanismo de apoptose (**Figura 1.14**). A cardiolipina é um fosfolípido atípico, composto por

quatro cadeias de ácidos graxos e dois grupamentos fosfato, encontrado exclusivamente na membrana interna mitocondrial (Hostetler e van den Bosh 1972, Daum 1985, Schlame *et al.*, 2000). Em mamíferos, a maior parte das cardiolipinas é composta predominantemente (~90%) por ácido linoléico (Daum 1985). A cardiolipina interage com várias proteínas da membrana interna mitocondrial, incluindo vários carreadores de ânions e certos complexos da cadeia de transporte de elétrons. Dentre eles, a interação com o citocromo c é o mais bem caracterizado e estudado (revisão detalhada em: Iverson e Orrenius 2004, Kagan *et al.*, 2004). Estudos recentes sugerem fortemente, que a oxidação da cardiolipina e formação de CLOOH seja um dos eventos iniciais críticos responsáveis pela liberação do citocromo c (Ott *et al* 2002, Petrosillo *et al.*, 2001, Shidoji *et al.*, 1999, Kagan *et al* 2004). Acredita-se que a liberação ocorra devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas/eletrostáticas resultante do aparecimento de um grupamento hidroperóxido polar na cadeia do ácido graxo da cardiolipina (Shidoji *et al.*, 1999).

Figura 1.14. Esquema simplificado que mostra a formação de hidropéroxidos de cardiolipina na mitocôndria e liberação de citocromo c para o citossol na mitocôndria (Esquema de Kagan et al., 2004 modificado).

Um outro papel importante também tem sido relatado para os hidropéroxidos de fosfatidilserina (PSOOH). A fosfatidilserina (PS) encontra-se normalmente confinada na camada interna da membrana plasmática. Durante a apoptose, a PS é externalizada, funcionando como um importante sinalizador para o reconhecimento por receptores nos macrófagos. O grupo coordenado por Kagan demonstrou em diferentes linhagens celulares que a apoptose resultava na peroxidação seletiva de fosfatidilserina, enquanto outros fosfolipídios mais abundantes, como a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina, permaneciam não-oxidados ou oxidados em menor grau (Kagan et al., 2003, Tyurina et al., 2000).

Foi verificado que o PSOOH é externalizado do mesmo modo que a PS, porém, as células com PSOOH apresentaram um maior grau de reconhecimento e fagocitose do que as células com quantidades equivalentes de PS, sugerindo que PSOOH age como um sinal adicional importante para a fagocitose.

1.9 Geração de oxigênio singlete a partir de hidroperóxidos de lipídios

1.9.1 Oxigênio singlete: aspectos gerais

O oxigênio no estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados em orbitais separados (π^*) de *spins* paralelos na sua camada eletrônica mais externa, sendo, portanto, um bi-radical (**Figura 1.15**). Diferentemente da maioria dos compostos orgânicos que possui uma multiplicidade de *spin* singlete, o oxigênio apresenta uma multiplicidade triplete ($^3\Sigma_g^-$). Apesar da característica radicalar o oxigênio no estado fundamental ou triplete é pouco reativo devido ao fato de os dois elétrons desemparelhados apresentarem o mesmo *spin* e sua redução direta por dois elétrons de *spins* antiparalelos ser proibida pela regra de conservação de *spin*. Graças a essa restrição de *spin* o oxigênio molecular é relativamente inerte.

Figura 1.15. Distribuição de elétrons no orbital atômico e molecular do oxigênio.

Por outro lado, existem situações que promovem a excitação do oxigênio fundamental, invertendo o *spin* do elétron da camada eletrônica mais externa, tornando-o bastante reativo. O oxigênio molecular excitado pode apresentar-se em dois estados distintos, o $^1\Delta_g$ e o $^1\Sigma_g^+$, tendo o primeiro estado excitado uma energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental e o segundo, uma energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental (**Figura 1.16**). O estado $^1\Sigma_g^+$, possui uma meia vida bastante curta (10^{-11} s^{-1}), decaindo imediatamente para o estado $^1\Delta_g$ ($t_{1/2}$: 1 a 4 μs em água) após a sua formação. E, portanto, considerado uma forma irrelevante para sistemas biológicos.

Figura 1.16. Níveis de energia do oxigênio, mostrando os dois orbitais eletrônicos da camada externa.

Sendo o oxigênio molecular singlete (1O_2) uma espécie excitada, ele pode decair para o estado fundamental emitindo luz. Essa luminescência é extremamente fraca e o rendimento quântico de luminescência, ou seja, a fração de moléculas de 1O_2 que decai emitindo luz em vez de decair por outras vias não-radiativas (por exemplo, desativação pelo solvente), varia em torno de 10^{-6} a 10^{-3} (Foote e Clennam, 1995).

O 1O_2 pode decair para o estado fundamental de duas formas, conhecidas como decaimento bimolecular e monomolecular. O decaimento bimolecular, como o próprio nome diz, ocorre por meio da transição simultânea de duas moléculas de 1O_2 para o estado fundamental. Esse decaimento é acompanhado por uma emissão de luz no visível centradas em 634 nm e 703 nm (**reação 1.1**) (Khan e Kasha 1963). O decaimento monomolecular envolve apenas uma molécula de oxigênio, e é acompanhado por uma emissão de luz no infravermelho centrada em 1270 nm (**reação 1.2**) (Browne e Ogryzlo 1964).

Reações mediadas por oxigênio singlete

O $^1\text{O}_2$ é altamente eletrofílico atacando compostos com insaturações e átomos com alta densidade eletrônica. As reações de $^1\text{O}_2$ com compostos contendo insaturações podem ser divididas em basicamente três tipos de reação (descritos a seguir), as quais resultam em hidroperóxidos, dioxetanos e endoperóxidos. O $^1\text{O}_2$ também pode reagir com outros grupos funcionais como sulfetos, aminas e fenóis, presentes em diversas estruturas biológicas. Desse modo o $^1\text{O}_2$ pode danificar uma série de biomoléculas incluindo dentre outros aminoácidos, lipídios e bases de DNA.

Reação do tipo ene e formação de hidroperóxidos alílicos

A reação do tipo “ene” ocorre com olefinas contendo hidrogênio alílico e leva à formação de hidroperóxidos. Nessa reação, o $^1\text{O}_2$ adiciona-se ao C1 promovendo a movimentação da dupla para uma posição adjacente e a formação de um hidroperóxido alílico (**reação 1.3**).

Um exemplo clássico dessa reação é a formação de hidroperóxidos durante o ataque de $^1\text{O}_2$ sobre ácidos graxos insaturados (**Figura 1.5**). Um outro exemplo é a oxidação do colesterol pelo $^1\text{O}_2$ gerando hidroperóxido alílico na posição 5α (3- β -hidroxi-5- α -colest-6-ene-5-hidroperóxido) (**Figura 1.6**).

Cicloadição [2+2] e formação de 1,2-dioxetanos

A cicloadição de $^1\text{O}_2$ às insaturações presentes em algumas olefinas e enaminas produz 1,2-dioxetanos. Esses peróxidos cíclicos são moderadamente estáveis e podem sofrer decomposição gerando 2 carbonilas, uma delas no estado excitado. Normalmente a carbonila excitada produzida é formada predominantemente no estado triplete, exceto em dioxetanos com substituintes ricos em elétrons onde a carbonila no estado singlete prevalece. Acredita-se que a formação de espécies excitadas por esse mecanismo seja em grande parte responsável pela luminescência fraca observada em sistema biológico (Cilento e Adam 1995).

Cicloadição [4+2] e formação de endoperóxidos

Na cicloadição do tipo Diels-Alder [4+2] o $^1\text{O}_2$ comporta-se como um poderoso dienófilo. Neste tipo de reação o $^1\text{O}_2$ adiciona-se a um dieno produzindo endoperóxidos (reação 1.5). A estabilidade desses produtos é bem variada e depende da estrutura do substrato.

Essa reação ocorre principalmente com compostos aromáticos policíclicos, tais como antracenos e seus derivados, os quais são muito utilizados como captadores químicos de $^1\text{O}_2$.

1.9.2 Métodos de detecção

O $^1\text{O}_2$ pode ser detectado por meio de (i) medidas de emissão de luz resultantes do seu decaimento para o estado fundamental por meio de fotomultiplicadoras, (ii) utilização de solventes deuterados e supressores físicos, e (iii) uso de captadores químicos específicos, como os derivados de antraceno e detecção dos endoperóxido correspondentes por técnicas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

Medidas de emissão de luz

Medidas de emissão de luz resultantes do decaimento bimolecular (**reação 1.1**) ou monomolecular (**reação 1.2**) do $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental são métodos diretos importantes para a detecção de $^1\text{O}_2$.

A emissão bimolecular pode ser monitorada por meio de fotomultiplicadoras sensíveis à região do vermelho. Este tipo de equipamento é normalmente constituído por um tubo fotomultiplicador resfriado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por refrigeradores termo-elétricos e um amplificador conectado a um sistema de aquisição como descrito por Cadenas e Sies (1984 e 2000). Considerando que a emissão observada é resultante da colisão de duas moléculas de $^1\text{O}_2$, tem-se que a intensidade de emissão é proporcional ao quadrado da concentração de $^1\text{O}_2$ como foi verificado por Kanofsky (1989). Essa técnica é bastante utilizada, porém a identificação da formação de $^1\text{O}_2$ requer a caracterização da distribuição espectral

da emissão observada, pois outras espécies excitadas também emitem nessa região, como a carbonilas tripletes que emitem entre 380 e 460 nm (**reação 1.6**).

A medida de emissão monomolecular requer instrumentos mais sofisticados sensíveis à região do infravermelho. Em 1979, Khan e Kasha desenvolveram um instrumento capaz de monitorar a emissão monomolecular, utilizando detector de chumbo e sulfeto. Posteriormente, foi desenvolvido um espectrômetro composto por detectores de fotodiodo de germânio, o qual é bastante sensível à região do infravermelho (Khan 1981). Outros sistemas foram desenvolvidos, incluindo um desenvolvido em nosso laboratório em colaboração com a empresa Edinburgh Instruments Ltd (Livingston, Reino Unido). O equipamento é composto por uma fotomultiplicadora resfriada a -80°C (sensível à região de 300 a 1400 nm) e também por um detector de germânio (sensível à região de 800 a 1700 nm) (maiores detalhes em materiais e métodos, item 3.11). Ao contrário da emissão bimolecular, a intensidade de emissão observada nessa região é diretamente proporcional a quantidade de $^1\text{O}_2$.

Efeito de solventes deuterados e supressores físicos

O uso de solventes deuterados como ferramenta para caracterizar a formação de $^1\text{O}_2$ baseia-se no fato da meia-vida de $^1\text{O}_2$ nesses solventes ser várias vezes maior (Kajiwara e Kearns 1973), sendo um fenômeno útil para obtenção de dados diagnósticos da formação de $^1\text{O}_2$ na reação. No entanto, esta técnica não é recomendável em situações onde haja a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$, pois essa espécie também apresenta um tempo de vida prolongado em solventes deuterados (Bielski e Saito 1971).

Os supressores físicos também são bastante utilizados como meio de identificar a formação de $^1\text{O}_2$. Alguns exemplos importantes são os carotenóides e a azida. Os carotenóides estão entre os primeiros compostos caracterizados como supressores de $^1\text{O}_2$. A supressão se dá por um mecanismo de transferência de energia, no qual o $^1\text{O}_2$ transfere energia para o carotenóide (C) que vai para o estado tripleto (C^*) (**reação 1.7**). É uma reação extremamente rápida, que ocorre numa velocidade perto do limite de difusão ($10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para carotenóides contendo 11 ou mais duplas conjugadas, como o licopeno (Di Mascio *et al.*, 1989). A azida é um outro supressor físico $^1\text{O}_2$ bastante utilizado. A supressão nesse caso ocorre por um mecanismo de transferência de carga, em que o $^1\text{O}_2$ interage com o doador de elétrons (D) formando um complexo de transferência de carga (reação 1.8).

Captação química

A técnica de detecção de $^1\text{O}_2$ por captação química baseia-se na formação de produtos específicos estáveis que podem ser detectados facilmente em baixas concentrações. Diferentes tipos de captadores têm sido utilizados para o monitoramento da formação de $^1\text{O}_2$, como os furanos, o colesterol, os ácidos graxos, os derivados indólicos e os derivados de antraceno (Foote *et al.*, 1984).

Os furanos foram uma das primeiras classes de captadores químicos utilizados para a detecção de $^1\text{O}_2$ em sistema biológico. A reação gera compostos dicarbonílicos por meio de um mecanismo envolvendo um intermediário

endoperóxido. Infelizmente, estes são os mais inespecíficos para o $^1\text{O}_2$, pois podem ser oxidados a compostos dicarbonílicos por quase todos oxidantes fortes (Foote *et al.*, 1984).

Uma outra classe de captadores muito utilizados são os derivados de antraceno (Bloodworth e Eggelte 1985). A reação destes com o $^1\text{O}_2$ gera endoperóxidos estáveis que podem ser facilmente detectados por HPLC (**reação 1.9**). Dentre esses captadores o mais utilizado para sistemas orgânicos é o 9,10-difenilantraceno (DPA). Este captador reage com o $^1\text{O}_2$ gerando o endoperóxido correspondentes, denominado de DPAO₂. Vários derivados hidrossolúveis de antraceno também foram desenvolvidos para utilização em sistemas aquosos. Dentre eles pode-se citar o sulfato mono-{2[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil}éster de sódio (EAS), o qual reage com $^1\text{O}_2$ gerando um endoperóxido bastante estável denominado EASO₂ (Di Mascio e Sies 1989, McCall 1984).

Outro composto freqüentemente utilizado como captador químico de $^1\text{O}_2$ é o colesterol. A reação deste com o $^1\text{O}_2$ gera um produto específico que é o 5- α -OOH, enquanto reações radiculares resultam na formação de uma mistura complexa de

hidroperóxidos (descrito anteriormente no item 1.4.2 e mostrado na Figura 1.6). Desse modo, a detecção do produto 5- α -OOH de colesterol é muito utilizada como um marcador específico para $^1\text{O}_2$ gerado em sistema biológico. Apesar do colesterol ser um componente natural de membranas, seu uso como captador químico é limitado devido à sua baixa reatividade com o $^1\text{O}_2$ ($k_r = 8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e à possibilidade de rearranjo de 5 α -OOH a 7 α -OOH (Foote e Cleenan, 1985).

Produtos específicos formados na oxidação de ácidos graxos por $^1\text{O}_2$ também têm sido utilizados como indicadores da formação de $^1\text{O}_2$ e em sistema biológico. Como exemplo pode-se citar os hidroperóxidos de ácido linoléico na posição C-10 e na C-12, os quais são formados apenas na presença de $^1\text{O}_2$ (**Tabela 1.1**).

1.9.3 Danos em biomoléculas

O $^1\text{O}_2$ é um oxidante potente capaz de reagir com compostos insaturados e átomos com alta densidade eletrônica, incluindo, dentre outros, aminoácidos, lipídios e bases de DNA.

Estudos cinéticos sugerem que as proteínas sejam os principais alvos de ataque por $^1\text{O}_2$, com danos ocorrendo principalmente nos aminoácidos, triptofano, histidina, tirosina, metionina e cisteína (Davies *et al.*, 2004). A reação com esses aminoácidos mostrou a formação principalmente de peróxidos, e de outras espécies reativas. No caso de triptofano e tirosina, ocorre primeiro a formação de endoperóxidos instáveis, que após abertura do anel, resultam em hidroperóxidos, que na presença de metais podem originar outras espécies radicalares. A formação de peróxidos também foi observada em peptídeos, proteínas isoladas e em células submetidas ao $^1\text{O}_2$. Como consequência foram observadas inativação de enzimas, agregação de proteínas e formação de ligações-cruzadas.

A reatividade de $^1\text{O}_2$ com respeito ao DNA foram estudados em detalhes, sendo que a base de guanina mostrou ser o alvo principal de ataque (Ravanat *et al.*, 2000, 2004). A 8-oxodG foi o principal produto de oxidação dectado na reação de $^1\text{O}_2$ com DNA (Floyd *et al.*, 1990, Ravanat *et al.*, 2000). A formação de 8-oxodG também foi mostrada de forma específica em células tratadas com endoperóxido marcado com oxigênio-18 (Martinez *et al.*, 2002), nos quais detectou-se 8-oxodG isotopicamente marcada (Ravanat *et al.*, 2000).

O ataque de $^1\text{O}_2$ aos lipídios, ocorre principalmente por meio de sua reação com as insaturações gerando hidroperóxidos (descritos na na ítem 1.4.2).

1.9.4 Fontes biológicas de oxigênio singlete

Vários pesquisadores têm investigado a formação $^1\text{O}_2$ em modelos químicos e em sistema biológico (revisão detalhada em Pierlot *et al.*, 2000). Dentre as possíveis fontes biológicas, destacam-se a formação de $^1\text{O}_2$ durante o processo de fagocitose na reação de H_2O_2 e HOCl (Khan e Kasha 1963); a reação de fotossensibilização mediado por fotossensibilizadores endógenos como as porfirinas (Girotti e Kriska 2004); e a formação de $^1\text{O}_2$ durante a peroxidação lipídica pelo mecanismo de Russell (1957).

Fagocitose: Reação de H_2O_2 e HOCl

A proposta de formação de $^1\text{O}_2$ como agente microbicida durante o processo de fagocitose foi primeiramente sugerida em 1972 por Allen *et al.*, baseado em estudos de luminescência. Eles observaram o aparecimento de uma luminescência após estímulo de neutrófilos com látex e o atribuíram ao decaimento radiativo de $^1\text{O}_2$ ao estado fundamental. Estudos posteriores confirmaram o aparecimento de

uma luminescência de baixa intensidade durante o processo de fagocitose (Cheson *et al.*, 1976, Kakinuma *et al.*, 1979).

Krinsky (1974) também propôs o envolvimento de $^1\text{O}_2$ na morte bacteriana levando em consideração a alta eficiência com que carotenóides realizam a supressão de $^1\text{O}_2$. Em seu estudo, observou que bactérias mutantes da linhagem branca (sem carotenóides) *Sarcina lutea*, morriam mais facilmente durante a fagocitose do que a linhagem normal (contendo carotenóides) e atribuiu essa diferença à supressão física de $^1\text{O}_2$ mediado por carotenóides. Resultado similar, foi obtido por Tatsuzawa *et al.*, (1999) utilizando linhagens de *E. coli* transformadas para produzir licopeno (um tipo de carotenóide). Eles observaram que a linhagem produtora de licopeno, um supressor físico bastante eficiente de $^1\text{O}_2$, tinha uma sobrevida maior que a linhagem selvagem.

Posteriormente, Steinbeck *et al.*, (1992) mostrou a produção intracelular de $^1\text{O}_2$ em neutrófilos utilizando partículas cobertas com DPA, um captador químico específico de $^1\text{O}_2$. Utilizando essa técnica, os autores reportaram uma taxa de conversão relativamente alta de 19% do oxigênio consumido durante a fagocitose para $^1\text{O}_2$.

Acredita-se que a formação de $^1\text{O}_2$ durante a fagocitose ocorra principalmente pelo sistema composto por mieloperoxidase (MPO), H_2O_2 e íons cloreto ($\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$). A MPO catalisa a reação de H_2O_2 e Cl^- produzindo HOCl (**reação 1.10**), que então reage com H_2O_2 gerando $^1\text{O}_2$ (**reação 1.11**). A formação de $^1\text{O}_2$ nesse sistema foi primeiramente proposto por Rosen e Klebanoff em 1977, que utilizaram furano como captador químico para $^1\text{O}_2$. Em 1984, Khan confirmou a formação de $^1\text{O}_2$ nesse sistema por meio de medidas diretas de emissão de luz no infravermelho, utilizando detector de germânio. Recentemente, Kiryu *et al.*, (1999)

demonstraram a produção de $^1\text{O}_2$ utilizando concentrações fisiológicas de MPO/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ pela detecção da emissão de luz com banda centrada na região de 1270 nm, reforçando a importância biológica dessa via para produção de $^1\text{O}_2$ durante a fagocitose.

Sabe-se que a reação de H_2O_2 e HOCl produz quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$. A primeira evidência da formação de $^1\text{O}_2$ nessa reação foi obtida por Seliger em 1960. Este observou a produção de um flash de luminescência vermelha na reação de H_2O_2 e HOCl, que apresentou uma banda de emissão centrada em 634 nm. Posteriormente, essa emissão foi estudada em detalhes por Khan e Kasha (1963 e 1970), os quais sugeriram que era resultante da transição bimolecular do $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental. Em 1963, estes autores publicaram um espectro completo de emissão da reação de H_2O_2 e HOCl na região do visível, mostrando bandas de emissão em 634 nm e 703 nm.

O mecanismo envolvido na reação de H_2O_2 e HOCl foi estudado em detalhes por Cahill e Taube (1952). Eles realizaram experimentos utilizando H_2O_2 enriquecido com o isótopo 18 do oxigênio (^{18}O) e demonstraram que ambos os oxigênios presentes no $^1\text{O}_2$ eram provenientes de H_2O_2 e não do HOCl ou da água. Estudos realizados por Held *et al.*, (1978) sugeriram que a reação em meio alcalino ocorre por meio do ataque nucleofílico do peróxido sobre átomo de cloro do HOCl, formando um intermediário instável. Em seguida, ocorre uma transferência de dois elétrons resultando na formação de $^1\text{O}_2$ cujos átomos de oxigênio derivam do

peróxido (**reação 1.12**).

Outras reações capazes de gerar ${}^1\text{O}_2$ durante a fagocitose foram sugeridas. Dentre as quais a mais relevante é a proposta de geração de ${}^1\text{O}_2$ na reação de dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Khan 1970). No entanto esta proposta é controversa, visto que estudos posteriores apresentaram evidências bastante convincentes de que a dismutação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ não gera ${}^1\text{O}_2$ (Nilsson e Kearns 1974, Foote *et al.*, 1980, Aubry *et al.*, 1981).

Fotossensibilização

A possibilidade de formação de ${}^1\text{O}_2$ como intermediário reativo em processo de fotossensibilização foi sugerida primeiramente por Kautsky (1939). A formação de ${}^1\text{O}_2$ nesse processo foi confirmada por Foote e Wexler (1964a e 1964b), os quais mostraram que os produtos gerados na presença de H_2O_2 e HOCl eram os mesmos da fotossensibilização. Processo este, que foi descrito em detalhes no **item 1.4.2**.

Reações de fotossensibilização, geralmente envolvendo o ${}^1\text{O}_2$, podem ocorrer em certas patologias. Um exemplo importante são as porfirias, doenças inatas ou adquiridas, relacionadas a defeitos na biossíntese do heme, que podem resultar em produção excessiva de porfirinas e de seus precursores. Estes podem se acumular na pele como ocorre na porfiria cutânea tarda (Sarkany 2001). Pessoas com essa patologia não devem se expor ao sol, pois a ação da luz sobre as porfirinas promove a geração excessiva de ${}^1\text{O}_2$ e outras espécies reativas,

resultando em ulcerações na pele (Halliwell e Gutteridge 1999) . A formação de $^1\text{O}_2$ na pele também pode ocorrer pela fotossensibilização de outros fotossensibilizadores endógenos, como a bilirrubina, as flavinas (FMN, FAD), e os nucleotídeos de piridina (NADH, NADPH) (Dalle Carbonare e Pathak 1992, Girotti 2001) como mencionado no **ítem 1.4.2**.

Além dos efeitos deletérios, a fotossensibilização controlada pode ser usada em certos tratamentos terapêuticos como ocorre na terapia fotodinâmica. Esta terapia tem sido utilizada para o tratamento de tumores e vários agentes fotossensibilizadores têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a eficiência e a especificidade desse tratamento. Basicamente, a terapia fotodinâmica consiste na aplicação ou administração de um agente fotossensibilizante seguida de ativação desse agente por luz de comprimento de onda específico. Isso resulta em uma sequência de eventos fotoquímicos envolvendo a formação de $^1\text{O}_2$ e espécies reativas capazes de promover a morte da célula tumoral (Dougherty 1998).

Peroxidação lipídica

Estudos de luminescência mostram que a peroxidação lipídica é normalmente acompanhada por uma emissão de luz ultra-fraca (Howes e Steele 1972, Cadenas *et al.*, 1980) a qual tem sido atribuída à formação de $^1\text{O}_2$ resultante da reação de decomposição de LOOH (Nakano 1975, Sugioka e Nakano 1976, King *et al.*, 1975). Foi observado que a emissão era proporcional ao quadrado da concentração de hidroperóxido acumulado durante a peroxidação lipídica induzida por ferro em mitocôndrias e microsossomos (Sugioka e Nakano 1976).

A proposta de formação de $^1\text{O}_2$ na peroxidação lipídica é baseada no mecanismo proposto por Russell (1957) e nas evidências obtidas por Howard e

Ingold (1968), os quais foram os primeiros a relatar a formação de $^1\text{O}_2$ na reação sec-butilhidroperóxido e íons cério (Ce^{4+}). O cério no seu estado de oxidação mais alto (Ce^{4+}) apresenta um alto potencial de redução ($E^0 = 1.28\text{-}1.71\text{ V}$), sendo muito utilizado em sistemas químicos para a geração de radicais peroxila (Dixon e Norman 1962).

Russell (1957) propôs que a reação de terminação de radicais peroxila orgânicos ($\text{ROO}^\bullet$) primários e secundários envolve um intermediário tetraóxido linear (ROOOOR) que se decompõe através de um mecanismo cíclico gerando uma cetona ($\text{R}=\text{O}$), um álcool (R-OH) e oxigênio molecular (**Figura 1.17**). Posteriormente, Howard e Ingold (1968) seguindo a sugestão de Russell, postularam a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de terminação de radicais peroxila. Russell chamou atenção para o fato de que a decomposição do intermediário tetraóxido não violaria a regra de conservação de *spin* de Wigner se o oxigênio fosse eliminado no estado singlete, $^1\Sigma_g^+$ ou $^1\Delta_g$, ou se a carbonila fosse eliminada no estado excitado triplete. Estimativas mostraram que a reação apresenta uma exotermicidade acima de 100 kcal/mol, energia suficiente para formar uma destas espécies excitadas (Kellog 1969). No entanto, estudos mostram que o rendimento de carbonila triplete excitada é menor que 0.01 % (Mendenhall *et al.*, 1991), enquanto o rendimento de $^1\text{O}_2$ está em torno de 10% (Kanofsky 1986, Niu e Mendelhall 1991), sugerindo que o $^1\text{O}_2$ é predominantemente formado na reação.

Figura 1.17. Esquema do mecanismo de Russell mostrando a reação de dois radicais peroxila resultando em um intermediário tetraóxido que se decompõe gerando como produtos, uma cetona, um álcool e oxigênio molecular. Nesta reação pode ocorrer a formação de uma cetona excitada ($\text{R}=\text{O}^*$) ou ${}^1\text{O}_2$.

1.9.5 LOOH e metais

Metais livres normalmente são encontrados em concentrações extremamente baixas no organismo. Porém o estresse oxidativo promove a mobilização de metais a partir de proteínas por mecanismos que incluem oxidação de clusters de Fe-S (presentes por exemplo em aconitase e outras desidratases) por $\text{O}_2^{\bullet-}$, alterações no estado redox de proteínas transportadoras ou armazenadoras de ferro ou cobre (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), modificações oxidativas de proteínas heme que resultam na liberação e/ou degradação do grupo heme (mioglobina e citocromo c), e oxidação de histidina com interrupção dos sítios de coordenação dos metais (Cu-Zn SOD), entre outros. Os metais liberados das proteínas são normalmente complexados com quelantes de baixo peso molecular como, por exemplo, com nucleotídeos de adenina (ATP e ADP), ácidos di e tri-carboxílicos (citrato, isocitrato, piruvato) ou fosfato.

Os metais podem direcionar a decomposição de LOOH tanto à LO[•] ou a à LOO[•]. A catálise mediada por metais depende de vários fatores como o pH, o solvente e os complexos ligantes mas em geral, metais no seu estado oxidação menor (Fe²⁺) levam a formação de LO[•] (**reação 1.13**) e enquanto metais no estado de oxidação maior (Fe³⁺) resultam em LOO[•] (**reação 1.14**)(Gardner 1989).

Como descrito na ítem 1.7, os radicais LO[•] e LOO[•] participam de reações que levam a formação de produtos secundários. Além disso os LOO[•], em particular, podem reagir com outros LOO[•] gerando ¹O₂ pelo mecanismo de Russell.

A formação de ¹O₂ na reação de LOOH e metais foi sugerido por alguns autores. Nakano *et al.* (1975) foram um dos primeiros a estudar a formação de ¹O₂ na reação de hidroperóxidos de ácido linoléico com Ce⁴⁺ porém o espectro de emissão obtido mostrou pouca correlação com a emissão bimolecular característica do ¹O₂. Kanofsky (1986) também realizou estudos onde obteve resultados indicativos da formação de ¹O₂ na reação de LAOOH e Ce⁴⁺ através do monitoramento da emissão monomolecular de ¹O₂ em 1268 nm utilizando filtros para seleção do comprimento de onda.

Apesar desses e outros autores terem sugerido a formação de ¹O₂ a partir de LOOH, as evidências encontradas mostraram-se incompletas e nenhum deles mostrou de forma clara a origem de ¹O₂ na reação e o mecanismo envolvido.

1.9.6 LOOH e proteínas contendo grupo heme

Além dos metais livres, os quais estão normalmente presentes em

quantidades muito pequenas em sistema biológico, proteínas contendo o grupo heme também podem reagir com LOOH gerando $^1\text{O}_2$. Hawco e O'Brien (1977) foram um dos primeiros a sugerir a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de hidroperóxidos de ácido linoléico e metahemoglobina ou hematina utilizando difenilfurano como captador químico. Posteriormente, Cadenas *et al.* (1980) utilizando um modelo de vesículas contendo hidroperóxidos e citocromo c, observaram uma luminescência na região vermelha do visível, o qual atribuíram a formação de $^1\text{O}_2$ baseado no aumento da emissão em presença de DABCO (1,4-diazobiciclo[2,2,2]-octano). De forma similar, Koga *et al.* (1991) também obtiveram resultados apontando a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de hidroperóxido de ácido linoléico com hematina ou citocromo c, utilizando um análogo da ciperidina-luciferina como probe.

Estudos realizados com enzimas contendo grupo heme também apontam a formação de $^1\text{O}_2$ na reação destes com hidroperóxidos orgânicos. Como exemplo pode-se citar a reação de hidroperóxidos com a lipoxigenase (Kanofsky e Axelrod, 1986) e a cloroperoxidase (Hall *et al.*, 1989). Em ambos os casos o rendimento calculado de $^1\text{O}_2$ foi de 12 %. Estes autores sugeriram que uma explicação plausível para a formação de $^1\text{O}_2$ seria *via* formação de radicais peroxila, os quais reagiriam entre si de acordo com o mecanismo de Russell gerando $^1\text{O}_2$ (1957, **Figura 1.16**). De fato, estudos que se seguiram, utilizando técnicas de detecção de radicais por EPR de fluxo contínuo, mostraram que ambas as enzimas catalisam a formação de radicais peroxila (Chamulitrat e Mason, 1989).

1.9.7 LOOH e peroxinitrito

O peroxinitrito (oxoperoxinitrato (1^-), ONOO^-) e o seu ácido conjugado (ácido peroxinitroso, ONOOH , pK_a 6.8) são agentes oxidantes potentes gerados na

reação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) com monóxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO$) (Beckman *et al.*, 1990). Estes radicais são normalmente produzidas em sistema biológico, especialmente em macrófagos ativados, neutrófilos e células endoteliais. A reação entre $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}NO$ é extremamente rápida, ocorrendo próximo do limite de difusão ($10^{10} M^{-1}s^{-1}$) (**reação 1.15**). Evidências apontam a formação de $ONOO^-$ *in vivo* e o seu envolvimento na patogênese de diversas doenças como por exemplo, doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (revisão detalhada em Radi *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2002).

O peroxinitrito é um ânion estável ($ONOO^-$) em soluções alcalinas, porém uma vez protonado ($ONOOH$, pKa 6.8) decompõe-se rapidamente com uma meia vida menor que 1 s em pH fisiológico a 37 °C, gerando 30 % de radicais $^{\bullet}OH$ e $^{\bullet}NO_2$ e 70 % de NO_3 (Beckman *et al.*, 1990; Augusto *et al.*, 1994; Merenyi e Lind, 1998). O peroxinitrito também pode reagir rapidamente ($k = 5.7 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$) com CO_2 (Lyman e Hurst 1995, Denicola *et al.*, 1996) formando um intermediário nitroso-peroxicarboxilato ($ONOOCO_2^-$), o qual sofre homólise rápida gerando $CO_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}NO_2$ com rendimento de aproximadamente 35 % (Merenyi e Lind, 1997; Lyman e Hurst, 1998; Bonini *et al.*, 1999) (**Figura 1.18**).

Figura 1.18. Reações de decomposição de peroxinitrito após protonação ou na presença de CO_2 .

O peroxinitrito reage rapidamente ($k = 10^3\text{-}10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) com várias biomoléculas, incluindo lipídios, aminoácidos e bases de DNA (Beckman *et al.*, 1990, Radi *et al.*, 2001). Dentre as biomoléculas os lipídios contendo ácidos graxos poliinsaturados são alvos chave durante a oxidação mediada por peroxinitrito. Estudos *in vitro* mostram que a reação de peroxinitrito com lipídios induz a peroxidação lipídica, gerando produtos oxidados (Radi *et al.*, 1991) e produto nitrados (O'Donnell *et al.*, 1999a e 1999b). O mecanismo proposto para a indução da peroxidação lipídica pelo peroxinitrito baseia-se na habilidade do próprio peroxinitrito e dos radicais derivados de sua decomposição em promoverem a abstração de um hidrogênio bis-aliílico da cadeia do ácido graxo.

Baseado no fato de que o peroxinitrito e os radicais derivados de sua decomposição são altamente reativos, é muito provável que eles possam promover a oxidação de LOOH por um elétron gerando LOO•, os quais por sua vez podem reagir e gerar $^1\text{O}_2$ pelo mecanismo de Russell (1957). Neste estudo serão

mostrados dados que evidenciam a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de peroxinitrito e hidroperóxido do ácido linoléico.

1.9.8 LOOH e ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso (HOCl) é produzido em sistema biológico por fagócitos na reação de H_2O_2 e íons cloreto catalisada pela enzima MPO como descrito anteriormente (**reação 1.10**) (Allen, 1994; Harrison *et al.*, 1978; Klebanoff, 1999).

A MPO encontra-se estocada em altas concentrações em grânulos azurofílicos de neutrófilos e é liberada para o interior do fagossomo durante o processo de fagocitose. Esse processo é acompanhado de um “burst” respiratório em que ocorre a ativação da NADPH oxidase e concomitante produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . O peróxido produzido é utilizado pela MPO para produção HOCl, um agente considerado fundamental no combate a microorganismos (discussões detalhadas em Hampton *et al.*, 1998). No entanto, a produção excessiva de HOCl pela MPO pode causar danos teciduais (Winterbourn e Kettle, 2000). Estudos sugerem que esse processo desempenha um papel importante no desenvolvimento de certas patologias como a arterosclerose, as inflamações crônicas e o câncer (Heinecke, 1999; Weitzman e Gordon, 1990; Spickett *et al.*, 2000).

O HOCl é uma espécie não radicalar altamente reativa capaz danificar biomoléculas importantes como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. A **Figura 1.19** ilustra as principais reações estabelecidas para HOCl e cada umas das reações será descrita sucintamente nos parágrafos seguintes. O HOCl também pode reagir com H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, metais, Cl^- e NO_2^- para formar $^1\text{O}_2$, $^{\bullet}\text{OH}$, Cl_2 e NO_2Cl , respectivamente (Khan e Kasha, 1963; Long *et al.*, 1980; Folkes *et al.*, 1995; Henderson *et al.*, 1999; Eiserich *et al.*, 1996). Essas reações são responsáveis pelo

menos em parte, pelo amplo espectro de produtos oxidados, clorados e nitrados encontrados nas reações que envolvem HOCl.

Figura 1.19. Reações de HOCl com insaturações, grupos amina e tiol.

A reação de HOCl com proteínas têm sido bastante estudada. Uma revisão detalhada da velocidade de reação de HOCl e aminoácidos, da natureza dos intermediários formados, dos mecanismos envolvidos e dos produtos formados pode ser encontrada no trabalho de Hawkins *et al.* (2003). O HOCl reage rapidamente com grupos tióis ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, para metionina e cisteína) formando o intermediário cloreto de sulfenila (RSCl) que se decompõe e gera sulfonamidas (RSO2N). Uma outra reação bastante conhecida é a de HOCl com aminas, produzindo cloraminas (RNHCl). Esses compostos são relativamente instáveis e o estudo da sua decomposição mostrou a formação de aldeídos, radicais de nitrogênio e radicais de cloro.

As modificações causadas por HOCl em ácidos nucleicos também foram estudadas. O HOCl reage com aminas exocíclicas (RNH2) ou heterocíclicas (RNHR) de bases de DNA formando cloraminas (Prutz, 1996 e 1998), que podem se decompor e gerar radicais de nitrogênio. Além desses, também foram detectados produtos clorados, como a 3-clorocitosina, 5-clorouracila,

8-cloroadenina e 8-cloroguanosina (Whiteman *et al.*, 1997; Henderson *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 2001).

Um outro alvo importante de HOCl são os lipídios presentes em membranas. O HOCl pode reagir com lipídios adicionando-se às duplas ligações de ácidos graxos insaturados e colesterol promovendo assim a formação de clorohidrininas (Winterbourn *et al.*, 1992; Carr *et al.*, 1996). No caso de fosfolipídios, além da reação de adição de HOCl a dupla (Spalteholz *et al.*, 2004), observa-se também a formação de cloraminas resultantes da reação de HOCl com grupos contendo nitrogênio encontrados na cabeça polar (Pattison *et al.*, 2003).

O HOCl também pode induzir a peroxidação lipídica em membranas e lipoproteínas, especialmente em lipoproteínas de baixa densidade conhecidas como LDL (Panassenko *et al.*, 1994). Vários produtos da peroxidação lipídica foram detectados nessas reações, incluindo dienos conjugados, aldeídos e bases de Schiff (Panassenko *et al.*, 1994 e 1997). Estudos realizados por Panassenko *et al.*, (1997) demonstraram que a presença de hidroperóxidos era fundamental para o desencadeamento da peroxidação lipídica mediada por HOCl. O mecanismo proposto sugere a formação de radicais alcóxila e peróxila os quais serviriam como iniciadores e propagadores da peroxidação lipídica. (Panassenko e Arnhold, 1999; Osipov *et al.*, 2002; Panassenko *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2002).

Com base no fato de que a interação de HOCl e hidroperóxidos orgânicos pode gerar radicais peróxila e segundo o mecanismo de Russell (Russell, 1957; Miyamoto *et al.*, 2003b) dois radicais peróxila podem se combinar gerando, como produto final, o $^1\text{O}_2$, resolvemos investigar a possibilidade de formação desta espécie na reação de HOCl e LOOH. Os resultados obtidos estão descritos nesta tese.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O estudo dos mecanismos químicos e bioquímicos pelos quais os LOOH podem danificar biomoléculas e modular processos de sinalização celular é importante para a elucidação do papel de LOOH em sistemas biológicos. Com o intuito de contribuir para a elucidação desses mecanismos, neste trabalho enfocamos a hipótese de que LOOH poderiam servir como fonte de $^1\text{O}_2$, e que esta espécie poderia estar envolvida nos processos patológicos e/ou fisiológicos mediados por LOOH.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a formação de $^1\text{O}_2$ a partir de LOOH na presença de oxidantes de relevância biológica, como os metais, o peroxinitrito e o ácido hipocloroso, bem como caracterizar os mecanismos envolvidos.

Para atingir este objetivo a primeira etapa do trabalho consistiu em sintetizar, purificar e caracterizar hidroperóxidos de ácido linoleico marcados isotopicamente com oxigênio-18 ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$). Nas etapas seguintes foram realizados estudos de caracterização e quantificação do $^1\text{O}_2$ formado nas reações de LOOH com metais, peroxinitrito ou ácido hipocloroso. Estudou-se também as particularidades de cada reação e os mecanismos envolvidos na geração de $^1\text{O}_2$ utilizando $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e técnicas baseadas em HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS), medidas de luminescência no visível e no infravermelho, e ressonância paramagnética eletrônica.

Materias e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido linoléico (LA), ácido ascórbico, azida de sódio, Desferal[®], dimetilsulfóxido (DMSO), manitol, NaBH₄, fosfatidilcolina de gema de ovo (EYPC), colesterol (Ch), linoleato de colesterol (Ch-LA), *terc*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH), hidroperóxido de cumeno (CuOOH), lipoxigenase da soja (tipo I-B contendo 15x10⁶ unidades/0,136 g), sílica gel (200-400 mesh, 60 Å) e Chelex[®] foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO). Sulfato de ferro hepta-hidratado, acetato de cádmio, azul de metileno e placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Sulfato de cério da BDH Limited (Poole, Inglaterra) foi gentilmente cedido pelo Prof. Geraldo Vicentini (IQ-USP). 9,10-Difenilantraceno (DPA), 9,10-dibromoantraceno (DBA), D₂O e sílica gel 60 (200-400 mesh) foram comprados da Aldrich e peróxido de hidrogênio 60 % foi adquirido da Peróxidos do Brasil (Paraná, Brasil).

O N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naphthalenedipropionamida (DHPN, $\epsilon_{288}=7780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi sintetizado por Martinez *et al.* (2000b). O sal dissódico de sulfato mono-{2[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil}éster de sódio (EAS, $\epsilon_{257}=131826 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e o endoperóxido correspondente (EASO₂, $\epsilon_{212}=40738 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foram sintetizados segundo o método descrito por McCall (1984).

O peroxinitrito ($\epsilon_{302}=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Hughes e Nicklin 1968), o captador de spin 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) e o 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxila (Tempol) foram gentilmente cedidos pela Prof. Ohara Augusto (IQ-USP).

Todos os solventes utilizados (acetonitrila, metanol, etanol, dietil-éter, clorofórmio, hexano) eram de nível para HPLC e foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

A água destilada utilizada foi tratada pelo sistema de purificação da Water System Nanopure da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos).

3.2 Síntese dos hidroperóxidos do ácido linoléico

A síntese de LAOOH foi realizada por fotossensibilização acrescentando-se 100 µl de uma solução de azul de metileno (0,1 M em metanol) a 1 g de ácido linoléico dissolvido em 50 ml de clorofórmio. A reação foi conduzida em um balão (pyrex, 100 ml) imerso em banho de gelo. A mistura foi irradiada com duas lâmpadas de tungstênio (500 W) por aproximadamente 5 horas. A formação de LAOOH foi monitorada medindo-se a absorbância da solução no UV a 234 nm e por cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de sílica. Alíquotas de 1 µl da solução foram colocadas sobre a placa de sílica. As amostras foram eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol (90:6, v/v).

3.3 Síntese dos hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18.

A síntese dos LA¹⁸O¹⁸OH foi realizada por fotossensibilização na presença de azul metileno em um sistema fechado saturado com ¹⁸O₂. Basicamente, 1 g de ácido linoléico foi dissolvido em 50 ml de clorofórmio previamente borbuhlado com nitrogênio gasoso a fim de remover o oxigênio do ar. A seguir, 100 µl de azul de metileno (100 mM em metanol) foi adicionado e o oxigênio contido no sistema foi removido através de três sucessivas etapas de congelamento (em nitrogênio

líquido) e descongelamento da solução sob vácuo. Após esta etapa o sistema foi conectado a um cilindro de $^{18}\text{O}_2$, mantendo-se a pressão do gás a 0,5 atm. A mistura de reação em banho de gelo foi irradiada por 5 horas com 2 lâmpadas de tungstênio (500 W).

3.4 Purificação de LAOOH ou LA $^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ por cromatografia de coluna

Os hidroperóxidos foram purificados por meio de cromatografia de coluna empacotada com sílica como descrito por Kühn *et al.* (1987). A coluna foi preparada utilizando-se 10 g de sílica (previamente dessecado a 120-150 °C por 1 hora), a qual foi equilibrada com hexano. A amostra foi concentrada no rota-evaporador e aplicada na coluna e a separação foi feita usando um gradiente de hexano 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 de 10-15 ml foram coletadas em um tubo de ensaio e analisadas por TLC utilizando como eluente clorofórmio:metanol (90:6, v/v). Após revelação com iodo, as frações contendo o hidroperóxido foram reunidas em um balão, e o solvente foi totalmente evaporado no rota-evaporador. Finalmente, o resíduo foi dissolvido em 10 ml de clorofórmio ou metanol e estocado a -20°C.

A quantificação dos hidroperóxidos foi realizada através da medida de absorbância do dieno conjugado ($\epsilon_{234}=25000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Mulliez *et al.* 1997). O total de hidroperóxido foi calculado levando-se em conta que 60% correspondem a hidroperóxidos contendo dieno conjugado. A concentração dos hidroperóxidos também foi determinada por iodometria (Buege e Aust, 1978).

3.5 Análise de LA¹⁸O¹⁸OH por espectrometria de massa

A pureza isotópica dos LA¹⁸O¹⁸OH sintetizados foi determinada pela análise por espectrometria de massa no modo negativo de ionização *eletrospray* (ESI⁻-MS), nas seguintes condições: temperatura da fonte 100°C; fluxos de gás de secagem e nebulização (nitrogênio) 300 l/h e 15 l/h, respectivamente; potenciais do capilar e do eletrodo de alta voltagem a 3,0 e 0,5 kvolts, respectivamente. A voltagem do cone utilizada foi de 20 V e a energia de colisão foi de 30 eV. Os espectros de massa no primeiro analisador foram adquiridos na faixa de 50 a 400 *m/z*.

Para a análise 20 µl da solução de LA¹⁸O¹⁸OH (300 pg/µl) foram injetados na coluna LC-18 (Supelco, 150 x 4,6 mm, 5 µm). A separação foi realizada em gradiente linear de 75 a 100% de acetonitrila em 10 min.

3.6 Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH com Ce⁴⁺

O ¹O₂ gerado na incubação de LAOOH e Ce⁴⁺ foi captado quimicamente utilizando DPA ($\epsilon_{355\text{nm}} = 9441 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Steinbeck *et al.* 1992). As incubações foram realizadas em sistema bifásico composto por clorofórmio e D₂O. Alíquotas de 100 µl de LAOOH (100 mM em clorofórmio) e 100 µl de DPA (120 mM em clorofórmio) foram adicionados a um tubo de vidro protegidos da luz. A reação foi iniciada pela adição de 200 µl do agente oxidante (sulfato de cério ou sulfato de ferro) dissolvido em D₂O. As amostras foram incubadas a 37°C no agitador Thermomixer® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 1300 rpm por 1 hora. Após a incubação, 20 µl da fase de clorofórmio foram coletados e secos sob fluxo de gás nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 100 µl de acetona e diluído em acetonitrila (125 vezes) para injeção no HPLC. Os produtos da reação foram separados em coluna Luna

LC-18 (150× 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex, CA) com um gradiente de acetonitrila em água indo de 75 a 100% em 10 min, mantendo a 100% por 7 min, e voltando a 75% em 3 min (corrida total de 30 min), a um fluxo de 0,8 ml/min. O eluente foi monitorado no detector de fotodiodos em série (PDA) (Shimadzu SPD-M10AVVP) no UV a 210 nm.

3.7 Captação química do oxigênio singlete gerado nas incubações de LA¹⁸O¹⁸OH com Ce⁴⁺

LA¹⁸O¹⁸OH foi incubado com Ce⁴⁺ em D₂O:clorofórmio (1:1, v/v) ou DMSO:clorofórmio (1:1, v/v). A solução estoque de Ce⁴⁺ foi preparada em DMSO e a solução contendo a mistura DPA e LA¹⁸O¹⁸OH foram preparados em clorofórmio. Com uma seringa 100 µl de cada solução (concentração final de Ce⁴⁺ e LA¹⁸O¹⁸OH 25 mM e de DPA 60 mM) foram misturados em um frasco âmbar vedado e incubados a 37°C por 1 hora sob agitação constante. Para a reação em condições deaeradas, as soluções estoques foram borbulhadas com nitrogênio gasoso por 20 min em banho de gelo e os frascos das reações também foram previamente purgados e saturados com nitrogênio gasoso. Após a incubação, a amostra foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 200 µl de acetona. Para os experimentos de quantificação por HPLC-M/MS, 50 µl da amostra em acetona foram misturados com 50 µl de azida 50 mM em acetonitrila e 25 µl do padrão interno (DBA) 1 mM em acetonitrila.

3.8 Análise e quantificação de DPA^xO^xO (x:16 ou 18) por HPLC-MS/MS

A caracterização isotópica do DPAO₂ formado na incubação de LA¹⁸O¹⁸OH e Ce⁴⁺ foi realizada por um sistema composto por HPLC acoplado à um detector de absorbância UV-Vis (SPD-10AVVP, Shimadzu, Tokyo, Japão) e a um espectrômetro de massa Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido) em tandem (HPLC-MS/MS). O detector de UV foi programado para detecção no comprimento de onda de 210 nm. A detecção de DPA^xO^xO (x:16 ou 18) e DBA no espectrômetro de massa foi feita no modo de ionização química a pressão atmosférica (APCI) positiva. Para a análise de DPA^xO^xO (x:16 ou 18) utilizamos as seguintes condições: temperatura do probe 300°C; temperatura da fonte 150°C, voltagem do cone 15 V e energia de colisão 15 eV. Para a análise de DBA a temperatura do probe e da fonte foram as mesmas do DPAO₂ porém a voltagem do cone foi de 20 V e energia de colisão foi de 40 eV. A separação dos produtos formados na reação foi realizada em coluna Luna C-18 (150 × 4,6 mm, 5 µm, Phenomenex) por meio de um gradiente de acetonitrila em água partindo de 75% acetonitrila, indo a 100% em 10 min, mantendo até 17 min e voltando para 75% até 20 min com fluxo de 0,8 ml/min.

Para a detecção e quantificação específica das diferentes espécies moleculares de DPA^xO^xO (x:16 ou 18) utilizamos o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) de análise no espectrômetro de massa, no qual é feita a detecção de uma transição específica do analito, selecionando-se o íon principal no primeiro quadrupolo (Q1) e após fragmentação provocada na câmara de colisão, o principal fragmento é monitorado no segundo quadrupolo (Q2) (**Figura 3.1 e Anexo IV**). A transição selecionada para DPA^xO^xO (x:16 ou 18) foi a perda de oxigênio resultando em DPA. As seguintes transições foram monitoradas: m/z 363 → 330 (DPA¹⁶O¹⁶O → DPA) ,

m/z 365 $\rightarrow$ 330 ($\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O} \rightarrow \text{DPA}$) e m/z 367 $\rightarrow$ 330 ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O} \rightarrow \text{DPA}$). Para o DBA foi monitorada a transição m/z 336 para 176, correspondente à perda de dois bromos. A quantificação foi realizada calculando-se a área relativa do pico correspondente à $\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$ em relação ao do padrão interno (DBA) e a concentração foi determinada através de uma curva de calibração.

Figura 3.1. Esquema de detecção de $\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$ (x :16 ou 18) por HPLC-MS/MS no modo MRM. Neste modo o íon pai ($\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$) é selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), este sofre fragmentação na câmara de colisão, e o íon filho de interesse (DPA) é selecionado no segundo quadrupolo (Q2).

3.9 Medidas de emissão de luz do oxigênio singlete no visível

A medida de emissão de luz do $^1\text{O}_2$ o qual ocorre em $\lambda = 634$ e 703 nm, foi realizado no equipamento contador de fótons já descrito anteriormente por Cadenas e Sies (Cadenas e Sies 2000). Basicamente, o equipamento é composto por uma fotomultiplicadora (Thor EMI 9658AM) sensível no vermelho (300-800 nm)

resfriado a -40°C por um sistema de refrigeração termoelétrico (FACT 50 MKIII, EMI Gencom, Plainview, NY), e um amplificador-discriminador (modelo 1121, Princintion Instruments, NJ), o qual é conectado ao sistema de aquisição de dados. O potencial aplicado na fotomultiplicadora foi de -1200 V . A fim de discriminar a luz emitida no decaimento bimolecular de $^1\text{O}_2$ ($\lambda = 634$ e 703 nm) de outras emissões, utilizamos um filtro de corte (*cut off filters*) que deixa passar apenas a luz de comprimento de onda maior que 570 nm .

3.10 Medidas de emissão de luz do oxigênio singlete no infravermelho

A emissão de luz do $^1\text{O}_2$ no infravermelho, o qual ocorre m $\lambda=1270\text{ nm}$ foi monitorada por meio de um sistema desenvolvido em colabaração com a empresa Edinburgh Instruments Ltd. (Livingston, Reino Unido). Este é composto por um detector de germânio e por uma fotomultiplicadora sensível à região do infravermelho (**Figura 3.2**).

O detector de germânio é bastante sensível à região do infravermelho entre 800 a 1700 nm . O sistema da Edinburgh é similar ao descrito por Di Mascio e Sies (1989), sendo composto basicamente por um detector fotodiodo de germânio (Ge PIN, modelo EI-L, originalmente da empresa North Coast Scientific Co., Santa Rosa, CA) resfriado por nitrogênio líquido; uma fonte de tensão bias (modelo PS-1) que fornece uma tensão de $\pm 12\text{ V d.c.}$ para o detector; um filtro muon (modelo MF-1) que filtra as interferências de radiações cósmicas e outras radiações ionizantes ambientais; e uma câmara escura para amostras (UC 920 sample chamber). O sinal do detector de germânio foi processado por um amplificador (Lock-in Amplifier, Benthon) e a os dados foram adquiridos pelo programa F-900 versão 6.22 (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido). Para a

análise o detector de Ge é preenchido com N₂ líquido, deixando-o equilibrar por 2 horas. As condições ótimas para a detecção de emissão de luz monomolecular do ¹O₂ foram ajustados com o endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO₂) 10 mM em clorofórmio aquecido a 40°C. As condições do amplificador utilizadas foram as seguintes: frequência do chopper 125 Hz, sensibilidade 1 mV e tempo 0,1 s.

A fotomultiplicadora é composta por um tubo fotomultiplicador (R5509) adquirido da Hamamatsu Photoniks KK (Shizuoka, Japão) sensível à região do infravermelho (800-1400 nm) a qual é refrigerada a -80°C por meio de um sistema de refrigeração por nitrogênio líquido (S600 PHOTOCOOLTM, PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA). Este sistema está conectado uma fonte de alta tensão (High Voltage DC Power Supply Model C3360, Hamamatsu Photoniks KK, Shizuoka, Japão) e um monocromador capaz de varrer as regiões do UV, visível e infravermelho (M300, Edinburgh Analytical Instruments, UK). A luz que passa no monocromador passa por grades de difração que direcionam comprimentos de ondas específicos para a fotomultiplicadora. Para o infravermelho foi utilizada uma grade capaz de varrer entre 800 a 2700 nm. Este sistema permite realizar medidas de cinética de emissão em um determinado comprimento de onda, bem como a aquisição do espectro de emissão. O controle do monocromador e a aquisição dos dados foram feitos pelo mesmo programa utilizado para o germânio.

Figura 3.2. Esquema do equipamento de detecção utilizado para as medidas de emissão de luz no infravermelho. O equipamento contém uma câmara para amostra e dois sistemas de detecção: o detector de germânio e a fotomultiplicadora acoplada a um monocromador. A foto no canto inferior esquerdo mostra uma outra fotomultiplicadora sensível a região do visível, recentemente instalada no sistema, e a foto no canto superior direito mostra uma visão mais ampla do equipamento.

As medidas de emissão de luz por este sistema foram basicamente realizadas colocando-se 1.5 - 2.0 ml de um dos reagentes na cubeta (1×1 cm), e injetando-se continuamente um segundo reagente por meio de um tubo de polietileno conectado a uma seringa controlada por uma bomba de injeção (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA). A amostra foi mantida sob constante agitação por uma pequena barra magnética inserida no interior da cubeta controlada por um agitador magnético (CUV-O-STIR[®], Modelo 333, Hellma).

3.11 Medidas de emissão de luz no visível para a reação de LAOOH com Ce⁴⁺ ou Fe²⁺

As medidas de emissão de luz no visível foi realizado com o equipamento descrito no item 3.10. Para a reação 5 ml de uma solução de LAOOH 0,2 mM foram colocados na cubeta e 100 µl de Ce⁴⁺ ou Fe²⁺ 100 mM (em metanol) foram injetados manualmente a 25°C. Como padrão para geração de ¹O₂ utilizamos o sistema peróxido de hidrogênio e hipoclorito (H₂O₂/HOCl). Para o sistema de reação H₂O₂/HOCl: 0.4 ml de uma solução concentrada de hipoclorito (0,28 M) foram injetados manualmente em 5 ml de solução de H₂O₂ (0,2 M) a 25°C contidos em uma cubeta (39 × 10 × 58 mm) sob constante agitação. As concentrações de H₂O₂ e hipoclorito foram determinados através da medida de absorbância a 240 nm ($\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e 292 nm ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, em 0,1 M NaOH), respectivamente.

3.12 Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação LAOOH com Ce^{4+} ou Fe^{2+} : cinética e espectro

As medidas da cinética de emissão de luz foram monitoradas com o detector de germânio e o espectro foi adquirido com a fotomultiplicadora, ambos descritos no item 3.11. A cinética foi monitorada durante a injeção de 0,5 ml de LAOOH 100 mM preparado em metanol (concentração final 20 mM) por meio de um tubo de polietileno em 2,0 ml de solução de Ce^{4+} 200 mM, também em metanol, a um fluxo constante de 0,7 ml/min. Para verificar o efeito da azida, 10 mM de azida de sódio foram injetados por um outro tubo de polietileno, imediatamente após a obtenção de um sinal de emissão constante para a reação de LAOOH e Ce^{4+} . O espectro foi adquirido durante a injeção de Ce^{4+} 200 mM (concentração final 40 mM) em 1,8 ml de LAOOH 100 mM, ambos em metanol. Para comparação adquiriu-se também os espectros de emissão para sistemas geradores de $^1\text{O}_2$ conhecidos como: $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$, e DMNO_2 . Para o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$, 2 ml de HOCl (0.28 M) foram injetados em 1 ml de H_2O_2 3 M (concentração final 1 M) a um fluxo constante de 1,4 ml/min e para $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$, 0,1 ml de MoO_4^{2-} (concentração final 25 mM) foram adicionados em 1,9 ml de H_2O_2 35 %. Já para a termod decomposição de DMNO_2 , incubou-se 15 mM deste composto em clorofórmio a 37 °C.

3.13 Síntese do padrão de álcool marcado com oxigênio-18 (LA^{18}OH)

O padrão de álcool marcado (LA^{18}OH) foi preparado por meio da redução de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ utilizando NaBH_4 , de acordo com o método descrito por Terao *et al.* (1988). Para a redução, 1 μmol de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ foram dissolvidos em 0,5 ml de metanol gelado. A esta solução, adicionou-se 0,5 mg de NaBH_4 e incubou-se a mistura em gelo por 1 hora. Após este período, acrescentou-se 20 μl de HCl 4 N

(pH final 3), 780 μ l de água e 1 ml de clorofórmio. A amostra foi misturada vigorosamente por 1 minuto e a fase inferior foi transferida para um outro tubo e estocado a -20°C . Para a análise no espectrômetro de massa 0,2 ml da fase de clorofórmio foram secos sob fluxo de nitrogênio e dissolvidos em 0,1 ml de hexano:isopropanol (99:1, v/v; concentração final ~ 2 mM).

3.14 Síntese do padrão de cetona marcada com oxigênio-18 (LA^{18}O)

O padrão de cetona marcada (LA^{18}O) foi preparado através da oxidação de LA^{18}OH por dicromato de potássio. Para a síntese 0.25 μmol LA^{18}OH foram dissolvidos em 0,1 ml de éter dietílico. Em seguida, adicionou-se 0,125 ml de uma solução 1000 vezes diluída de ácido crômico (97.1 mg de dicromato de potássio dissolvido em 73 μ l de ácido sulfúrico concentrado e 330 μ l de água). A reação foi mantida sob agitação constante por 30 min, e extraída com 0,1 ml de éter dietílico 3 vezes. As fases de éter foram combinados e lavados com 50 μ l de uma solução saturada de NaHCO_3 . Para a análise no espectrômetro de massa, 0,1 ml da fase de éter foram secos e dissolvidos em 0,1 ml de hexano:isopropanol (99:1, v/v; concentração final ~ 1 mM).

3.15 Análise de LA^{18}OH e LA^{18}O por HPLC-MS

A detecção dos produtos marcados com oxigênio-18, álcool (LA^{18}OH) e cetona (LA^{18}O), foram realizados por HPLC-MS (descrito em detalhes no item 3.9) O detector de UV foi programado para detecção em 234 nm.

Para a análise de LA^{18}OH a mistura de reação foi separada em coluna Luna C-18 ($150 \times 4,6$ mm, 5 μm , Phenomenex) através de um gradiente de acetonitrila em água mantendo-se em 65% acetonitrila por 30 min, indo a 100 % em 5 min e

voltando a 65 % em 5 min com fluxo de 0.6 ml/min. A detecção de LA¹⁸OH no espectrômetro de massa foi feita no modo APCI positivo, utilizando as seguintes condições: temperatura da fonte 150°C; temperatura da probe 300°C; voltagem do cone 10, 20 e 60 V; e energia de colisão 10 eV. Os espectros de massa no primeiro e no segundo analisador foram adquiridos na faixa de 40 a 400 *m/z*.

Para a análise de LA¹⁸O a mistura de reação foi separada em coluna de sílica (250 × 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex) no modo isocrático utilizando uma solução 97% de hexano em isopropanol e fluxo de 1 ml/min. A detecção de LA¹⁸OH no espectrômetro de massa foi feita no modo APCI positivo, utilizando as seguintes condições: temperatura da fonte 120°C; temperatura da probe 150°C; voltagem do cone 10 V. Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de 30 a 500 *m/z*.

Em ambas as análises o fluxo de 1 ml/min proveniente do HPLC foi reduzido a 0,35 ml/min através de um válvula.

3.16 Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH ou LA¹⁸O¹⁸OH com peroxinitrito

O ¹O₂ gerado na incubação de LAOOH ou LA¹⁸O¹⁸OH com peroxinitrito foi captado quimicamente com DPA. Para a reação 50 mM de LAOOH foram misturados com 50 mM de peroxinitrito na presença de 60 mM de DPA em um sistema bifásico composto por clorofórmio e D₂O (1:1, v/v). A mistura de reação foi agitada vigorosamente no agitador Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 1300 rpm por 1 hora a 37°C. As amostras foram diluídas 125 vezes em acetonitrila e 30 μl foram injetados e analisados no HPLC composto por uma coluna LC-18 (Supelco, 150 × 4,6 mm, 5 μm). Os produtos da reação foram separados utilizando um gradiente de acetonitrila em água, indo de 65 a 100% em

10 min, mantendo a 100% por 10 min, e voltando a 75% em 5min (corrida total de 30 min), a um fluxo de 0,6 ml/min. O eluente foi monitorado no detector de fotodiodos em série ou PDA (Shimadzu SPD-M10AVVP) no UV a 210 nm.

Para o experimento utilizando o hidroperóxido marcado, 13 mM de LA¹⁸O¹⁸OH contendo 60 mM de DPA foram misturados com 100 mM de peroxinitrito em clorofórmio:D₂O (1:1, v/v). A análise dos endoperóxidos formados foi feita como descrito no item 3.9.

3.17 Medidas de emissão de luz no visível para a reação de LAOOH com peroxinitrito

A emissão no visível foi monitorada durante a injeção de peroxinitrito 100 mM (diluído em D₂O) em 4 ml de LAOOH 10 mM em metanol. Para comparação monitorou-se também a cinética de emissão durante a injeção de HOCl 328 mM em 4 ml de H₂O₂ 20 mM diluídos em água, e a cinética de emissão resultante da termodecomposição de 6 mM de DMNO₂ em clorofórmio a 37°C. Todas as injeções foram realizadas a um fluxo constante de 0,7 ml/min.

3.18 Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação LAOOH com peroxinitrito: cinética e espectro

As medidas da cinética de emissão de luz foram realizadas tanto com o detector de germânio, como com a fotomultiplicadora. Nas cinéticas monitoradas pelo germânio, injetou-se LAOOH 100 mM (dissolvido em metanol) em 2 ml de peroxinitrito 100 mM (diluído em D₂O). Para fins de comparação, monitorou-se também a cinética de emissão para a reação de H₂O₂ com HOCl (como descrito no item anterior) e a cinética da termodecomposição de DMNO₂ 13 mM em metanol a

37°C. Para verificar o efeito de D₂O, monitorou-se a cinética de emissão durante a injeção de LAOOH 100 mM (preparado em metanol) em 2 ml de peroxinitrito 100 mM dissolvido em H₂O ou em D₂O (porcentagem final de D₂O: 67 %). Para testar o efeito da azida monitorou-se a cinética de emissão durante a injeção de peroxinitrito 100 mM (diluído em D₂O, porcentagem final 67 %) em 2 ml de LAOOH 10 mM dissolvido em metanol na ausência (controle) e na presença de azida 1 mM.

O espectro de emissão no infravermelho foi adquirido com a fotomultiplicadora realizando-se 3 repetições de varredura no intervalo de comprimento de onda de 1200 a 1350 nm. O espectro da reação de LAOOH e peroxinitrito foi adquirido durante a injeção de 1 ml de LAOOH 100 mM (diluído em metanol) em 2 ml de peroxinitrito 100 mM (diluído em D₂O 67 %) a um fluxo de 0,7 ml/min. Para fins de comparação adquiriu-se também os espectros de emissão no infravermelho de reações geradoras de ¹O₂ conhecidos como o sistema H₂O₂/OCI⁻ e DMNO₂ (descritos no item 3.12).

3.19 Efeito de manitol e DMSO sobre a emissão de luz gerada na reação de LAOOH com peroxinitrito

A cinética de emissão de luz foi monitorada na fotomultiplicadora com o monocromador fixado em $\lambda=1270$ nm. Para a reação, injetou-se peroxinitrito 100 mM em 2 ml de LAOOH 10 mM em metanol a um fluxo de 0,7 ml/min. A solução foi mantida a 37°C sob constante agitação. O efeito de DMSO foi estudado adicionando-se 0,2, 2, 10 ou 50 % de DMSO e o de manitol foi estudado adicionando-se 1 ou 5 mM de manitol na solução contendo LAOOH 10 mM.

3.20 Preparo de hipoclorito destilado

A solução de HOCl foi preparado por destilação à vácuo, a partir de uma solução comercial de hipoclorito (Candura). Aproximadamente 300 ml de Candura foram acidificados com ácido fosfórico até pH 6 (adição de aprox. 3 ml de H₃PO₄ 85 %) e destilado a uma temperatura de 40°C. A solução de hipoclorito destilado apresentou uma coloração amarelada. A concentração da solução estoque foi determinada espectrofometricamente no comprimento de onda de 292 nm ($\epsilon=350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Morris 1966) diluindo-se a solução em NaOH 0.1 M. A solução destilada foi estocada a -20°C, sendo diluída em 10 mM NaOH preparado em H₂O ou D₂O para a realização dos experimentos.

3.21 Síntese de DHPNO₂

O DHPNO₂ foi preparado a partir da fotossensibilização de DHPN, como descrito anteriormente (Martinez *et al.* 2000b, Pierlot *et al.* 2000). Resumidamente, uma solução contendo 220 mg de DHPN em 3 ml de D₂O e 20 μl de azul de metileno (8 mg/ml) foi submetida à irradiação sob lâmpada de tungstênio (500 W) por 6 horas. A solução foi mantida em banho de gelo durante todo o tempo da irradiação. Após fotooxidação, o azul de metileno foi removido acrescentando-se Chelex[®] e deixando-se a solução sob agitação por aproximadamente 10 minutos. Em seguida a solução foi filtrada através de um filtro de 0,45 μm de diâmetro (Millex[™] LCR com membrana PTFE, Millipore) e estocada em tubos corning de 1,5 ml a -80 °C. A concentração foi determinada medindo-se a absorbância em 288 nm, antes e depois de aquecido a 50 °C por 2 horas. Nesse comprimento de onda a medida da absorção corresponde ao anel naftalênico ($\epsilon_{288}= 7780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.22 Síntese dos hidroperóxidos de fosfatidilcolina

Os hidroperóxidos de fosfatidilcolina (EYPCOOH) foram sintetizados por fotossensibilização e por síntese enzimática utilizando lipoxigenase de soja. Para a fotossensibilização, 50 µl de azul de metileno (10 mM em metanol) foram adicionados em 200 mg de EYPC dissolvidos em 2 ml de metanol e 10 ml de clorofórmio. A solução foi irradiado por uma lâmpada de tungstênio de 500 W por 8 horas. A formação do produto oxidado foi verificado por cromatografia em camada delgada (TLC) eluindo-se a placa com a mistura de solvente clorofórmio/metanol/H₂O (1/10/0,5, vol/vol). Os produtos na placa de TLC foram visualizados com iodo. A purificação de EYPCOOH foi realizado por HPLC, usando uma coluna C8 (150 x 6,5 mm, 5 µm, Tosoh, Japão). A coluna foi eluída com metanol 98 % a fluxo de 1 ml/min. Os picos correspondentes ao EYPCOOH foram monitorados em UV 235 nm e coletados. A concentração de EYPCOOH foi determinado por iodometria.

Para a síntese enzimática, 38,8 mg de EYPC foram misturados com 207 mg de deoxicolato de sódio na presença de aproximadamente 1 ml de clorofórmio. Em seguida o solvente foi completamente evaporado sob fluxo de nitrogênio e sob vácuo por 30 minutos. Após secagem, adicionou-se 18 ml de tampão borato pH 9 e 10 mg de lipoxigenase. A mistura foi incubada no escuro por 1 hora e o lipídio foi extraído adicionando-se 20 ml de clorofórmio:metanol (1:1 v,v). A extração foi repetida três vezes e as fases contendo clorofórmio foram reunidas e evaporadas no rota-evaporador. O resíduo contendo o hidroperóxido foi dissolvido em 1 ml de metanol e estocada a -20°C. A purificação e a quantificação foram realizadas como descrito acima.

3.23 Análise de fosfatidilcolina e de seus hidroperóxidos por espectrometria de massa

A fosfatidilcolina e os hidroperóxidos sintetizados a partir dela foram analisados por espectrometria de massa no modo de ionização electrospray positivo (ESI⁺-MS). A análise foi realizada por meio de injeção direta de 10 µl de uma solução 1 mM de EYPCOOH ou EYPC no espectrômetro de massa utilizando como fase móvel acetonitrila:0,5 % de ácido fórmico (1:1, v/v) a um fluxo de 0,05 ml/min. As seguintes condições foram utilizadas: temperatura da fonte 150°C; temperatura de dessolvatação 150 °C; fluxos de gás de secagem e nebulização (nitrogênio) mantidos a 300 l/h e 15 l/h, respectivamente; potenciais do capilar e do eletrodo de alta voltagem a 3.5 e 0.5 kVolts, respectivamente; resolução 13,5; voltagem do cone 20, 30 e 40 V. Os espectros de massa no primeiro analisador foram adquiridos na faixa de 100 a 1000 m/z.

3.24 Preparo de lipossomos

Lipossomos de membrana unilamelar com diâmetro de poro de 100 nm foram preparados através da técnica de extrusão (Miyamoto *et al.* 2003c). Resumidamente, 4 mg de EYPC contendo 0, 5, 10, 20 ou 50 % de EYPCOOH dissolvidos em clorofórmio foram secos sob fluxo de nitrogênio e sob vácuo por 30 min. A camada residual do lipídio foi então resuspenso em 1 ml de tampão fosfato de potássio 0,15 mM, pH 7,4 em D₂O. A solução foi agitado vigorosamente no vortex por 1 min e sonificado por 30 segundos. Para obtenção dos lipossomos unilamelares a solução foi filtrada 21 vezes através de filtros de membrana de policarbonato de 100 nm utilizando o kit Liposofast[®] (Avestin Inc., Ottawa, Canadá). As soluções de lipossomo foram preparados no dia do uso.

3.25 Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH e hipoclorito usando EAS

O $^1\text{O}_2$ formado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com hipoclorito foi monitorado utilizando-se o captador químico hidrossolúvel EAS. Para a reação, injetou-se 85 μl de uma solução 100 mM de hipoclorito em 10 mM NaOD em 0,75 ml de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 5 mM dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 in D_2O contendo 8 mM de EAS. Uma alíquota de 20 μl dessa mistura foi analisado por HPLC-MS/MS no modo ESI⁻. A separação do EASO_2 de EAS foi realizada em coluna de fase reversa Luna LC-18 (150 $\times$ 4,6 mm, 5 μm , Phenomenex, CA), usando um gradiente de acetonitrila (solvente B) e formiato de amônio 25 mM (solvente A) a um fluxo de 0,8 ml/min. O seguinte gradiente foi utilizado: 12 % a 15 % B em 15 min, indo a 20 % em 2 min e a 60 % em 3 min, mantendo a 60 % por 5 min e finalmente retornando a 12 % em 3 min. Para a análise no espectrômetro de massa, utilizou-se as seguintes condições no espectrômetro de massa: temperatura da fonte 120°C; voltagem do cone 10 V; e potenciais do capilar e do eletrodo, 3,0 e 0,5 kV, respectivamente. A aquisição dos dados foi realizada no modo scan total na região de massa de 100–500 m/z. Os produtos também foram monitorados no UV em 210 nm.

3.26 Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de hidroperóxidos e hipoclorito

As medidas de emissão de luz no infravermelho foram realizadas na fotomultiplicadora (descrita no item 3.10) em 1270 nm. Para a reação, injetou-se 0,17 ml de HOCl 10 mM por meio de um tubo de polietileno em 1,5 ml de uma

solução de LAOOH, EYPCOOH, *tert*-butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide, H₂O₂ ou liposomos preparado em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em D₂O, a um fluxo de 0,7 ml/min. Para o estudo do efeito do pH, soluções de LAOOH foram preparadas em tampão fosfato 0,1 M nos pHs 6,0, 7,0, 8,0, e 9,2. Para o teste do efeito da azida, manitol e Desferal[®] adicionou-se 15 µl de uma solução estoque 100 mM de cada um preparado em D₂O (concentração final 1 mM) em 1,5 ml de LAOOH 1 mM dissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em D₂O contendo 0.1 % de metanol. Para verificar o efeito de metais, o tampão fosfato foi tratado com Chelex[®] 100 por 48 horas.

3.27 Medida do espectro emissão de luz no infravermelho gerado na reação de LAOOH e hipoclorito

O espectro de emissão no infravermelho foi adquirido utilizando a fotomultiplicadora acoplada a um monocromador descrito no item 3.10. Para a obtenção do espectro foram feitos 5 scans na região de 1180-1350 nm. O espectro de emissão da luz gerada pelo sistema LAOOH/HOCl foi adquirido durante a injeção de hipoclorito 10 mM (preparado em NaOD 10 mM) em 1,5 ml de LAOOH 1 mM diluído em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,4 preparado em D₂O. Para comparação adquiriu-se também o espectro de emissão do ¹O₂ gerado durante a injeção de 2 ml de HOCl (0.28 M, 1.4 ml/min) em 1 ml de H₂O₂ 3 M (concentração final 1 M).

3.28 Cálculo da quantidade de oxigênio singlete utilizando DHPNO₂

O cálculo da quantidade de ¹O₂ a partir dos dados de emissão monomolecular de ¹O₂ foi feito utilizando uma fonte conhecida de ¹O₂ como referência. A fonte utilizada foi o DHPNO₂, o qual gera quantidades conhecidas de ¹O₂ a uma

determinada temperatura. Primeiramente foram realizadas medidas da cinética de emissão em 1270 nm resultante da termólise de DHPNO₂ 10 mM em tampão fosfato 0.1 M pH 7,4 preparado em D₂O a 37 °C. Em seguida, calculou-se a área sob a curva de emissão e baseado nos dados de velocidade de geração de ¹O₂ a partir de DHPNO₂, obteve-se um valor onde uma unidade de área corresponde a 5 nM de ¹O₂. Detalhes do cálculo estão descritos no Anexo II.

3.29 Detecção de radicais peroxila por EPR em fluxo

O espectro de EPR dos radicais peroxila formados na reação de LAOOH e HOCl foi adquirido a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com o espectrômetro de ressonância paramagnética Bruker EMX equipado com uma cavidade de ER4117 D-MTV com 9 mm de distância entre a câmara de mistura e o centro da cavidade. Os dois reagentes (reagente I, 28 mM de HOCl em solução aquosa contendo 5 mM de NaOH e reagente II, 28 mM de LAOOH em 45 mM de tampão fosfato contendo 50 % de acetonitrila) foram preparados imediatamente antes do ensaio e transferidos para seringas de plástico de 20 ml. Estas seringas foram colocadas num bomba injetora (Harvard apparatus pump 22) em que as amostras foram simultaneamente injetadas a um fluxo de 13,6 ml/min para cada seringa, resultando em um fluxo final de 27,2 ml/min após mistura. Essas condições, permitiram o registro dos espectros ~2 ms após a mistura. O campo magnético foi calibrado com TEMPOL, o qual possui um valor de $g = 2.0056$ (Mehlhorn e Keith 1972). A simulação do espectro foi realizado com o programa WimSIM (EPR calculations for MS-Windows NT 95, versão: 0.96) do PEST (Public EPR Software Tools) construído por Duling (1994).

3.30 Determinação da constante de supressão ou “quenching”

Para a medida da constante de “quenching” utilizou-se a fenalenona para a geração de $^1\text{O}_2$. Soluções estoque de LA, EYPC, Ch, e Ch-LA 100 mM e fenalenona 8 mg/ml foram preparados em clorofórmio/metanol (1/1, v/v). Para cada lipídio, foram preparados diluições de 0,01 a 0,1 M contendo fenalenona (70 μl) num volume final de 1 ml. Essa mistura foi irradiada com pulsos de laser Nd:YAG (Surelite III, Continuum, Santa Clara, CA) ajustado para emitir em 355 nm e a emissão de luz resultante, foi filtrada por um filtro de silicone, que corta emissões < 1000 nm, e por um filtro de interferência (Spectrogon US, Inc) que deixa passar somente a luz de comprimento de onda 1270 nm. O monitoramento da luminescência foi feita por uma fotomultiplicadora (descrita no item 3.10) ajustada para adquirir emissões em 1270 nm. Os dados foram adquiridos pelo software Multiscaler, MAS 300, versão 2.21 (Becker&Hickl, GmbH, Berlim). Todos os ensaios foram realizados em uma cubeta de quartzo para fluorescência de 1 ml (Sigma, St Louis, MO).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Síntese e caracterização dos hidroperóxidos do ácido linoleico marcados com oxigênio-18 (LA¹⁸O¹⁸OH)

Os LA¹⁸O¹⁸OH foram sintetizados por fotossensibilização na presença de azul de metileno. As condições ideais para a sua síntese foram estabelecidas realizando-se inicialmente a síntese de LAOOH na presença de oxigênio-16 (¹⁶O₂). A formação de LAOOH foi monitorada medindo-se a absorbância da solução no UV a 234 nm, correspondente aos dienos conjugados, (**Figura 4.1.A**) e por cromatografia de camada delgada (TLC) (**Figura 4.1.B**).

Como esperado, a quantidade de LAOOH formado durante a irradiação aumentou gradativamente com o tempo, atingindo um patamar após 4 horas. A análise dos dienos conjugados e a análise por TLC mostraram que após 3 horas de irradiação, mais de 50 % do ácido linoleico (LA) haviam sido consumidos e que após 4 horas a proporção de LAOOH já era superior ao de LA, não havendo incrementos significativos de LAOOH após 5 horas de irradiação. Após esse período, observou-se a formação de uma outra banda indicando a formação de outros produtos de oxidação (**Figura 4.1.B**).

A síntese de LA¹⁸O¹⁸OH foi realizada em um sistema fechado, tomando-se o cuidado em vedar bem o sistema e de remover todo o oxigênio (¹⁶O₂) contido no sistema. Após 5 horas de irradiação os LA¹⁸O¹⁸OH foram purificados por cromatografia em coluna de sílica, e a formação dos LA¹⁸O¹⁸OH foi confirmada por espectrometria de massa no modo ESI⁻ (**Figura 4.2.**).

Figura 4.1. Formação de LAOOH durante a fotossensibilização de LA (0,02 g/ml em clorofórmio) na presença de azul de metileno (0,2 mM). (A) Monitoramento da formação de LAOOH pela medida de dieno conjugado ($\lambda=234$ nm). (B) Monitoramento do consumo de LA e formação de LAOOH por TLC.

O espectro de massa obtido para LAOOH mostrou dois íons principais um de m/z 311 e outro de m/z 293, correspondentes ao íon pseudomolecular ($[M-H]^-$) e ao íon resultante da perda de uma molécula de água, ($[M-H-H_2O]^-$), respectivamente (**Figura 4.2 A**). Da mesma forma, o espectro de $LA^{18}O^{18}OH$ também apresentou dois íons principais, sendo um de m/z 315 e outro m/z 295, correspondentes ao íon pseudomolecular ($[M-H]^-$) e ao produto resultante da perda de água marcada ($[M-H-H_2^{18}O]^-$) (**Figura 4.2 B**). A comparação das massa dos íons pseudomoleculares obtidos para LAOOH e $LA^{18}O^{18}OH$ mostra um incremento de quatro u.m.a (unidades de massa atômica), o que indica a incorporação de dois átomos de oxigênio-18 na molécula do hidropéroxido.

O espectro de $LA^{18}O^{18}OH$ mostra também um pico bastante pequeno de m/z 311. A integração das áreas relativas dos picos de m/z 315 e de m/z 311 mostrou que

há um predomínio de mais de 99 % do marcado em relação ao não marcado (**Figura 4.2 B**).

Figura 4.2. Espectro de massa de LAOOH (A) e LA¹⁸O¹⁸OH (B) adquiridos no modo de ionização electrospray negativa. Voltagem do cone 20 V.

Com o intuito de obter informações a respeito da estrutura desses hidroperóxidos, os íons principais observados para LAOOH (m/z 311) e LA¹⁸O¹⁸OH (m/z 315) foram selecionados no primeiro analisador (Q1) e após fragmentação induzida por colisão, os fragmentos resultantes foram analisados no segundo analisador (Q2) no modo scan total (maiores detalhes sobre a espectrometria de massa em tandem estão descritos no Anexo IV).

Fragmentos característicos indicativos da posição do hidroperóxido são mostrados na **Figura 4.3**. Estes fragmentos resultam da perda consecutiva de água e quebra da dupla ligação alílica ao grupamento peroxila como proposto por MacMillan e Murphy (1995). Para os hidroperóxidos marcados ocorre a perda de uma molécula de água marcada (H_2^{18}O) deixando ainda um átomo de oxigênio-18 na molécula de partida. Deste modo, a quebra da dupla alílica resulta em fragmentos contendo oxigênio-18, como é o caso dos fragmentos de m/z 115, 155, 185 e 225 derivados da fragmentação dos isômeros de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ contendo o grupamento hidroperóxido na posição 13, 10, 9 e 12, respectivamente.

Figura 4.3. Esquema das principais fragmentações observadas para os isômeros de posição de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$.

Os fragmentos da Figura 4.3 foram observados tanto para LAOOH como para $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, como mostra a **Figura 4.4**. O espectro dos íons filhos para esses hidroperóxidos, mostrou íons de m/z 113, 153, 183 e 223 para LAOOH e de m/z 115,

155, 185 e 225 para $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ correspondentes aos fragmentos característicos dos hidroperóxidos na posição 13, 9, 10 e 12, respectivamente. O incremento de duas u.m.a observadas para os íons filhos de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ em relação aos de LAOOH , indicam que esses fragmentos possuem um átomo de oxigênio-18, o que está de acordo com a fragmentação proposta na Figura 4.3.

Figura 4.4. Espectro de massa dos filhos de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (m/z 315) e LAOOH (m/z 311) adquiridos no modo de ionização electrospray negativa. Voltagem do cone 20 V e energia de colisão 30 V.

4.2 Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e metais

4.2.1 Utilização de DPA como captador químico para oxigênio singlete

Derivados aromáticos de antraceno são muito utilizados como captadores químicos específicos para $^1\text{O}_2$ (Bloodworth e Eggelte, 1985). A detecção dos endoperóxidos correspondentes fornece evidência da presença de $^1\text{O}_2$ no meio de reação. Neste estudo utilizamos o DPA como captador químico específico para $^1\text{O}_2$. O $^1\text{O}_2$ reage rápida e especificamente com o DPA ($k_r = 1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) gerando um endoperóxido estável denominado DPAO₂ (Corey e Taylor, 1964; Wasserman *et al.*, 1972; Turro *et al.*, 1981) (**Figura 4.5.**). Esta reação é reversível quando aquecida a 120 °C (Wasserman *et al.*, 1972).

Figura 4.5. Captação química de $^1\text{O}_2$ por 9,10-difenilantraceno (DPA) gerando o endoperóxido correspondente (DPAO₂).

O padrão de DPAO₂ foi sintetizado a partir da irradiação de DPA. A síntese baseia-se no fato de que DPA absorve energia luminosa sendo convertido a um estado tripleto excitado (**reação 4.1**). Este transfere energia para o oxigênio molecular gerando $^1\text{O}_2$, o qual por sua vez, reage com DPA formando DPAO₂ (**reação 4.2**).

O consumo de DPA durante a irradiação foi monitorado por meio de medidas de absorbância no UV. O espectro de absorção de DPA apresenta picos de absorção característicos em 355, 375 e 395 nm (**Figura 4.6.A**). A formação de DPAO₂ resulta na perda de absorção nestes comprimentos de onda o qual ocorre devido à perda da conjugação- π no anel aromático (**Figura 4.6.B**).

Figura 4.6. Espectro de absorção de DPA (A) e DPAO₂ (B).

Após irradiação a síntese de DPAO₂ foi confirmada por espectrometria de massa, o qual mostrou a presença de um íon majoritário de m/z 363, correspondente ao íon molecular de DPAO₂.

Dados na literatura mostram que a concentração de DPA necessária para captar metade do ¹O₂ formado (valor β) é de 13,8 mM. Experimentos foram realizados com o intuito de determinar a concentração ótima de DPA necessária para a captação de ¹O₂ gerado na incubação de LAOOH e Ce⁴⁺. Para isso, LAOOH (50 mM) e Ce⁴⁺ (50 mM) foram incubados na presença de diferentes concentrações de DPA (**Figura 4.7**). O resultado mostrou que a quantidade de DPAO₂ detectado nas incubações varia linearmente com a concentração de DPA até 30 mM, atingindo um patamar acima dessa concentração. Esse resultado sugere que concentrações de DPA acima de 30 mM são necessários para que haja captação máxima de ¹O₂ na reação de LAOOH e Ce⁴⁺ nas condições testadas.

Figura 4.7. Captação de ¹O₂ gerado na incubação de LAOOH 50 mM com Ce⁴⁺ 50 mM na presença de diferentes concentrações de DPA a 37°C por 1 hora. O DPAO₂ formado na incubação foi quantificado por HPLC com detecção no UV em 210 nm.

4.2.2 Quantificação de oxigênio singlete na reação de LAOOH com Ce^{4+} ou Fe^{2+} usando DPA

Estudos mostram que metais podem catalisar a decomposição de hidroperóxidos a radicais peroxilas e esses radicais podem gerar $^1\text{O}_2$ pelo mecanismo de Russell (Russell, 1957; Howard e Ingold, 1968). Com o objetivo de caracterizar a geração de $^1\text{O}_2$ a partir de radicais peroxilas derivados de LAOOH, incubamos este hidroperóxido com íons Ce^{4+} e Fe^{2+} e quantificamos o $^1\text{O}_2$ gerado utilizando DPA.

A **Figura 4.8** mostra o cromatograma típico de análise por HPLC de DPAO_2 formado na incubação de LAOOH (50 mM) com Ce^{4+} (50 mM) na presença de DPA (60 mM). Os produtos formados na reação foram monitorados no UV em 210 nm e os picos correspondentes a DPA e DPAO_2 foram identificados comparando-se os tempos de retenção com os dos respectivos padrões (**Figura 4.8.A**).

Como esperado, os cromatogramas das incubações controles contendo apenas DPA ou DPA e LAOOH, apresentaram um pico de DPAO_2 de baixa intensidade, correspondente ao DPAO_2 basal. Por outro lado, a incubação contendo LAOOH e Ce^{4+} mostrou um aumento expressivo na quantidade de DPAO_2 , indicando a formação de $^1\text{O}_2$ na reação. A quantificação desses endoperóxido mostrou que a reação gera $^1\text{O}_2$ com um rendimento de $6,6 \pm 1.1$ %. Esse valor foi estimado levando em conta que a reação consumiu 50 % de LAOOH (determinado por análise dos produtos por HPLC).

O rendimento obtido está em concordância com os valores reportados por Niu e Mendenhall (1990) os quais relataram um rendimento de 3,4 – 6 % de $^1\text{O}_2$ para a reação de hidroperóxidos orgânicos primários e rendimentos entre 3,9 – 14 % para a

reação de hidroperóxidos secundários. Rendimento similar também foi reportado por Kanofsky (1984).

Figura 4.8. Cromatograma típico de quantificação de $DPAO_2$ formado na incubação de $LAOOH$ 50 mM com Ce^{4+} 50 mM na presença de DPA 60 mM. **A.** Cromatograma dos padrões de $DPAO_2$ e DPA . **B.** Cromatograma das incubações controle (contendo apenas DPA), $LAOOH$ e $LAOOH$ e Ce^{4+} , todos contendo DPA 60 mM. A detecção foi feita no UV em $\lambda=210nm$.

A formação de 1O_2 também foi estudada na reação de $LAOOH$ com Fe^{2+} ou Fe^{3+}

e comparada com a reação de LAOOH com Ce^{4+} na presença de DPA (**Figura 4.9.**). A quantidade de DPAO_2 detectado após 1 hora de incubação com Ce^{4+} foi 3 vezes maior que na incubação com Fe^{2+} ou Fe^{3+} e ascorbato. O ascorbato é um redutor eficiente, e, portanto o ferro contido nessa mistura encontra-se no estado reduzido. Dentre os dois estados de oxidação do ferro, observou-se que a forma oxidada (Fe^{3+}) não gera $^1\text{O}_2$ na reação com o hidroperóxido, enquanto a reação com Fe^{2+} forma $^1\text{O}_2$ com um rendimento em torno de 4 % após 12 horas de incubação.

Esses resultados mostram que a cinética de formação de $^1\text{O}_2$ é mais rápida na reação de LAOOH com Ce^{4+} do que com Fe^{2+} e que a incubação com Fe^{3+} não gera $^1\text{O}_2$. A diferença observada para Ce^{4+} e Fe^{2+} provavelmente está relacionada à diferença no potencial de redução de cada metal. O Ce^{4+} possui um elevado potencial de redução, $E^0 = 1,28-1,71 \text{ V}$, sendo, portanto um potente oxidante capaz de gerar radicais peroxila (Dixon e Norman, 1962) com maior eficiência. Por outro lado o Fe^{2+} possui um potencial de redução menor ($E^{0'} \sim 0,11\text{V}$) e sua reação com LAOOH gera radicais alcóxila. Estes por sua vez, podem sofrer um rápido rearranjo seguido de adição de oxigênio para gerar radicais epoxi-peroxila. O fato da incubação com Fe^{3+} não gerar $^1\text{O}_2$, provavelmente está relacionado ao fato dele não ser um eficiente oxidante para hidroperóxidos de lipídios (Davies e Slater, 1987).

Figura 4.9. Quantificação de $DPAO_2$ formado na incubação de LAOOH e Ce^{4+} , LAOOH e Fe^{2+} , LAOOH e Fe^{3+} ou LAOOH e Fe^{3+} na presença de ascorbato (AsA) em diferentes tempos de incubação. A reação foi conduzida na presença de 50 mM de LAOOH, 50 mM do metal e 60 mM de DPA em D_2O -clorofórmio (1:1, v/v) a 37°C.

4.2.3 Medidas de emissão de luz na reação de LAOOH com Ce^{4+} ou Fe^{2+}

A fim de confirmar a formação de 1O_2 na reação de LAOOH com Ce^{4+} ou Fe^{2+} , realizamos medidas de emissão de luz no visível e no infravermelho. Sabe-se que as principais espécies emissoras de luz geradas na reação de radicais peroxila pelo mecanismo de Russell são a carbonila no estado excitado triplete e o oxigênio no estado singlete. O primeiro emite luz na região do azul-verde do visível (reação 1.6) e o segundo emite na região do vermelho (reação 1.1) e no infravermelho (reação 1.2). A emissão do 1O_2 na região do vermelho resulta do decaimento bimolecular e a emissão na região do infravermelho resulta do decaimento monomolecular (descrito no item 1.91 da introdução).

4.2.3.1 Medidas de emissão de luz na região do visível

A emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$ foi monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível à região do vermelho utilizando um filtro de corte que deixa passar apenas luz de comprimento de onda maior que 570 nm. Como padrão de fonte química de $^1\text{O}_2$ utilizou-se a reação entre peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hipoclorito que gera quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$ (reação 1.11) (Khan e Kasha, 1963).

Figura 4.10. Emissão de luz na região vermelha do visível, produzida na reação entre $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OCl}^-$, $\text{LAOOH} + \text{Ce}^{4+}$ e $\text{LAOOH} + \text{Fe}^{2+}$.

Como esperado a injeção de uma solução concentrada de hipoclorito (0,28M) em solução contendo H_2O_2 (0,2 M) produziu uma emissão de luz intensa (Figura 4.10). De modo similar, a injeção de 0,1 ml de Ce^{4+} (100 mM, concentração final 2 mM) ou

Fe^{2+} (100 mM, concentração final 2 mM) em solução de LAOOH (0,2 mM) também produziu uma emissão de luz, porém de menor intensidade. A emissão de luz observada foi maior na reação de LAOOH com Ce^{4+} do que com Fe^{2+} , consistente com os dados obtidos nos experimentos utilizando captação química, em que se observou uma cinética de formação de DPAO_2 mais rápida para o Ce^{4+} do que para o Fe^{2+} . Como discutido anteriormente, essa diferença provavelmente está relacionada à diferença no potencial de redução dos dois metais e no fato de que a reação de LAOOH com Ce^{4+} gera radicais peroxila, enquanto a reação com o Fe^{2+} gera radicais alcoxila.

4.2.3.2 Medidas de emissão de luz na região do infravermelho

Evidências adicionais da formação de $^1\text{O}_2$ na reação entre LAOOH e Ce^{4+} , foram obtidas através de medidas de emissão de luz na região do infravermelho utilizando um detector fotodiodo de germânio. Este detector é bastante sensível à região espectral do infravermelho, entre 800 a 1800 nm, sendo muito utilizado em estudos de caracterização de $^1\text{O}_2$. A **Figura 4.11** mostra o sinal de emissão de luz obtido durante a injeção de LAOOH em solução de Ce^{4+} , ambos em metanol. Observa-se um sinal de emissão bastante intenso que se mantém constante durante a injeção de LAOOH. Este sinal decai rapidamente tão logo para-se a injeção de LAOOH. Com o intuito de verificar se o sinal de luz é resultante do decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$ testamos o efeito da NaN_3 , um forte supressor físico de $^1\text{O}_2$. A injeção desse supressor durante a injeção de LAOOH resultou numa queda brusca da emissão, sugerindo a formação de $^1\text{O}_2$ no sistema.

Figura 4.11. Emissão de luz no infravermelho gerada na reação de LAOOH com Ce^{4+} . A emissão foi monitorada pelo detector fotodiodo de germânio. Para a reação 0,5 ml de LAOOH (100 mM em metanol) foram injetados continuamente (0,7 ml/min) em 2 ml de Ce^{4+} (200 mM em metanol). Repetiu-se o mesmo experimento no qual após obtenção de um sinal estável de emissão, injetou-se NaN_3 (10 mM) por meio de um outro tubo.

4.2.3.3 Medida do espectro de emissão de luz na região do infravermelho

Os resultados descritos até são indicativos da formação de 1O_2 na reação de LAOOH com Ce^{4+} . Com o intuito de obter uma prova inequívoca de que a emissão de luz observada corresponde ao 1O_2 , adquiriu-se o espectro de emissão da luz no infravermelho.

Para a aquisição do espectro o Ce^{4+} (200 mM) foi injetado continuamente em uma solução de LAOOH 100 mM dissolvido em metanol. Para fins de comparação,

adquiriu-se também os espectros de emissão do $^1\text{O}_2$ gerado na reação de H_2O_2 e hipoclorito ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$) (**Figura 4.12.B**), na decomposição de H_2O_2 catalisada por íons molibdato ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$) (**Figura 4.12.C**), e na termodecomposição do endoperóxido de dimetilnaftaleno (DMNO_2) (**Figura 4.12.D**). Todos os espectros obtidos apresentaram um máximo de emissão em 1270 nm, característico da emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$).

Como mencionado anteriormente a reação de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$ gera quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$. A reação de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ (**reação 4.3**) é uma reação autocatalítica muito utilizada para a geração de $^1\text{O}_2$ em sistemas químicos, que ocorre por meio da formação de um intermediário diperoxomolibdato (Aubry e Cazin, 1988). A termodecomposição de endoperóxidos consiste em uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$ muito utilizada tanto em sistemas químicos como biológicos. O DMNO_2 é um endoperóxido lipossolúvel que sofre termólise a 37°C gerando 70 % de $^1\text{O}_2$ a um fluxo constante de $88 \mu\text{M}/\text{min}$ e DMN (**reação 4.4**) (Pierlot *et al.*, 2000).

Figura 4.12. Espectro de emissão no infravermelho da luz emitida na reação entre LAOOH/Ce⁴⁺ e H₂O₂/MoO₄²⁻. O espectro de LAOOH/Ce⁴⁺ foi obtido durante a injeção contínua (0,7 ml/min) de Ce⁴⁺ (200 mM) em 1,8 ml de LAOOH (100 mM em metanol) (A). O espectro de H₂O₂/ MoO₄²⁻ foi após adição de 0,1 ml de MoO₄²⁻ (0,5 M) em solução 35 % de H₂O₂ (B). Observação – o espectro do sistema H₂O₂/ MoO₄²⁻ foi adquirido utilizando uma abertura de fenda 10 vezes menor.

O estreitamento observado no espectro de emissão da reação de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$, deve-se à diferenças na abertura da fenda localizada antes e depois do monocromador (vide **Figura 3.2**). O sistema de reação $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ produz uma alta concentração estacionária de oxigênio singlete. Nas concentrações utilizadas estima-se a produção de $\sim 2,500 \text{ mM}$ de $^1\text{O}_2/\text{min}$. Portanto para se obter uma intensidade de sinal próximo aos outros sistemas estudados, a abertura das duas fendas, foram drasticamente reduzidas (mais de 10 vezes). Como consequência a resolução do espectro de emissão do $^1\text{O}_2$ para o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ foi aumentada, apresentando um espectro com um pico mais estreito em 1270 nm.

4.2.4 Estudos do mecanismo de geração de $^1\text{O}_2$ utilizando $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$

Os resultados obtidos na captação química e nos estudos de luminescência mostram claramente que o $^1\text{O}_2$ é formado na reação de LAOOH com Ce^{4+} . O $^1\text{O}_2$ pode ser formado por meio do mecanismo de Russell, em que radicais peroxilas derivados de LAOOH interagem entre si formando um intermediário tetraóxido que se decompõe gerando uma cetona, um álcool e $^1\text{O}_2$ (Russell, 1957; Howard e Ingold, 1968) (vide Figura 1.16 da introdução).

Com o objetivo de investigar a participação desse mecanismo na reação de formação de $^1\text{O}_2$, utilizamos hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com ^{18}O ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) como ferramenta. De acordo com o mecanismo de Russell os radicais peroxilas marcados ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$) gerados na reação com o metal, reagem entre si formando um intermediário tetraóxido que se decompõe gerando $^{18}[^1\text{O}_2]$ (**reação 4.5**).

utilizando DBA como padrão interno.

255 é um fragmento resultante da perda de um átomo de Br e o íon de massa m/z

176 é resultante da perda de dois átomos de Br. Para os endoperóxidos ($\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) observou-se a perda de dois átomos de oxigênio $^x\text{O}^x\text{O}$ ($x:16$ ou 18), originando um íon de m/z 330, correspondente ao DPA (**Figura 4.13.B-D**).

Figura 4.13. Espectro de massa dos íons derivados da fragmentação de DBA (A), $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (B), $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ (C) e $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (D) obtidos no modo de ionização APCI-positivo. Os endoperóxidos foram gerados durante a incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) com Ce^{4+} (25 mM) na presença de DPA (60 mM) em D_2O :clorofórmio (1:1, v/v). Os espectros foram obtidos selecionando-se as massa de m/z 336, 363, 365 e 367 em Q1, seguida de fragmentação em q2 e detecção dos fragmentos em Q3. A voltagem do cone e a energia de colisão aplicada para a dissociação de DBA foram 20 V e 40 eV, e para DPAO_2 , 15 V e 15 eV, respectivamente.

Com base nesses dados fragmentação, as seguintes transições de massa foram

selecionadas para a detecção e quantificação dos endoperóxidos e do DBA no modo MRM: m/z 367→330 para $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$; m/z 365→364 para $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$; m/z 363→330 para $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ e m/z 335→176 para DBA.

A análise dos endoperóxidos formados na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} (**Figura 4.14.**) ou Fe^{2+} (**Figura 4.15**) mostrou que ambas resultam na formação de três espécies moleculares de DPAO_2 : $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$.

Figura 4.14. Cromatograma típico de quantificação de $\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$ (x : 16 ou 18) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} por HPLC-MS/MS no modo MRM. $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) foram incubados com Ce^{4+} (25 mM) na presença de DPA (60 mM) a 37°C por 1 hora. Ao final da reação adicionou-se DBA e NaN_3 . Os produtos de reação foram monitorados no UV a 210 nm (A) e a análise no espectrômetro de massa foi realizada monitorando-se as seguintes transições de massa: m/z 367→330 (B), m/z

365→330 (C), m/z 363→330 (D), e m/z 336→176 (E).

Figura 4.15. Cromatograma típico de quantificação de $\text{DPA}^x\text{O}^x\text{O}$ (x: 16 ou 18) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Fe^{2+} por HPLC-MS/MS no modo MRM. A análise de DPAO_2 foi realizada após incubação a 37°C por 1 hora de uma mistura contendo: 50 mM de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, 50 mM de Fe^{2+} e 60 mM de DPA em D_2O :clorofórmio (1:1, v/v). Ao final da reação adicionou-se DBA e NaN_3 . Os produtos de reação foram monitorados no UV a 210 nm (A) e as seguintes transições de massa foram selecionados no espectrômetro de massa: $m/z \text{ 367} \rightarrow \text{330}$ (B), $m/z \text{ 365} \rightarrow \text{330}$ (C), $m/z \text{ 363} \rightarrow \text{330}$ (D), e $m/z \text{ 336} \rightarrow \text{176}$ (E).

A detecção de endoperóxidos contendo oxigênio não-marcado (oxigênio-16),

DPA¹⁶O¹⁸O e DPA¹⁶O¹⁶O, sugere um possível envolvimento de oxigênio dissolvido (¹⁶O₂) no sistema e talvez de oxigênio presente na água (D₂¹⁶O), já que a pureza de LA¹⁸O¹⁸OH utilizada na reação era de mais de 99 %. Com o intuito de esclarecer a participação desses fatores, foram realizados dois experimentos: um na ausência de ¹⁶O₂ e outro em DMSO:clorofórmio como meio de reação.

Comparando-se os experimentos realizados com e sem ¹⁶O₂, observou-se um aumento significativo na porcentagem do endoperóxido marcado (DPA¹⁸O¹⁸O) e um decréscimo significativo do não-marcado (DPA¹⁶O¹⁶O) na ausência de ¹⁶O₂, tanto na reação realizada em D₂O como em DMSO (**Figura 4.16.A e 4.16.C**). Os dados mostram que há um aumento de oito vezes na porcentagem do marcado na reação conduzida em D₂O sem O₂, e um aumento duas vezes na reação conduzida em DMSO sem O₂ (**Tabela 4.1**). Por outro lado, a porcentagem do endoperóxido contendo apenas um oxigênio-18 (DPA¹⁶O¹⁸O) manteve-se o mesmo nos experimentos com ou sem ¹⁶O₂. Portanto, esses dados sugerem que o oxigênio dissolvido no sistema está envolvido na formação do endoperóxido não marcado.

Em relação ao experimento realizado em DMSO, observou-se um aumento expressivo de aproximadamente vinte vezes na porcentagem de DPA¹⁸O¹⁸O nesse solvente (**Figura 4.16. A**), e um decréscimo de mais de 50 % na porcentagem de DPA¹⁶O¹⁸O. Já o efeito de DMSO na porcentagem de DPA¹⁶O¹⁶O foi menos pronunciado, havendo apenas um decréscimo de 10 %. Esses dados, portanto apontam que o D₂O esteja contribuindo para a formação de DPA¹⁶O¹⁸O.

Em conjunto esses resultados sugerem o envolvimento de ¹⁶O₂ no(s) mecanismo(s) de formação de ¹O₂ não marcado e de D₂O na formação de ¹O₂ contendo um átomo de oxigênio marcado e outro não marcado.

Figura 4.16. Porcentagem relativa de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (A), $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ (B) e $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (C) formados na incubação de 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ ($\square$) ou 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e 25 mM Ce^{4+} ($\blacksquare$) em D_2O , D_2O deaerado, DMSO e DMSO deaerado. Todas as reações foram conduzidas na presença de 60 mM DPA, a 37°C por 1 hora. A remoção do oxigênio foi realizada por borbulhamento de N_2 gasoso. Os resultados são médias de 4 experimentos.

Tabela 4.1. Porcentagem relativa de $DPA^{18}O^{18}O$, $DPA^{16}O^{18}O$ e $DPA^{16}O^{16}O$ formado na reação de 25 mM $LA^{18}O^{18}OH$ e 25 mM Ce^{4+} .

	Porcentagem relativa de DPA^xO^xO (x=16 ou 18)		
	$DPA^{18}O^{18}O$ (%)	$DPA^{18}O^{16}O$ (%)	$DPA^{16}O^{16}O$ (%)
D_2O	1.1	28.1	70.8
D_2O sem O_2	8.5	30.3	61.2
DMSO	28.6	11.9	59.5
DMSO sem O_2	51.5	11.8	36.7

4.2.5 Troca da hidroxila marcada (^{18}OH) de $LA^{18}O^{18}OH$ com a água

No item anterior foi mostrado que a quantidade de $DPA^{18}O^{18}O$ formado na reação de $LA^{18}O^{18}OH$ e Ce^{4+} era maior em DMSO do que em água ($D_2^{16}O$), sugerindo que este possa estar promovendo a troca de ^{18}O por ^{16}O . Um possível mecanismo capaz de explicar esse tipo de troca seria a substituição de uma hidroxila marcada (^{18}OH) por uma não marcada (^{16}OH), proveniente da água, formando assim um hidroperóxido contendo ^{18}O e ^{16}O ($LA^{18}O^{16}OH$).

A possibilidade dessa troca foi testada incubando-se $LA^{18}O^{18}OH$ (25 mM) em uma mistura de $H_2^{16}O$:clorofórmio (1:1, v/v) a 37°C por 1 hora. O espectro de massa obtido após incubação, mostrou a presença do íon de m/z 315, correspondente ao íon pseudomolecular ($[M-H]^+$) de $LA^{18}O^{18}OH$, e íons de m/z 313 e 311, correspondentes a $LA^{18}O^{16}OH$ e $LA^{16}O^{16}OH$, respectivamente (**Figura 4.17.**). A detecção do íon de m/z 313 indica que houve uma troca de oxigênio resultando na formação de $LA^{18}O^{16}OH$.

Figura 4.17. Espectro de massa de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ obtido após incubação em clorofórmio: H_2O à 37°C por 1 h. As estruturas do ácido 9-hidroperoxioctadienóico contendo diferentes isótopos de oxigênio (A: $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, B: $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$, C: $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$) são mostradas acima do espectro. A amostra foi separada em uma coluna de fase reversa Luna LC-18 column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm) eluída com 65 % acetonitrila em água a um fluxo de 0.6 ml/min. O espectro foi obtido no modo ESI utilizando a voltagem de cone de -40 V.

4.2.6 Detecção dos produtos álcool marcado (LA^{18}OH) e cetona marcada (LA^{18}O) na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+}

Evidências adicionais que apontam o envolvimento do mecanismo proposto por Russell (1957) na formação de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ na incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com metais foram obtidas por meio da detecção dos produtos de reação: álcool marcado

(LA¹⁸OH) e cetona marcada (LA¹⁸O) (**reação 4.5**).

A **Figura 4.18** mostra a detecção de LA¹⁸OH após a incubação de LA¹⁸O¹⁸OH e Ce⁴⁺ realizada por meio de HPLC-MS com detecção dos íons no modo ESI-negativo. O cromatograma da reação mostrou um pico majoritário em 14 min correspondente ao hidroperóxido remanescente. Nesse mesmo cromatograma, observou-se um pico menor com tempo de retenção de 12,5 min, que foi identificado como sendo o álcool (**Figura 4.18.A**) comparando-se o tempo de retenção com o do padrão de LA¹⁸OH, sintetizado a partir de LA¹⁸O¹⁸OH por uma redução com NaBH₄ (**Figura 4.18.B**). A identidade do pico também foi confirmada por meio da análise do espectro de massa desse pico, o qual mostrou um íon intenso de m/z 297, correspondente ao íon pseudomolecular [(M-H)⁻] de LA¹⁸OH e um íon bem menos intenso de m/z 295 correspondente a LA¹⁶OH (**Figura 4.18.C**).

A detecção da cetona marcada (LA¹⁸O) foi realizada de forma similar, analisando-se os produtos por HPLC-MS com detecção de íons no modo APCI-positivo. A **Figura 4.19** mostra o cromatograma de HPLC com detecção no UV a 210 nm para a reação e o padrão de LA¹⁸O e o espectro de massa dos picos correspondentes ao LA¹⁸O. Os produtos foram separados no HPLC por uma coluna de sílica e cromatograma obtido mostrou dois picos correspondentes à isômeros de posição da cetona. A identificação desses picos como sendo a cetona, foi feita comparando-se os tempos de retenção dos picos obtidos na reação com os do padrão de LA¹⁸O, sintetizado por oxidação do LA¹⁸O¹⁸OH com K₂Cr₂O₇. A identidade desses picos também foi confirmada por meio da análise do espectro de massa, o qual mostrou íons de m/z 297 e 295, correspondentes a LA¹⁸O e LA¹⁶O, respectivamente (**Figura 4.19.C**).

Figura 4.18. Análise de álcool marcado (LA¹⁸OH) formado na incubação de LA¹⁸O¹⁸OH (25 mM) com Ce⁴⁺ (25 mM). **A.** Cromatograma obtido no UV a 210 nm da reação. **B.** Cromatograma no UV a 210 nm do padrão de LA¹⁸OH. **C.** Espectro de massa do pico correspondente ao LA¹⁸OH formado na incubação de LA¹⁸O¹⁸OH e Ce⁴⁺ detectado por HPLC-APCI-MS no modo negativo. Os produtos da reação foram separados por uma coluna Supelco LC-18 (150×4.6 mm, 5 μm) eluído com 65 % acetonitrila em água a um fluxo de 0,6 ml/min. A temperatura da fonte e da probe foram 150°C and 300°C, respectivamente a voltagem do cone a 20 V.

Figura 4.19. Análise de cetona marcada (LA¹⁸O) na incubação de LA¹⁸O¹⁸OH (25 mM) e Ce⁴⁺ (25 mM). **A.** Cromatograma de análise dos produtos da reação por HPLC no UV a 270 nm. **B.** Cromatograma de análise do padrão de LA¹⁸O no UV a 270 nm. **C.** Espectro de massa dos picos correspondentes a LA¹⁸O da reação de LA¹⁸O¹⁸OH e Ce⁴⁺ detectado por HPLC-MS no modo APCI-positivo. Para a análise dilui-se a amostra em hexano:isopropanol (99:1, v/v). Os produtos de reação foram separados por uma coluna de sílica (250×4.6 mm, 5 μm), utilizando-se como fase móvel hexano:isopropanol:ácido fórmico (97:3:0,06, v/v/v) a um fluxo de 1 ml/min.

A detecção de LA^{18}O e LA^{18}OH na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} sugere fortemente que a geração de $^{18}[\text{O}_2]$ ocorre por meio do mecanismo proposto por Russell. Como descrito anteriormente, esses produtos são formados na quebra do anel linear tetraóxido.

4.2.7 Detecção de radical peroxila na reação de LAOOH ou $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com Ce^{4+} utilizando captador de spin e HPLC-MS/MS

Captadores de spin são muito utilizados para a detecção de radicais por técnicas de ressonância paramagnética eletrônica ou EPR. A técnica baseia-se na propriedade de muitos radicais adicionarem-se a grupos nitrona ($\text{R-N}^+\text{-O}^-$) e nitroso (R-N=O) gerando radicais derivados nitróxidos ($\text{R-N-O}^\bullet$) mais estáveis. Portanto, a utilização desses captadores possibilita a detecção de radicais livres instáveis por EPR (Janzen *et al.*, 1990). No entanto, muitos dos adutos formados entre radicais livres e o captador de spin apresentam constantes de desdobramento hiperfínico similares, impossibilitando a identificação inequívoca dos radicais captados. Recentemente, a introdução de técnicas baseadas em EPR acoplado a HPLC-MS/MS tem servido como ferramenta útil para a identificação estrutural desses adutos (Qiong *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2003).

Com o intuito de investigar a formação de radical peroxila na reação de LAOOH ou $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com Ce^{4+} , realizamos incubações na presença de um captador de spin e detectamos o aduto formado por HPLC-MS/MS. Para essa finalidade utilizamos o captador de spin conhecido como DMPO. Este captador têm sido amplamente utilizado, pois é capaz de captar radicais centrados em enxofre, carbono e oxigênio de interesse biológico (Rota *et al.*, 1997; Qian *et al.*, 2000). O radical peroxila adiciona-se ao DMPO, produzindo o aduto correspondente

(DMPO-OOR) (**reação 4.7**), o qual foi posteriormente analisado por HPLC-MS/MS.

O espectro de massa obtido no modo de varredura total mostrou a presença um íon de m/z 426 para a reação contendo LAOOH (**Figura 4.20.A**) e um outro íon de m/z 430 para a reação contendo $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (**Figura 4.20.B**). O primeiro foi identificado como sendo o íon molecular do aduto DMPO-OOLA, e o segundo como o aduto $\text{DMPO-}^{18}\text{O}^{18}\text{OLA}$, formado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$ e DMPO. A identidade destes adutos foi confirmada através da análise dos respectivos íons filhos, selecionando-se no primeiro analisador o íon de m/z 426 ou 430. Ambos mostraram um fragmento único e intenso de m/z 114, correspondente ao $[\text{DMPO}]^+$ (**Figura 4.20.C e D**).

O espectro de massa também mostra íons de m/z 458 e 462. Esses íons provavelmente correspondem ao aduto formado entre radicais peroxila não marcados e marcados derivados de hidroperóxidos contendo mais de um grupo hidroperóxido (acréscimo de 32). O aduto de m/z 462 mostrou-se bastante intenso para o experimento realizado com $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, provavelmente pelo fato deste hidroperóxido conter uma quantidade relativamente alta do di-hidroperóxido (m/z 347). Essa hipótese foi confirmada através da análise da solução estoque de LAOOH e $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, mostrando um íon intenso de m/z 347 (dados não mostrados).

Figura 4.20. Análise de DMPO-OOLA e DMPO- $^{18}\text{O}^{18}\text{OLA}$ por ESI⁺-MS. Espectro de massa obtido no modo scan total da incubação contendo: DMPO 50 mM, LAOOH 2,5 mM e Ce^{4+} 1 mM (**A**) e DMPO 50 mM, LA $^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 2,5 mM e Ce^{4+} 1 mM (**B**). Espectro de massa dos íons filhos de m/z 426 (**C**) e de m/z 430 (**D**). Para a reação adicionou-se 5 μl de $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 mM em 195 μl de uma mistura contendo 5 μl de DMPO 2 M, 5 μl de LAOOH 100 mM e 185 μl de metanol. Após 5 minutos, 2 μl da reação foram analisados no espectrômetro de massa. Temperatura da fonte 80°C, voltagem do cone 20 V e energia de colisão 10 eV.

4.2.8 Formação de $^1\text{O}_2$ na reação de hidroperóxidos de fosfatidilcolina e Ce^{4+}

Os resultados descritos nos itens anteriores mostraram claramente a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} ou Fe^{2+} . Visto que a maior parte dos ácidos graxos em células encontra-se esterificados a fosfolipídios, resolvemos investigar a formação de $^1\text{O}_2$ utilizando hidroperóxidos de fosfolipídios dispersos em D_2O .

A **Figura 4.21** mostra a cinética de emissão de luz em 1270 nm para reações onde foram realizadas injeção de Ce^{4+} em soluções contendo LAOOH, LA, EYPCOOH ou EYPC. Como observado anteriormente, a injeção de Ce^{4+} em solução de LAOOH resultou na geração de uma emissão de luz intensa, enquanto nenhuma emissão foi observada para a solução de LA (ácido linoléico não-oxidado). De forma similar, a injeção de Ce^{4+} em solução contendo EYPCOOH também gerou uma emissão intensa, sugerindo a formação de $^1\text{O}_2$ nessa reação. Por outro lado, observou-se um pequeno sinal de emissão quando o Ce^{4+} foi injetado em solução contendo EYPC. Esse sinal de emissão deve-se provavelmente à presença de EYPCOOH contaminante (aproximadamente 3 %), o qual pode ser formado durante a estocagem e manuseio da solução de EYPC.

Figura 4.21. Emissão de luz em 1270 nm gerado na reação de LAOOH ou EYPCOOH com Ce^{4+} . Para a reação uma solução de Ce^{4+} 50 mM foi injetada em uma cubeta contendo 1,6 ml de LAOOH (A), LA (B), EYPCOOH (C), ou EYPC (D) 0,5 mM preparados em D_2O . O fluxo de injeção foi ajustado 0,7 ml/min.

Prova inequívoca da formação de 1O_2 na reação de EYPCOOH com Ce^{4+} foi obtida através da aquisição do espectro de emissão da luz no infravermelho, mostrando um máximo de emissão em 1270 nm (**Figura 4.22**), correspondente à emissão monomolecular do 1O_2 .

Figura 4.22. Espectro de emissão da luz gerada pelo sistema EYPCOOH/Ce⁴⁺ no infravermelho. O espectro foi adquirido durante a injeção de Ce⁴⁺ 50 mM em 1,6 ml de EYPCOOH 0,5 mM preparado em D₂O.

4.2.9 Formação de ¹O₂ na reação de hidroperóxidos de fosfatidilcolina e Ce⁴⁺: estudos em lipossomos

Para verificar a possibilidade de formação de ¹O₂ a partir de EYPCOOH em membranas utilizamos lipossomos unilamelares contendo diferentes concentrações de hidroperóxido (**Figura 4.23**). Os resultados obtidos mostraram que a injeção de Ce⁴⁺ em lipossomos contendo hidroperóxidos gera uma emissão de luz, cuja intensidade foi maior quanto maior a porcentagem de EYPCOOH presente na membrana. A emissão de ¹O₂ em lipossomos controle, que não foram adicionados de EYPCOOH, também produziu uma pequena emissão de luz, o qual provavelmente resulta de hidroperóxidos formados durante o preparo dos lipossomos. De fato, a análise da porcentagem de hidroperóxidos presente no lipossomo controle pela iodometria, revelou a presença de aproximadamente 5 % de EYPCOOH.

Figura 4.23. Cinética de formação de oxigênio singlete durante a injeção de Ce^{4+} 40 mM em D_2O (Branco) ou em lipossomos (concentração final 1 mM EYPC) controle ou lipossomos adicionados de 10 % ou 50 % de EYPCOOH. As flechas indicam o início da injeção de Ce^{4+} .

4.3 Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e peroxinitrito

4.3.1 Caracterização da luminescência na reação de LAOOH e peroxinitrito

A formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e ONOO^- foi monitorada por meio de medidas de emissão de luz resultante do decaimento bimolecular ($\lambda = 634$ e 703 nm) (**Figura 4.24**) e monomolecular ($\lambda=1270$ nm) (**Figura 4.2**) do $^1\text{O}_2$. Para comparação utilizamos dois sistemas conhecidos geradores de $^1\text{O}_2$, a termodecomposição de DMNO_2 e a reação de H_2O_2 com hipoclorito. A termólise de DMNO_2 gera fluxos constantes de $^1\text{O}_2$ com rendimento em torno de 70 % quando aquecido a 40°C (Aubry, 1991). A reação de H_2O_2 com hipoclorito é dependente do pH, gerando quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$ em pHs alcalinos (Held *et al.*, 1978).

Medidas de emissão de luz na região espectral vermelha foram realizadas utilizando um filtro de corte que deixa passar apenas emissões de comprimento de onda superior a 570 nm. Esse filtro foi utilizado a fim de evitar interferências de outras espécies excitadas como carbonilas tripletes. A injeção de ONOO^- (100 mM) em solução de LAOOH (10 mM em metanol) a um fluxo constante de $0,7$ ml/min produziu um aumento rápido na emissão de luz, observando-se um pico de emissão após 10 s do início da injeção (**Figura 4.24** traço *b*). Nesse ponto a concentração de ONOO^- na reação era de cerca de 10 mM, e a proporção de LAOOH: ONOO^- de $1:1$. Após o pico de emissão, observou-se um decaimento relativamente lento da emissão atingindo níveis basais em 1 min. Emissão similar foi observado para a reação de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCI}^-$ que mostrou um sinal intenso, porém com um decaimento mais rápido que o anterior (**Figura 4.24.**, traço *c*). Em contraste, a termodecomposição de DMNO_2 mostrou um sinal de emissão de intensidade contínua, consistente com o

fato de sua termólise gerar um fluxo constante de $^1\text{O}_2$ a uma determinada temperatura (Turro *et al.*, 1981).

Figura 4.24. Emissão de luz na região vermelha do visível gerado na reação de LAOOH com ONOO^- . Traço **a**, termólise de DMNO_2 15 mM em clorofórmio a 40°C . Traço **b**, injeção de ONOO^- 100 mM (concentração no pico de emissão 10 mM) em 4 ml de LAOOH 10 mM em metanol. Traço **c**, injeção de hipoclorito (concentração no pico de emissão 18 mM) em 4 ml de H_2O_2 20 mM em água. As infusões foram realizadas a um fluxo constante de 0,7 ml/min.

Medidas de emissão na região do infravermelho foram realizadas utilizando-se o detector de germânio. Os sinais de emissão detectados para a reação de LAOOH com ONOO^- , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$ e termodecomposição de DMNO_2 foram semelhantes aos observados para a emissão monitorada na região espectral vermelha do visível. Controles contendo somente LAOOH ou ONOO^- não emitiram luz, sugerindo que a

luminescência é resultante da interação de LAOOH com ONOO^- .

Figura 4.25. Emissão de luz no infravermelho gerado na reação de LAOOH com ONOO^- . Traço **a**, termólise de DMNO_2 13 mM em metanol a 37°C. Traço **b**, injeção de LAOOH 100 mM (concentração no pico de emissão 22 mM) em 2 ml de ONOO^- 100 mM diluído em água. Traço **c**, injeção de hipoclorito (concentração no pico de emissão 8 mM) em 2 ml de H_2O_2 20 mM em água. As infusões foram realizadas a um fluxo constante de 0,7 ml/min.

Evidências adicionais de que a luminescência observada para a reação de LAOOH com ONOO^- corresponde à formação de $^1\text{O}_2$, foram obtidos testando-se o efeito de D_2O e NaN_3 sobre a emissão no infravermelho. A **Figura 4.26.A** mostra um aumento de duas vezes na intensidade de emissão na presença de 67 % D_2O , consistente com o fato do $^1\text{O}_2$ apresentar um tempo de vida mais prolongado em solventes deuterados (Frimer, 1985). A adição de NaN_3 1 mM, um forte supressor físico de $^1\text{O}_2$, inibiu em torno de 80 % o sinal de emissão, evidenciando também a

formação de $^1\text{O}_2$ na reação (**Figura 4.26.A**).

Figura 4.26. Efeito de D_2O e NaN_3 na emissão de luz gerada pela reação de LAOOH com ONOO^- . A, Sinal adquirido no detector de Ge-diodo durante a injeção de 0,5 ml de LAOOH (100 mM em metanol) em 2 ml de ONOO^- 100 mM diluído em H_2O ou 67 % D_2O . B, Sinal adquirido na fotomultiplicadora em 1270 nm durante a injeção de 0,5 ml de LAOOH (100 mM em metanol) em 2 ml de ONOO^- 100 mM (diluído em 67 % D_2O) na ausência e na presença de 1 mM NaN_3 . As infusões foram realizadas a um fluxo constante de 0,7 ml/min.

Prova inequívoca de que a emissão observada corresponde ao decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$ foi obtida por meio da aquisição do espectro de emissão na região do infravermelho. O espectro adquirido para a reação entre LAOOH e ONOO^- (**Figura 4.27.A**) apresentou uma banda de emissão com máximo em 1270 nm, similar aos espectros obtidos para as reações conhecidamente gerados de $^1\text{O}_2$ como a reação de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCI}^-$ (**Figura 4.27.B**) e a termólise de DMNO_2 (**Figura 4.27.C**), indicando portanto a formação de $^1\text{O}_2$ na reação.

Figura 4.27. Espectro de emissão da luz no infravermelho adquirido para a reação de LAOOH/ ONOO^- (A), $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ONOO}^-$ (B) e DMNO_2 (D). Os espectros de LAOOH/ ONOO^- e $\text{H}_2\text{O}_2/\text{ONOO}^-$ foram monitorados durante a injeção contínua (0.7 ml/min) de ONOO^- (200 mM) em 1.8 ml de LAOOH (100 mM em metanol). O espectro de emissão de DMNO_2 foi obtido durante a incubação da solução de DMNO_2 (15 mM) em clorofórmio a 40 °C.

4.3.2 Efeito inibitório de manitol e DMSO sobre a emissão de luz gerada na reação de LAOOH e peroxinitrito

Sabe-se que o peroxinitrito se decompõe rapidamente em pH fisiológico ($k = 0,17 \text{ s}^{-1}$ a 25°C), gerando radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) com rendimento em torno de 30 % (Figura 1.17 da introdução) (Gatti *et al.*, 1998; Merényi *et al.*, 1998; Coddington *et al.*, 1999).

Com o intuito de verificar a participação de $\bullet\text{OH}$ ou $\bullet\text{OH-like species}$ na reação de formação de $^1\text{O}_2$, testamos o efeito de sequestradores conhecidos de $\bullet\text{OH}$, como o manitol e o DMSO. A **Figura 4.28** mostra a porcentagem de emissão de luz em 1270 nm observada após adição de concentrações crescentes de manitol (0-5 mM) ou de DMSO (0-10 %). Em ambos os casos observaram-se uma inibição crescente da emissão na presença de quantidades crescentes do sequestrador. Inibição de 50 % foi atingida na presença de 1,5 mM de manitol e 0,5 % de DMSO. É importante ressaltar que as concentrações utilizadas de manitol e DMSO não inibiram a emissão de $^1\text{O}_2$ quando este foi gerado na termólise de DMNO_2 . Esse dado é importante, pois indica que a inibição observada na reação de LAOOH e ONOO^- não é decorrente de um efeito de supressão física do $^1\text{O}_2$. Portanto a inibição da emissão por manitol e DMSO aponta o provável envolvimento de $\bullet\text{OH}$ ou $\bullet\text{OH-like species}$ no mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com ONOO^- .

Figura 4.28. Efeito de manitol e DMSO sobre a emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ gerado na reação entre LAOOH e ONOO^- . **A**, Efeito de 1 e 5 mM de manitol. **B**, Efeito de 0,2, 2, 10 e 50 % DMSO. A emissão de luz foi monitorada na fotomultiplicadora em $\lambda=1270$ nm durante injeção de 100 mM de peroxinitrito (concentração no pico de emissão 5,5 mM) em 2 ml de uma solução 10 mM de LAOOH em metanol contendo diferentes concentrações de manitol ou DMSO. O fluxo de injeção foi de 0,7 ml/min. A solução foi mantida a 37°C sob constante agitação.

4.3.3 Captação química do oxigênio singlete gerado na incubação de LAOOH com peroxinitrito utilizando DPA

Para evidenciar e quantificar a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e ONOO^- utilizou-se o captador químico DPA, cujas propriedades foram descritas anteriormente (vide item 4.2.1). LAOOH (50 mM) foram incubados com ONOO^- (50 mM) na presença de DPA (60 mM) e o endoperóxido correspondente foi separado e quantificado por HPLC com detecção no UV a 210 nm (**Figura 4.29**). A identificação dos picos foi realizada comparando-se os tempos de retenção com o de padrões de DPA e DPAO_2 (**Figura 4.29.A**) e posteriormente confirmada pela análise por

espectrometria de massa (**Figura 4.29.C-D**).

Como esperado, o espectro de massa de DPA mostrou um pico majoritário de m/z 330 correspondente ao íon molecular ($[M]^+$) de DPA, e o espectro de DPAO₂ mostrou um pico majoritário de m/z 363 correspondente ao íon pseudomolecular ($[M+H]^+$) de DPAO₂. O cromatograma de análise dos produtos formados na incubação de LAOOH e ONOO⁻ mostrou a formação de DPAO₂ (**Figura 4.29.B**, traço d), o qual foi comprovado pela co-injeção de DPAO₂ na mistura de reação. É importante notar que não houve formação de DPAO₂ em quantidades significantes nas reações contendo somente LAOOH (**Figura 4.29.B**, traço b) ou ONOO⁻ (**Figura 4.29.B**, traço c) quando comparados ao controle.

O resultado da quantificação de DPAO₂ realizado por análise no HPLC é mostrado na **Figura 4.30**. Observou-se que não há formação de níveis significantes de DPAO₂ nas reações controle contendo somente ONOO⁻ ou ONOO⁻ decomposto enquanto a reação de LAOOH e ONOO⁻ gera ¹O₂ com um rendimento em torno de 1 - 4 %. Esses controles são importantes, pois mostram que a decomposição de ONOO⁻ por si só não gera ¹O₂ (em concentrações detectáveis por esta técnica) como sugerido por Khan *et al.* (2000). Esses autores sugeriram que após protonação o ONOO⁻ era decomposto gerando rendimentos quase estequiométricos de ¹O₂ e oxonitrato no estado singlete (¹NO⁻). Estudos realizados por nosso grupo mostraram que a decomposição de ONOO⁻ não gera de ¹O₂ nas condições testadas (Martinez *et al.*, 2000) e que o ¹O₂ observado por Khan *et al.*, provavelmente era resultante da reação de ONOO⁻ com H₂O₂ contaminante (Di Mascio *et al.*, 1994).

Figura 4.29. Captação química de $^1\text{O}_2$ gerado na reação de LAOOH e peroxinítrito utilizando DPA. **A**, a: DPA 0,48 mM, b: DPAO₂ 0,012 mM, c: 60 mM DPA incubado com 5 mM DMNO₂. **B**, a: Controle contendo DPA, b: 50 mM LAOOH, c: 50 mM ONOO⁻, d: 50 mM LAOOH e 50 mM ONOO⁻. Todas as reações foram incubadas a 37° C na presença de 60 mM DPA em sistema bifásico contendo D₂O:CHCl₃ (1:1, v/v) e diluídas 125 vezes para análise no HPLC. **C**, Espectro de massa de DPA. **D**, Espectro de massa de DPAO₂ gerado na incubação LAOOH com ONOO⁻.

Figura 4.30. Quantificação de DPAO₂ formado na reação de LAOOH (50 mM) e peroxinitrito (50 mM) em presença de DPA (60 mM) após 1 hora de incubação. A incubação foi conduzida em sistema bifásico contendo D₂O:CHCl₃ (1:1, v/v). Uma alíquota da fase de orgânica foi evaporada sob fluxo de nitrogênio e dissolvida em acetona:acetonitrila (1:5, v/v) e analisada por HPLC.

4.3.4 Caracterização de oxigênio singlete gerado na reação de LA¹⁸O¹⁸OH e peroxinitrito.

Com o intuito de estudar o mecanismo de formação de ¹O₂ na reação de LAOOH com ONOO⁻, realizamos estudos utilizando LA¹⁸O¹⁸OH e captação química do ¹O₂ formado com o captador químico DPA.

A análise dos endoperóxidos formados na reação de LA¹⁸O¹⁸OH e ONOO⁻ por HPLC-MS/MS no modo MRM mostrou a formação de DPA¹⁸O¹⁸O (**Figura 4.31**), indicando a formação de oxigênio singlete marcado (¹⁸[¹O₂]). Além de DPA¹⁸O¹⁸O também foram detectados endoperóxido contendo apenas um oxigênio-18

(DPA¹⁸O¹⁶O) e endoperóxido não marcado (DPA¹⁶O¹⁶O).

Figura 4.31. Caracterização de $^1\text{O}_2$ formado na reação entre $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e peroxinitrito utilizando DPA. Para a reação $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (100 mM) foram injetados (concentração final, 13 mM) em uma solução de peroxinitrito 100 mM contendo DPA 60 mM dissolvidos em D_2O :clorofórmio (1:1, v/v). A solução foi mantida sob constante agitação a 37°C, sendo o pH final 11. A detecção dos endoperóxidos (DPA^xO^xO, x:16 ou 18) foi realizado por HPLC-MS/MS no modo MRM. **A**, Cromatograma do HPLC monitorado no UV a 210 nm. **B**, Monitoramento da transição 363→330 correspondente a DPA¹⁶O¹⁶O. **C**, Monitoramento da transição 365→330 correspondente a DPA¹⁸O¹⁶O. **D**, Monitoramento da transição 367→330 correspondente a DPA¹⁸O¹⁸O.

A formação de DPA¹⁸O¹⁶O e DPA¹⁶O¹⁶O também foi observada para a reação de LA¹⁸O¹⁸OH com Ce⁴⁺ ou Fe²⁺ (item 4.2.4). A formação desses endoperóxidos é provavelmente resultante de mecanismos de troca envolvendo oxigênio dissolvido no sistema e oxigênio da água. Esses mecanismos serão discutidos em detalhes no item das discussões.

Apesar da complexidade dos fatores interferentes na detecção de ¹⁸[¹O₂], esses resultados sugerem que pelo menos parte dos átomos de oxigênio presentes no ¹O₂ gerado na reação de LA¹⁸O¹⁸OH e ONOO⁻ é proveniente dos oxigênios presentes no hidroperóxido. Além disso, a detecção de ¹⁸[¹O₂] na reação de LA¹⁸O¹⁸OH com ONOO⁻ sugere que o ¹O₂ é gerado pelo mecanismo de Russell como foi descrito para a reação de LA¹⁸O¹⁸OH com metais.

4.4 Estudo da geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e ácido hipocloroso

4.4.1 Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de HOCl com hidroperóxidos

A formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e HOCl foi investigada por meio do monitoramento da emissão de luz em 1270 nm utilizando uma fotomultiplicadora sensível no infravermelho. Para fins de comparação a formação de $^1\text{O}_2$ também foi monitorada para as reações de HOCl com a H_2O_2 , o *terc*-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) ou o hidroperóxido de cumeno (CuOOH).

A **Figura 4.32** mostra as estruturas dos hidroperóxidos orgânicos testados. É importante lembrar que CuOOH e *t*-BuOOH são hidroperóxidos terciários e portanto não possuem hidrogênio- α , enquanto LAOOH é um hidroperóxido primário contendo hidrogênio- α . A presença desse hidrogênio é fundamental para a geração de $^1\text{O}_2$ a partir de LAOOH pelo mecanismo de Russell.

Figura 4.32. Estruturas dos hidroperóxidos de cumeno (CuOOH), de *terc*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) e de ácido linoléico (LAOOH).

Como esperado, a injeção de HOCl (concentração final 1 mM) em uma solução 1 mM de H_2O_2 em D_2O , produziu um flash intenso de luz, resultante da geração de quantidades estequiométricas $^1\text{O}_2$ nesse sistema (Held *et al.*, 1978, Khan e Kasha 1970, Murray 1979) (**Figura 4.33.A**). De modo similar, a injeção de HOCl (concentração final 1 mM) em uma solução 1 mM de LAOOH em tampão fosfato pH 7,4, também produziu um flash de luz, porém de intensidade menor (**Figura 4.33.B**). Por outro lado, a injeção de HOCl em solução contendo *t*-BuOOH produziu apenas uma pequena luminescência (**Figura 4.33.C**) enquanto nenhum sinal de emissão foi observado para a reação contendo CuOOH (**Figura 4.33.D**). Considerando que soluções comerciais de *t*-BuOOH contêm H_2O_2 , a luminescência observada para a reação de HOCl com esse hidropéroxido provavelmente deve-se a reação de HOCl com H_2O_2 contaminante.

A integração das áreas do sinal de emissão obtidas para a reação de HOCl com H_2O_2 e com LAOOH mostrou que a área para a reação com LAOOH corresponde a aproximadamente 10 % do sinal obtido para a reação com H_2O_2 .

Os dados de emissão de luz sugerem que a reação de HOCl com LAOOH gera $^1\text{O}_2$ e que a geração deste está relacionado à presença de hidrogênio- α , pois não se observou emissão de luz na reação de HOCl com hidropéroxidos terciários.

Figura 4.33. Cinética de emissão de luz monitorado em 1270 nm para as reações de HOCl com H_2O_2 , LAOOH, CuOOH e t -BuOOH. A emissão foi monitorada durante a injeção de 0,17 ml de HOCl 10 mM diluído em NaOH 10 mM preparado em D_2O (concentração final 1 mM), em uma cubeta contendo 1,5 ml de solução 1 mM de H_2O_2 em D_2O (A), 1 mM de LAOOH em tampão 0,1 M fosfato, pD 7.8 (B), 1 mM de t -BuOOH em D_2O (C), e 1 mM CuOOH em D_2O (D). As flechas indicam o início da injeção de HOCl.

Para verificar se a reação responsável pela formação de 1O_2 depende do grupamento hidropoxila de LAOOH, estudou-se a emissão de luz na reação de HOCl com o ácido linoleico (LA) e com o álcool derivado da redução de LAOOH (LAOH). Observou-se que não há geração de luz durante a injeção de HOCl em solução contendo LA, enquanto que uma pequena emissão foi observada para a

injeção de HOCl em solução contendo LAOH (**Figura 4.34**).

Figura 4.34. Emissão de luz na reação de HOCl com LA, LAOH ou LAOOH. Para a reação foram injetados 0,17 ml de HOCl 10 mM (diluído em NaOD 10 mM, concentração final 1 mM) em 1,5 ml de LA (a), LAOH (b) ou LAOOH (c) 1 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 preparado em D₂O. As flechas indicam início da injeção de HOCl.

A luminescência observada para LAOH deve-se provavelmente à presença de LAOOH na solução de LAOH, como evidenciado pelo espectro de massa (**Figura 4.35**). Nele observa-se um pico majoritário de m/z 295 correspondente ao LAOH e um pico pequeno de m/z 311 correspondente à LAOOH. A integração das áreas mostrou que a quantidade de LAOOH é de aproximadamente 10 %. A presença de LAOOH deve-se à redução incompleta de LAOOH a LAOH por NaBH₄. Portanto, pode-se concluir que a reação de HOCl e LAOH não gera ¹O₂. Esses resultados são importantes, pois indicam que a reação de formação de ¹O₂ na presença de HOCl ocorre por meio de um mecanismo que depende do grupamento hidroperóxido do

lipídio.

Figura 4.35. Espectro de massa de LAOH sintetizado a partir da redução de LAOOH por NaBH_4 .

4.4.2 Efeito de D_2O e NaN_3 sobre a emissão observada na reação de LAOOH com HOCl

Evidências adicionais de que a emissão observada reação de HOCl com LAOOH deve-se à geração de $^1\text{O}_2$ foram obtidas testando-se o efeito de D_2O e de azida. A **Figura 4.36.A** mostra o efeito de D_2O sobre a intensidade de emissão de oxigênio singlete na reação de LAOOH e HOCl. Sabe-se que o D_2O aumenta em até 10 vezes a intensidade de emissão do $^1\text{O}_2$ (Merkel e Kearns, 1972; Kajiware e Kearns, 1973). A intensidade de emissão de luz observada para a reação realizada em tampão preparado em 100 % D_2O foi aproximadamente oito vezes maior que a realizada em tampão contendo 12 % de D_2O , apontando a formação de $^1\text{O}_2$ na reação. Uma outra evidência a favor da formação de $^1\text{O}_2$ foi obtida por meio da observação do efeito inibitório da azida, um forte supressor físico de $^1\text{O}_2$ (Hasty *et al.*, 1972). Na **Figura 4.36.B** observa-se que a adição de 1 mM de azida na solução de LAOOH, inibe a

emissão de luz em 75 %, sugerindo a formação de $^1\text{O}_2$.

Figura 4.36. Efeito de D_2O e NaN_3 sobre a emissão de luz em 1270 nm gerada pelo sistema LAOOH/HOCl. **A**, HOCl 10 mM foi injetado a um fluxo de 0,7 ml/min (concentração final 1 mM) em 1,5 ml de LAOOH 1 mM em tampão preparado em 100 % D_2O ou 13 % D_2O . **B**, HOCl foi injetado em solução de LAOOH contendo 1 mM de NaN_3 . As flechas indicam em tracejado indicam o início da injeção de HOCl.

4.4.3 Espectro de emissão no infravermelho da luz gerada na reação de LAOOH com HOCl

Prova inequívoca da formação de $^1\text{O}_2$ foi obtida por meio da aquisição do espectro de emissão da luz no infravermelho. A **Figura 4.37** mostra o espectro de emissão da luz obtido para a reação de LAOOH com HOCl e para H_2O_2 com HOCl. Ambos o espectros apresentam uma banda de emissão com máximo em 1270 nm, característico decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$, evidenciando desta forma a geração de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com HOCl.

Figura 4.37. Espectro de emissão da luz no infravermelho gerada pelo sistema LAOOH/HOCl e H_2O_2 /HOCl. A. Espectro adquirido durante a injeção de HOCl 10 mM em 1,5 ml de LAOOH em tampão fosfato pH 7,4 preparado em D_2O a um fluxo de 0,7 ml/min. B. Espectro adquirido H_2O_2 /HOCl durante a injeção de 2 ml de uma solução 0,28 M HOCl (final concentration) em 1 ml de H_2O_2 3 M em H_2O (final concentration, 1 M) a um fluxo de 1,4 ml/min.

4.4.4 Efeito do pH sobre a geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e HOCl

Sabe-se que a geração de $^1\text{O}_2$ na reação de H_2O_2 com HOCl é dependente do pH, sendo máximo em pHs alcalinos (Held *et al.*, 1978). Para verificar se a geração de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e HOCl também dependente do pH, estudamos a emissão de luz durante a injeção de HOCl em solução de LAOOH dissolvidos em tampão de diferentes pHs. Observou-se que a emissão de luz era mais intensa nos pHs 7,4 e 8, sendo menor em pHs >8. Já em pH 6 o sistema praticamente não gerou $^1\text{O}_2$ (**Figura 4.38.A**). Considerando que o pKa de HOCl é 7,4, o fato da emissão de luz ser maior entre os pHs 7,4 e 8,0, sugere que a geração de $^1\text{O}_2$ é favorecida na presença da forma desprotonada de HOCl.

Para comparação o efeito do pH também foi testado para o sistema H_2O_2 /HOCl (**Figura 4.38.B**). Observou-se que o efeito do pH sobre a emissão de $^1\text{O}_2$ é similar ao observado para o sistema LAOOH/HOCl. Ao contrário do que está descrito na literatura, valores altos de emissão foram observados para pHs entre 6,5 e 7,4, sendo que em pHs mais alcalinos houve um decréscimo na intensidade de emissão. Já em pH ácido não se observou emissão de luz.

Khan e Kasha (1994a) sugeriram que a simples acidificação de uma solução de HOCl gera $^1\text{O}_2$. Porém nossos resultados mostram que a acidificação inibe a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de HOCl com H_2O_2 ou LAOOH. Esses resultados sugerem que a formação de $^1\text{O}_2$ pela simples acidificação de HOCl, descrita por Khan e Kasha (1994a), não contribui para a emissão de luz observada na reação entre LAOOH e HOCl.

Figura 4.38. Efeito do pH na geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com HOCl e H₂O₂ com HOCl. **A.** Para a reação foram injetados 0,17 ml de HOCl 10 mM (diluído em 10 mM NaOH preparado em D₂O, concentração final 1 mM) em 1,5 ml de LAOOH 1 mM em tampão fosfato 0.1 M, pH 6,0, 7,0, 7,4, 8,0 e 9,0. **B.** Para reação 0,17 ml de HOCl 10 mM (diluído em NaOH 10 mM) foram injetados em 1,5 ml de uma solução de H₂O₂ 1 mM diluído em tampões de pH 2,5, 6,5, 7,0, 7,4 e 9,4. As flechas tracejadas indicam o início da injeção de HOCl.

4.4.5 Efeito da concentração de LAOOH e de HOCl sobre a geração de oxigênio singlete

A quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado na reação de LAOOH com HOCl mostrou ser dependente tanto da concentração de LAOOH como de HOCl. Experimentos realizados com diferentes concentrações de HOCl mostraram que a emissão de luz varia quase que linearmente com a concentração de HOCl, na faixa de concentração em que a proporção de HOCl:LAOOH é menor que 1 (**Figura 4.39**). Acima desse valor não ocorre incrementos na quantidade de $^1\text{O}_2$ atingindo um patamar. O rendimento médio de $^1\text{O}_2$ nesse patamar foi de $14 \pm 1 \%$.

Resultado similar foi observado variando-se a concentração de LAOOH. A quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado na reação contendo HOCl 1 mM e diferentes concentrações de LAOOH, também mostrou ser dependente da concentração de LAOOH, atingindo um patamar em concentrações acima de 1 mM de HOCl, ou seja em concentrações onde a proporção de LAOOH:HOCl é maior que 1 (**Figura 4.40**). O rendimento máximo de $^1\text{O}_2$ calculado nesse patamar foi igual ao obtido no experimento em variou-se a concentração de HOCl.

A quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado na reação foi determinada integrando-se a área sob o sinal de emissão. A conversão dos valores de área para os valores de concentração de $^1\text{O}_2$ foi possível utilizando-se DHPNO₂, um endoperóxido hidrossolúvel que gera fluxos constantes de $^1\text{O}_2$ a uma determinada temperatura (vide detalhes no **Anexo V**)

Figura 4.39. Efeito da concentração de HOCl sobre a quantidade de 1O_2 gerado na reação com LAOOH. O experimento foi realizado injetando-se concentrações variadas de HOCl em 1,5 ml de LAOOH 1 mM. **A.** Quantidade de 1O_2 em μM calculado integrando-se a área sob o pico, considerando que uma área de 116 (unidades arbitrárias) corresponde a uma concentração estacionária de 1 μM de 1O_2 . **B.** Rendimento de 1O_2 calculado em relação a 1 mM de LAOOH contido no sistema.

Figura 4.40. Efeito da concentração de LAOOH sobre a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado na reação com LAOOH. O experimento foi realizado injetando-se 0,17 ml de HOCl 10 mM diluído em 10 mM NaOH numa cubeta contendo 1,5 ml tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 preparado em D_2O contendo diferentes concentrações de LAOOH. **A.** Quantidade de $^1\text{O}_2$ em μM calculado integrando-se a área sob o picode emissão, considerando que uma área de 116 (unidades arbitrárias) corresponde a uma concentração estacionária de $1 \mu\text{M}$ de $^1\text{O}_2$. **B.** Rendimento de $^1\text{O}_2$ calculado em relação a 1 mM de LAOOH contido no sistema.

4.4.6 Efeito de Chelex® e manitol

Estudos mostram que o HOCl pode reagir com Fe^{2+} gerando $\cdot\text{OH}$ por meio de uma reação similar à reação de Fenton (Folkes *et al.*, 1995). Para verificar a participação de ferro contaminante no mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com HOCl, foram realizados experimentos utilizando tampão tratado com Chelex® 100, uma resina muito utilizada para a remoção de metais contaminantes presentes em tampões. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento do tampão com essa resina por 48 horas, não alterou a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado (**Figura 4.41**), sugerindo que não há participação de metais no mecanismo de geração de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e HOCl.

O envolvimento de $\cdot\text{OH}$ na geração de $^1\text{O}_2$ também foi estudada. Experimentos foram realizados, adicionando-se 1 mM de manitol, um eficiente supressor de $\cdot\text{OH}$, na solução contendo 1 mM de LAOOH antes da injeção de HOCl. O resultado obtido mostrou que não há diferença significativa na geração de $^1\text{O}_2$ na presença de manitol (**Figura 4.41**), sugerindo que $\cdot\text{OH}$ também não estão envolvidos no mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$ observado para a reação de LAOOH com HOCl.

Figura 4.41. Efeito de Chelex® e manitol sobre a geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com HOCl. As reações foram realizadas injetando-se 0,17 ml de HOCl 10 mM (concentração final 1 mM) em 1,5 ml de LAOOH 1 mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 em D₂O. O efeito do chelex foi testado utilizando um tampão previamente tratado com chelex por 48 horas e o manitol foi adicionado no tampão na concentração final de 1 mM. A quantidade de ¹O₂ foi determinado por meio da integração da área sob a curva de emissão de luz adquirida em 1270 nm.

4.4.7 Medidas de emissão de luz no infravermelho para a reação de HOCl com hidroperóxidos de fosfatidilcolina em lipossomos

Os lipossomos têm sido muito utilizados como modelo de membrana celular para estudos fotoquímicos (Hoebecke, 1995; Fu e Kanofsky, 1995). A fim de verificar a possibilidade de formação de $^1\text{O}_2$ na reação de HOCl com hidroperóxidos esterificados em membranas, utilizamos lipossomos preparados com fosfatidilcolina de ovo (EYPC) contendo diferentes concentrações de hidroperóxidos de fosfatidilcolina (EYPCOOH).

A injeção de HOCl na solução contendo esses lipossomos, mostrou que a intensidade de emissão é maior quanto maior a porcentagem de EYPCOOH presente na membrana (**Figura 4.42.A**). Além disso, observou-se uma correlação linear entre a quantidade de $^1\text{O}_2$ formado e a concentração de EYPCOOH presente no lipossomo (**Figura 4.42.B**). Observou-se também uma tendência de aumento no rendimento de $^1\text{O}_2$ com o aumento na quantidade de hidroperóxido presente na membrana. Esses dados são de importância biológica, pois sugerem que o $^1\text{O}_2$ pode ser gerado na reação de HOCl com hidroperóxidos de fosfolipídios presentes em membranas.

Figura 4.42.. Cinética de formação de oxigênio singlete durante a injeção de HOCl em lipossomos contendo diferentes concentrações de EYPCOOH. **A.** Cinética de emissão de luz em 1270 nm adquirido durante a injeção de 0,17 ml de HOCl (concentração final 10 mM) em 1,5 ml de lipossomo contendo 1 mM de EYPC e 0, 10, 20, ou 50 % de EYPCOOH. **B.** Relação entre concentração de EYPCOOH e quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado. O valor em porcentagem representa o rendimento de $^1\text{O}_2$ em relação à quantidade de EYPCOOH presente no lipossomos.

4.4.8 Caracterização do oxigênio singlete gerado na reação de LA¹⁸O¹⁸OH com HOCl utilizando EAS

Para obter informações a respeito do mecanismo envolvido na geração de ¹O₂ na reação de LAOOH com HOCl realizou-se experimentos utilizando LA¹⁸O¹⁸OH e HPLC-MS/MS. O captador químico de ¹O₂ escolhido para esses experimentos foi o EAS, um captador químico hidrossolúvel, que ao reagir com ¹O₂ gera um endoperóxido correspondente estável conhecido como EASO₂ (**reação 4.8**). A utilização deste captador permite a caracterização das espécies atômicas de oxigênio presentes na molécula de ¹O₂.

A caracterização do ¹O₂ formado a partir de LA¹⁸O¹⁸OH, fornece informações importantes quanto à origem dos átomos de oxigênio presentes na molécula de ¹O₂. Utilizando essa técnica foi possível caracterizar o ¹O₂ formado na reação de LAOOH com metais (Miyamoto *et al.*, 2003b) e com peroxinitrito (Miyamoto *et al.*, 2003a), obtendo-se dados importantes sobre o mecanismo envolvido.

Resultados preliminares mostraram que a incubação de LA¹⁸O¹⁸OH com HOCl na presença de EAS gera EAS¹⁸O¹⁸O, EAS¹⁸O¹⁶O e EAS¹⁶O¹⁶O. A **Figura 4.43** mostra o cromatograma típico de análise desses endoperóxidos por HPLC-MS no modo de ionização ESI⁻. O cromatograma de análise dos produtos monitorado pelo

UV a 215 nm, mostrou um pico correspondente ao EASO_2 em 14,5 min (**Figura 4.43.A**). Os cromatogramas do espectrômetro de massa mostraram que esse pico é composto de uma mistura de endoperóxidos composta de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, m/z 228 (**Figura 4.43.B**), $\text{EAS}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$, m/z 229 (**Figura 4.43.C**) e $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, m/z 230 (**Figura 4.43.D**).

Figura. 4.43. Análise de $\text{EAS}^x\text{O}^x\text{O}$ (x: 16 ou 18) formado na incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl na presença de EAS por HPLC-MS/MS. Para a reação 83.5 μl de uma solução 100 mM de HOCl (concentração final 10 mM) em 10 mM NaOD foram injetados em 0.75 ml de uma solução de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (concentração final 5 mM) em tampão 0.1 M, pH 7.4 em D_2O contendo EAS (concentração final 8 mM). O cromatograma foi monitorado no UV a 215 nm (A) e as seguintes massas foram selecionados: m/z 228 (B), 229 (C) e m/z 230 (D).

A identidade dos endoperóxidos detectados foi confirmada por meio da análise dos íons derivados de sua fragmentação, selecionando-se no primeiro analisador os íons de m/z 228, 229 e 230 (**Figura 4.44.**). Todos os espectros apresentaram um fragmento de m/z 212 correspondente a $[\text{EAS}]^{2-}$, formado através da perda dos dois átomos de oxigênio presentes na molécula de $\text{EAS}^x\text{O}^x\text{O}$ ($x = 16$ ou 18).

Figura. 4.44. Espectro de massa dos íons filhos de (A) m/z 228, (B) m/z 229 e (C) m/z 230. Para a reação 83,5 μl de uma solução 100 mM de HOCl (concentração final 10 mM) em NaOD 10 mM foram injetados em 0,75 ml de uma solução de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (concentração final 5 mM) em tampão 0,1 M, pH 7,4 em D_2O contendo EAS (concentração final 8 mM). Condições do espectrômetro de massa: temperatura da fonte 120 $^{\circ}\text{C}$, voltagem de cone 10 V, energia de colisão 10 eV.

Com o intuito de estudar a possível interferência do oxigênio sobre a formação dos endoperóxidos detectados, incubou-se a reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl na presença e na ausência de oxigênio. A **Figura 4.45.** mostra o espectro de massa dos endoperóxidos detectados na reação de $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ com HOCl e na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com HOCl na presença e na ausência de oxigênio.

Como esperado, o espectro de massa da incubação de $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ com HOCl apresentou como produto majoritário o íon de m/z 228 correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (**Figura 4.45.A**). Por outro lado, a incubação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl realizada na presença de oxigênio apresentou produtos de m/z 228, 229 e 230 correspondentes à $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ na proporção de 40:28:32 (**Figura 4.45.B**), indicando a formação predominante de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$. A retirada do oxigênio dissolvido no meio de reação realizada por meio de etapas sucessivas de congelamento e descongelamento a vácuo, promoveu uma alteração expressiva na proporção dos endoperóxidos detectados (**Figura 4.45.C**). A proporção relativa de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}:\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}:\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ detectados nessa situação foi de 21:17:62. Comparando-se os resultados obtidos nas duas condições (com e sem oxigênio), observa-se claramente um aumento acentuado na quantidade de $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ e uma diminuição na quantidade de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ e $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ na incubação sem oxigênio, indicando portanto, que o oxigênio presente no meio de reação interfere na detecção de $^{18}\text{r}^1\text{O}_2$.

Figura 4.45. Espectro de massa de EAS^xO^xO (x : 16 ou 18) formado na reação de HOCl com $LA^{16}O^{16}OH$ ou $LA^{18}O^{18}OH$ na presença de EAS. (A) Reação contendo $LA^{16}O^{16}OH$ 5 mM e HOCl 10 mM em 100 mM tampão fosfato pH 7.4. (B) Reação na presença de oxigênio de $LA^{18}O^{18}OH$ 5 mM e HOCl 10 mM em 100 mM tampão fosfato pH 7.4 contendo 85 % de D_2O , 10 % de H_2O e 5 % MeOH. (C) Reação sem oxigênio de $LA^{18}O^{18}OH$ 5 mM e HOCl 10 mM em 100 mM tampão fosfato pH 7.4 contendo 85 % de D_2O , 10 % de H_2O e 5 % MeOH. Após adição de HOCl a reação foi deixada em gelo e analisada por HPLC-MS no modo scan total. Temperatura da fonte 80 °C, voltagem do cone 10 V.

4.4.9 Detecção de radical peroxila por EPR em fluxo

A formação de radicais peroxila na reação de LAOOH e HOCl foi caracterizada por meio da detecção direta do radical pela técnica de EPR em fluxo contínuo. A primeira detecção direta de radicais peroxila de lipídios por EPR foi reportado por Goldstein *et al.*, (1968) durante a ozonização de ácido linoleico. Essa técnica também foi utilizada por Chamulitrat e Mason (1989) para demonstrar a formação de radicais peroxila durante a catálise enzimática de ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico mediada pela lipoxigenase. O espectro direto de EPR para radicais peroxilas apresenta um valor característico de $g = 2,014$, (Ingold 1969, Kalyanamaran 1982). Esse valor de g serve para diferenciar os radicais peroxila de outros radicais ($R^\bullet$ ou $RO^\bullet$), os quais possuem valores de g menores que 2.0100, próximo do elétron livre ($g = 2,0023$) (Thomas 1963 e Thomas 1964).

A **Figura 4.46** mostra o espectro obtido após mistura rápida de 28 mM LAOOH e 28 mM HOCl a um fluxo de 27,2 ml/min. Nesse sistema o fluxo utilizado permite a detecção das espécies radicalares 2 ms após a mistura. Concentrações altas dos reagentes e o fluxo alto foram utilizados para conseguir uma concentração estacionária suficientemente alta de radicais e possibilitar a sua detecção. O espectro obtido mostra um dubleto com valor de $g = 2,014$, característico de radicais peroxila.

O espectro simulado (**Figura 4.46.B**) também é consistente com a formação desse radical. Ambos os espectros apresentam um dubleto com constante de acoplamento hiperfínico de 4,3 G. Este acoplamento é resultante da interação entre o radical peroxila e o hidrogênio alílico, sendo característico de radicais alquila secundários (Bennet e Summers 1973, Gilbert *et al.*, 1984). Acoplamento similar com valor de 3,8 G foi observado por Chamulitrat e Mason (1989) durante a oxidação

de ácido araquidônico pela lipoxigenase. Esses autores verificaram o desaparecimento do acoplamento quando a mesma reação foi realizada com ácido araquidônico deuterado nas 5 insaturações, indicando que o dubleto é resultante da interação entre o radical peroxila e o hidrogênio alílico próximo ao peroxila.

Figura 4.46. Espectro de EPR em fluxo, experimental e simulado, adquirido para a reação de LAOOH com HOCl. **A**, Espectro experimental obtido durante a mistura rápida de LAOOH (28 mM de HOCl em solução aquosa contendo 5 mM de NaOH) e HOCl (28 mM de LAOOH em 45 mM de tampão fosfato contendo 50 % de acetonitrila) na proporção de 1:1 a um fluxo de 27,2 ml/min. Nestas condições, os radicais são detectados 2 ms após a mistura. O campo magnético foi calibrado com TEMPOL ($g = 2,0056$). As seguintes condições foram utilizadas: frequência das

microondas, 9.650 GHz, potência das microondas 10 mW, frequência do campo 100 KHz, amplitude de modulação do campo 3 G, ganho 1×10^6 , constante de tempo 164 ms, velocidade de varredura 1 G/s. **B**, Espectro simulado por computador usando os seguintes valores: $a^H = 4,3$ G (constante de acoplamento entre o hidrogênio alfa e o radical peroxil); largura da linha, 2,8 G, centro do espectro, 3423 G.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Síntese de hidroperóxidos de ácido linoléico marcados com oxigênio-18 para fins de estudos mecanísticos

Peróxidos marcados isotopicamente são úteis para o estudo de mecanismo de reação. Dentre os isótopos utilizados para a marcação de peróxidos, os mais utilizados são, ^{13}C , ^{14}C , ^2H , ^3H , ^{17}O , ^{18}O (Oae e Fujimori, 1983). O oxigênio ocorre na natureza em três formas isotópicas estáveis: ^{16}O (99,759 %), ^{17}O (0,0374 %) e ^{18}O (0,2 %). A marcação isotópica com ^{17}O é muito utilizada para estudos de RMN e EPR devido ao seu *spin* nuclear ser igual a 1/2. Este isótopo, porém, possui um alto custo e suas preparações normalmente não são puras, contendo altas proporções de ^{18}O e ^{16}O . Por outro lado, o isótopo ^{18}O encontra-se disponível comercialmente com pureza superior a 99 %. Consequentemente diversos estudos têm utilizado-o para estudos mecanísticos.

Hidroperóxidos de lipídios marcados com ^{18}O podem ser sintetizados por processos enzimáticos ou por processos não enzimáticos. O primeiro envolve o uso de enzimas, como as lipoxigenases e o segundo inclui processos de autooxidação e fotooxidação. Neste estudo, sintetizamos os hidroperóxidos do ácido linoléico marcados isotopicamente por fotooxidação empregando o azul de metileno como agente fotossensibilizante em um sistema fechado contendo $^{18}\text{O}_2$.

A síntese de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ foi confirmada por espectrometria de massa no modo ESI⁻. O aumento de 4 u.m.a do produto marcado (m/z 315) em relação ao não-marcado (m/z 311) mostrou a incorporação de 2 átomos oxigênio-18. Além disso, o espectro de massa mostrou apenas o pico do íon pseudomolecular correspondente ao hidroperóxido marcado, indicando que $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ foi sintetizado

com uma pureza próxima de 100 %.

A irradiação do azul de metileno gera $^1\text{O}_2$ por meio de um mecanismo de transferência de energia entre o fotosensibilizador no estado excitado e o oxigênio no estado fundamental. O $^1\text{O}_2$ gerado nesse processo reage rapidamente com as duplas ligações por meio de uma reação de adição do tipo “ene” gerando hidroperóxidos alílicos (Foote *et al.*, 1971).

Sabe-se que a fotooxidação de LA resulta em uma mistura de 4 isômeros do hidroperóxido, sendo dois isômeros com dieno conjugado (9-OOH e 13-OOH) e dois sem (10-OOH e 12-OOH) (Terao e Matsushita, 1977). Desse modo, a síntese de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ por fotooxidação, resulta na formação de hidroperóxidos marcados na posição C-9, C-10, C-12 e C-13 (**Figura 5.1**). A presença desses isômeros de posição foi evidenciada por meio de análise dos fragmentos característicos resultantes da perda de água e quebra da dupla alílica ao hidroperóxio por espectrometria de massa.

Dados da literatura são controversos em relação à quantidade exata dos isômeros formados. Alguns estudos indicam a formação desses isômeros em proporções iguais (Terao e Matsushita, 1977; Thomas e Pryor, 1980), enquanto outros indicam a formação dos isômeros na posição C-9 e C-13 em maior proporção (**Tabela 5.1**) (Frankel *et al.*, 1979). Realizou-se experimentos com o intuito de isolar cada um desses isômeros, porém encontramos dificuldades na resolução dos picos correspondentes a cada um.

Figura 5.1. Estrutura dos isômeros de posição de LA¹⁸O¹⁸OH formados na reação de LA e ¹⁸[¹O₂]. Ácido 9-hidroperoxioctadienóico (9-¹⁸O¹⁸OH), ácido 10-hidroperoxioctadienóico (10-¹⁸O¹⁸OH), ácido 12-hidroperoxioctadienóico (12-¹⁸O¹⁸OH), ácido 13-hidroperoxioctadienóico (13-¹⁸O¹⁸OH).

Tabela 5.1. Proporção dos isômeros de hidroperóxidos formados na fotooxidação.

9-OOH $\Delta^{10,12}$	10-OOH $\Delta^{8,12}$	12-OOH $\Delta^{9,13}$	13-OOH $\Delta^{9,11}$	Referências
32 %	17 %	17 %	35 %	Frankel <i>et al.</i> 1979
25 %	25 %	25 %	25 %	Terao <i>et al.</i> 1977

Em resumo, a análise por espectrometria de massa mostrou que a síntese de LA¹⁸O¹⁸OH por meio da fotossensibilização foi realizada com sucesso e que estes estão presentes com uma pureza próxima de 100 %. Apesar desta metodologia de síntese resultar na formação de uma mistura de quatro isômeros de LA¹⁸O¹⁸OH, a

utilização desses hidroperóxidos marcados pode servir como ferramenta útil para a caracterização de mecanismos de reação que envolva a participação do grupamento hidroperóxido como ocorre no mecanismo de Russell, conforme será descrito a seguir.

5.2 Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH com metais e confirmação do mecanismo de Russell

Estudos de luminescência mostram que a peroxidação lipídica é normalmente acompanhada por uma emissão de luz ultrafraca, a qual é atribuída à geração de espécies excitadas, principalmente $^1\text{O}_2$ e carbonila triplete. De fato, essas espécies foram identificadas como emissoras de luz durante a peroxidação lipídica induzida em sistemas biológicos (King *et al.*, 1975; Sugioka e Nakano, 1976; Sies, 1987; Di Mascio *et al.*, 1992, Timmins *et al.* 1997).

Acredita-se que a formação de espécies excitadas esteja associada a um mecanismo envolvendo quebra de peróxidos de lipídios com formação de radicais peroxilas. Em 1957, Russell propôs que esses radicais reagem entre si formando um intermediário linear tetraóxido instável que se decompõe por meio de um mecanismo cíclico gerando uma cetona, um álcool e oxigênio molecular. Baseado na regra de conservação de *spin* de Wigner, foi postulado que esta reação poderia gerar $^1\text{O}_2$ ou carbonila triplete. Estudos realizados por Howard e Ingold (1968), mostraram que a reação de decomposição de hidroperóxidos de sec-butila na presença de Ce^{4+} gera $^1\text{O}_2$.

Esses estudos incentivaram outros pesquisadores a investigar a formação de $^1\text{O}_2$ a partir de hidroperóxidos de relevância biológica como os hidroperóxidos de lipídios (Nakano *et al.*, 1975; Hawco *et al.*, 1977; Kanofsky, 1986). Nakano *et al.*

(1975) foram um dos primeiros a tentar detectar a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} por meio de medidas de emissão no visível, porém o espectro obtido não apresentou bandas de emissão características da emissão bimolecular de $^1\text{O}_2$. Hawco *et al.* (1977) também obtiveram resultados sugestivos da formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} , hematina ou metahemoglobina, utilizando difenilfurano como captador químico. Atualmente, porém, sabe-se que o produto formado na reação de $^1\text{O}_2$ com este captador químico também pode ser formado por outros oxidantes, comprometendo a especificidade do método de detecção. Ao contrário desses autores, Kanofsky (1986) realizou medidas mais específicas pela detecção da emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ na região do infravermelho. Seus dados mostraram que a reação de LAOOH com Ce^{4+} emite luz com intensidade máxima nessa região, indicando, portanto, a formação de $^1\text{O}_2$.

Apesar de esses estudos apontarem a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} por meio do mecanismo proposto por Russell, nenhum deles mostrou de forma clara e inequívoca a geração de $^1\text{O}_2$ por esse mecanismo. Assim, procurou-se por este estudo demonstrar a formação de $^1\text{O}_2$ e os mecanismos envolvidos, utilizando como ferramentas de estudo, $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, HPLC-MS/MS e medidas de luminescência na região espectral do visível e do infravermelho próximo.

A formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} foi demonstrada de forma inequívoca por meio (i) da detecção de emissão de luz no visível em comprimentos de ondas superiores a 570 nm, região onde se observa a emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$; (ii) da detecção de emissão de luz no infravermelho, bem como do efeito inibidor da azida, um forte supressor físico de oxigênio singlete, (iii) da aquisição de um espectro de emissão na região do infravermelho apresentando uma banda intensa de emissão em 1270 nm, similar aos espectros obtidos para os sistemas geradores

de $^1\text{O}_2$ conhecidos, como a reação de H_2O_2 e HOCl , H_2O_2 e molibdato e termodecomposição de DMNO_2 . É importante ressaltar que este estudo foi o primeiro a mostrar de forma inequívoca a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com Ce^{4+} , pela aquisição de um espectro completo de emissão na região do infravermelho, utilizando um sistema desenvolvido no laboratório em parceria com a empresa Edinburgh Instruments Ltd.

Com o objetivo de esclarecer a participação do mecanismo de Russell na formação de $^1\text{O}_2$ observada para a reação de LAOOH com Ce^{4+} , estudou-se a reação utilizando $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. De acordo com o mecanismo de Russell a reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} resulta em uma cetona marcada (LA^{18}O), um álcool marcado (LA^{18}OH) e $^1\text{O}_2$ marcado ($^{18}[^1\text{O}_2]$).

A detecção do $^{18}[^1\text{O}_2]$ formado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e Ce^{4+} foi possível por meio da técnica de captação química com DPA. A reação desse captador com o oxigênio singlete ($^1[\text{xO}^{\text{x}}\text{O}]_2$, x:16 or 18) gera o endoperóxido correspondente ($\text{DPA}^{\text{x}}\text{O}^{\text{x}}\text{O}$, x:16 or 18), que posteriormente foi detectado e quantificado por HPLC-MS/MS no modo MRM utilizando DBA como padrão interno. O resultado obtido apresentou a formação de uma mistura de endoperóxidos marcados e não marcados, $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}:\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}:\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, na proporção de 1:28:71. Um resultado intrigante, já que a análise dos $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ indicou que a marcação isotópica era praticamente 100 %.

Várias hipóteses foram levantadas na tentativa de esclarecer o resultado obtido. Uma delas foi a possibilidade do envolvimento do oxigênio ($^{16}\text{O}_2$) dissolvido no sistema no mecanismo de perda de marcação isotópica. Essa possibilidade foi verificada pela remoção parcial de oxigênio do meio de reação por meio do borbulhamento de nitrogênio por 20 min. Os resultados mostraram um aumento de

oito vezes na quantidade de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ detectado na reação em que o nitrogênio foi borbulhado.

No entanto, mesmo com a remoção do oxigênio, verificou-se ainda que a quantidade de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ era muito inferior à de $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}:\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}:\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ na proporção de 9:30:61). Uma segunda hipótese levantada foi a de que o oxigênio presente na molécula da água (D_2^{16}O) estivesse envolvido no mecanismo de perda da marcação isotópica. Para testar essa possibilidade, a reação foi conduzida em DMSO em vez de D_2O . O resultado mostrou um aumento expressivo na quantidade de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ que passou de 1 % (reação em D_2O) para 28 % na reação em DMSO contendo oxigênio dissolvido e para 52 % na reação em DMSO borbulhado com nitrogênio. Além disso, houve também um decréscimo de mais de 60 % na proporção de $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ detectado.

Esses resultados indicam, portanto, a participação de oxigênio presente no meio de reação e da água nos mecanismos de troca responsáveis pela diminuição na quantidade de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ detectado.

A perda de marcação isotópica mediada pelo oxigênio molecular pode ser explicada por dois mecanismos. O primeiro ocorre por meio da transferência de energia de $^{18}\text{r}^1\text{O}_2$ para o oxigênio molecular no estado fundamental ($^{16}\text{O}_2$) resultando em oxigênio singlete não marcado ($^{16}\text{r}^1\text{O}_2$) (**reação 5.1**) (Jones e Bayes 1972, Martinez *et al.*, 2004). Esse tipo de troca foi primeiramente proposto por Jones e Bayes (1972) os quais demonstraram uma conversão de 50 % de $^{16}\text{r}^1\text{O}_2$ para $^{18}\text{r}^1\text{O}_2$ em fase gasosa. Recentemente, em trabalho realizado por nosso grupo, foi demonstrado que essa transferência de energia também ocorre em fase líquida (Martinez *et al.*, 2004). O segundo mecanismo ocorre por meio da troca de átomos de oxigênio presentes no radical peroxila com o oxigênio dissolvido no sistema (Chan *et*

al.,1979). De acordo com esse mecanismo, o oxigênio do radical peroxila marcado ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$) sofre troca com o oxigênio normal ($^{16}\text{O}_2$) resultando na formação de radical peroxila não marcado ($\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$) (**reação 5.2**).

(reação 5.2)

Com relação à perda de marcação isotópica mediada pela água, esse fato poderia ser explicado por meio de um mecanismo envolvendo trocas entre a água ($D_2^{16}O$) e $LA^{18}O^{18}OH$ formando $LA^{18}O^{16}OH$ (**reação 5.3**). Essa proposta baseia-se no estudo de Loidl-Stahlhofen *et al.* (1994), os quais observaram que em soluções aquosas ácidas os hidroperóxidos sofrem quebra heterolítica (rearranjo de Hock/Criegee), processo no qual a água do meio poderia trocar com o hidroperóxido protonado. Esse tipo de troca foi evidenciado pela detecção de $LA^{18}O^{16}OH$ por espectrometria de massa, após incubação de $LA^{18}O^{18}OH$ em clorofórmio e água.

(reação 5.3)

Apesar das interferências observadas na detecção de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ pela captação química com DPA, os dados obtidos demonstram que a decomposição de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ catalisada por Ce^{4+} gera $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$. Além de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$, também foram detectados os produtos cetona marcada e álcool marcado, resultantes da decomposição do tetróxido linear formado na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$, evidenciando o envolvimento do mecanismo proposto por Russell. A formação de radicais $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$ na reação com Ce^{4+} também foi detectado pela captação do radical com DMPO e detecção do aduto $\text{DMPO-}^{18}\text{O}^{18}\text{OLA}$ por HPLC-MS/MS.

Ao se incubar $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com Fe^{2+} , também observou-se a formação de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$. No entanto, a cinética de formação de $^1\text{O}_2$ dessa reação foi mais lenta, quando comparada ao Ce^{4+} . Esse fato pode ser explicado pela diferença no potencial de redução do Fe^{2+} ($E^0 = 0,11 \text{ V}$), o qual é muito menor que o potencial de redução de Ce^{4+} ($E^0 = 1.28\text{-}1.71 \text{ V}$) (Dixon e Norman, 1962), sendo incapaz de promover a oxidação por um elétron de LAOOH para gerar $\text{LAOO}^\bullet$.

A formação de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ provavelmente ocorre por meio da formação de radicais alcóxila, numa reação em que o Fe^{2+} catalisa a redução por um elétron de

LA¹⁸O¹⁸OH gerando LA¹⁸O[•]. Estes radicais são altamente oxidantes (E^0 LAO[•]/LAOH = 1,6 V) (Koppenol, 1990; Buettner 1993) e portanto capazes de promover a oxidação de LA¹⁸O¹⁸OH a LA¹⁸O¹⁸O[•]. A combinação de dois LA¹⁸O¹⁸O[•] pelo mecanismo de Russell pode então dar origem a ¹⁸[¹O₂]. Além desse mecanismo, sabe-se que os radicais alcóxila podem sofrer rearranjo para formar um epóxido e um radical na cadeia do ácido graxo, o qual por sua vez reage rapidamente com oxigênio gerando um radical epoxi-peróxila. Neste caso, os radicais epoxiperoxila poderiam reagir entre si e dar origem a ¹O₂ não marcado. Esse mecanismo explicaria em parte a detecção de quantidades elevadas de ¹O₂ não marcado na reação LA¹⁸O¹⁸OH com Fe²⁺.

Considerando que a maior parte dos ácidos graxos poliinsaturados encontram-se esterificados na forma de fosfolipídios em membranas, realizamos experimentos em que se verificou a possibilidade de formação de ¹O₂ a partir de hidroperóxidos presentes em membranas. Como modelo de estudo, utilizamos lipossomos enriquecidos com diferentes porcentagens de hidroperóxidos de fosfatidicolina. Observou-se que a geração de ¹O₂ na presença de Ce⁴⁺ era maior, quanto maior a porcentagem de hidroperóxido na membrana, sugerindo, portanto que hidroperóxidos presentes em membranas também podem servir como fonte de ¹O₂ na presença de metais.

A formação de ¹O₂ a partir hidroperóxidos de fosfolipídios também foi sugerida por Takayama *et al.* (2001) na reação do EYPCOOH com Cu²⁺ na presença de plasma sanguíneo. Porém em seu estudo foram utilizadas técnicas indiretas de detecção, e a utilização de plasma sanguíneo faz com que hajam incertezas com relação à origem de ¹O₂.

5.3 Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e peroxinitrito

O peroxinitrito é um oxidante potente de relevância biológica, que pode ser gerado em tecidos ou células onde ocorre formação simultânea de $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Beckman *et al.*, 1990). Sua formação tem sido associada a processos patogênicos envolvidos em doenças como a arteriosclerose, a isquemia-reperfusão e a doenças neurodegenerativas. Estudos também sugerem um papel protetor de peroxinitrito como agente microbicida quando produzida durante o processo de fagocitose.

O peroxinitrito é capaz promover danos em uma série de biomoléculas, incluindo lipídios, carboidratos, proteínas e DNA. Suas reações dividem-se basicamente em reações (i) diretas, em que o próprio peroxinitrito ou a sua forma protonada reage com o substrato oxidando-o por meio de mecanismos envolvendo um ou dois elétrons, e (ii) indiretas, em que radicais livres gerados a partir de sua decomposição homolítica ($\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$) ou derivados de sua reação com o CO_2 ($\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}_2$) promovem danos em diversas biomoléculas (Radi *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2002).

Reações diretas de peroxinitrito incluem reações com metaloproteínas ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) ou tióis ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Radi *et al.*, 2001; Augusto *et al.*, 2002) conduzindo a fenômenos oxidativos que podem comprometer o funcionamento normal das células. O peroxinitrito também pode reagir diretamente com o CO_2 ($5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), gerando um intermediário ONOOCO_2^- que se decompõe gerando $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ com um rendimento de 35 % (Bonini *et al.*, 1999).

A formação de $^1\text{O}_2$ em reações com participação de peroxinitrito foi primeiramente proposta por Di Mascio *et al.* (1994) para a reação de H_2O_2 e ONOO^- . Posteriormente, Khan *et al.* (2000) sugeriu que a decomposição de peroxinitrito gerava quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$ e oxonitrato singlete (nitroxil, $^1\text{NO}^-$). Porém estudos detalhados realizados por Martinez *et al.* (2001), utilizando captador

químico, mostrou que a $^1\text{O}_2$ era formado a partir de peroxinitrito apenas na presença de H_2O_2 . Considerando que a maioria das preparações de peroxinitrito contém quantidades relativamente altas de H_2O_2 , os resultados obtidos por Khan provavelmente foram resultantes dessa contaminação.

Neste estudo, os resultados mostraram que o peroxinitrito reage com LAOOH gerando $^1\text{O}_2$. Evidências da geração de $^1\text{O}_2$ nessa reação foram obtidas através de medidas de emissão luz na região espectral do vermelho e na região do infravermelho, onde ocorrem a emissão de luz bimolecular e monomolecular do $^1\text{O}_2$, respectivamente. Provas adicionais diagnósticas da formação de $^1\text{O}_2$ foram obtidas pela observação de um efeito inibitório da azida, um supressor físico potente de $^1\text{O}_2$, e pelo aumento da emissão na presença de água deuterada, consistente com o aumento de tempo de vida do $^1\text{O}_2$ neste solvente. Além disso, obteve-se também um espectro de emissão na região do infravermelho com banda de emissão em 1270 nm, característico do decaimento monomolecular do $^1\text{O}_2$.

O mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e peroxinitrito foi investigado. Sabe-se que após protonação o peroxinitrito sofre decomposição homolítica gerando $\cdot\text{NO}_2$ e $\cdot\text{OH}$ com um rendimento de aproximadamente 30 % (Figura 1.17) (Augusto *et al.*, 2002). Com o intuito de verificar o envolvimento de $\cdot\text{OH}$ no mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH e peroxinitrito testou-se o efeito de sequestradores de $\cdot\text{OH}$. Os sequestradores testados foram manitol e DMSO, ambos os quais suprimiram o sinal de emissão de luz em 1270 nm gerado na reação de LAOOH (10 mM) com peroxinitrito (5.5 mM no pico de emissão). A concentração necessária para inibir 50 % da emissão de luz foi de 1.5 mM de manitol e 0.5 % (equivalente a 64 mM) de DMSO. Esses resultados sugerem que radicais hidroxilas ou *$\cdot\text{OH}$ -like species* formados na decomposição de peroxinitrito possam

estar envolvido no mecanismo de formação de $^1\text{O}_2$.

Radicais $\cdot\text{OH}$ são oxidantes extremamente potentes ($E^\circ \cdot\text{OH}$, $\text{H}^+/\text{H}_2\text{O} = 2,31 \text{ V}$) (Koppenol *et al.*, 1992) capazes de promover a oxidação por um elétron de LAOOH gerando LAOO $\cdot$ (**reação 5.4**), já que o potencial de redução do hidroperóxido é de aproximadamente 1 V. De acordo com o mecanismo de Russell, esses radicais podem reagir entre si gerando $^1\text{O}_2$ (Figura 1.16). Com o intuito de verificar o envolvimento desse mecanismo, foram realizados experimentos em que se incubou $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com peroxinitrito na presença do captador químico, DPA. Houve produção de $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, indicando a geração de $^{18}[^1\text{O}_2]$ na reação. Outros endoperóxidos foram detectados, sugerindo o envolvimento mecanismos de troca similares aos observados para a reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com metais. De qualquer forma, a detecção de $^{18}[^1\text{O}_2]$ mostra que os átomos de oxigênio presentes na molécula de $^1\text{O}_2$ são derivados do grupamento OOH de LAOOH e serve como um indício do envolvimento do mecanismo de Russell.

Além dos radicais $\cdot\text{OH}$ ou $\cdot\text{OH-like}$, o próprio peroxinitrito protonado é um oxidante bastante potente ($E^\circ \text{ONOOH}$, $\text{H}^+/\cdot\text{NO}_2$, $\text{H}_2\text{O} = 1,6-1,7 \text{ V}$ e $E^\circ \text{ONOOH}$, H^+/NO_2^- , $\text{H}_2\text{O} = 1,3-1,4 \text{ V}$). Portanto, ele poderia promover a oxidação por um elétron de LAOOH a LAOO $\cdot$. Um outro radical capaz de promover a formação de LAOO $\cdot$ seria o $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ($E^\circ \text{CO}_3^{\cdot-}/\text{CO}_3^{2-} = 1,78 \text{ V}$, Augusto *et al.*, 2002), o qual é formado com um rendimento de aproximadamente 35 % na reação de peroxinitrito e CO_2 (Bonini *et al.*, 1999) (**reação 5.4**). Esse radical é importante, devido à presença de altas concentrações de bicarbonato em meio biológico. Foi demonstrado que ele reage com tióis por meio de um mecanismo de oxidação por um elétron gerando radicais tiíla (Bonini *et al.*, 2001). A formação de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ foi recentemente demonstrada para reações enzimáticas envolvendo a Cu,Zn-SOD (Zhang *et al.*, 2002) e xantina

oxidase (Bonini *et al.*, 2004). Dessa forma, pode-se especular que $\text{CO}_3^{\bullet-}$ poderiam interagir com hidroperóxidos de lipídios promovendo a formação de radicais peroxila e conseqüentemente, $^1\text{O}_2$ em sistemas onde ocorra a produção de ambos estejam elevados.

Em conjunto, os dados apresentados indicam a formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com peroxinitrito e/ou radicais derivados de sua homólise. É um dado inédito que aponta para o potencial envolvimento dessa espécie reativa nos mecanismos de dano oxidativo onde ocorra geração simultânea de hidroperóxidos de lipídios e peroxinitrito.

5.4 Geração de oxigênio singlete na reação de LAOOH e ácido hipocloroso

É sabido que a reação de H_2O_2 com HOCl gera quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$ (Held *et al.*, 1978; Khan e Kasha, 1970; Murray, 1979). Os resultados obtidos neste trabalho mostram claramente que a reação entre hidroperóxidos derivados de lipídios e HOCl também pode gerar $^1\text{O}_2$. Essa reação mostrou-se dependente do pH, e a geração de $^1\text{O}_2$ foi maior em pH 7,4 e 8,0. O rendimento máximo $^1\text{O}_2$ na reação de HOCl e LAOOH em pH fisiológico foi de 13 ± 2 %. Controles utilizando ácido linoleico e o álcool resultante da redução de LAOOH mostraram não há geração de $^1\text{O}_2$ na incubação de HOCl com estes lipídios, indicando que a reação envolvida na geração de $^1\text{O}_2$ depende da presença do grupamento hidroperoxila.

A formação de $^1\text{O}_2$ na reação de HOCl com LAOOH foi evidenciado por meio de medidas de emissão de luz em 1270 nm, onde foi verificado um aumento de oito

vezes na intensidade de emissão na reação conduzida em 100% de D₂O comparado com a de 12% de D₂O, e uma inibição de mais de 80% na presença de azida. Esses dados são consistentes com o fato do tempo de vida do ¹O₂ ser maior em solventes deuterados (Merkel e Kearns, 1972; Kajiwarra e Kearns, 1973) e com o fato da azida ser um forte supressor físico de ¹O₂ (Hasty *et al.*, 1972). Além disso a geração de ¹O₂ nessa reação, foi inequivocamente demonstrada por meio da aquisição do espectro de emissão apresentando uma banda com máximo em 1270 nm.

Estudos também foram realizados com o intuito de verificar formação de ¹O₂ na reação de HOCl com hidroperóxidos de ácidos graxos esterificados na forma de fosfolipídios. Para isso utilizou-se lipossomos contendo concentrações crescentes de EYPCOOH. Os resultados mostraram que o HOCl reage com esses hidroperóxidos gerando ¹O₂, e que a quantidade de ¹O₂ gerado aumenta linearmente com o aumento da concentração do hidroperóxido presente na membrana. Esse resultado é importante do ponto de vista biológico, pois indica que o HOCl pode interagir com hidroperóxidos gerados em membranas celulares, induzindo a formação de ¹O₂.

A geração de ¹O₂ induzida por HOCl também foi estudada com hidroperóxidos terciários, como hidroperóxido de *terc*-butila e de cumeno. Porém, para esses hidroperóxidos, não se observou a geração de ¹O₂. Esse resultado está em concordância com os dados publicados por Panasenko *et al.*(1997), os quais também não observaram geração de ¹O₂ para a reação de HOCl com hidroperóxidos de *terc*-butila, e concluíram erroneamente, que a reação de HOCl com hidroperóxidos orgânicos, incluindo hidroperóxido de lipídios, não gera ¹O₂.

O fato de o ¹O₂ ser gerado pela reação de HOCl com LAOOH, um hidroperóxido primário (Figura 4.32), e não ocorrer com hidroperóxidos terciários, sugere que o

hidrogênio- α ou *geminal* ao grupamento peroxila é fundamental para a formação de $^1\text{O}_2$ nessa reação. Uma particularidade importante que nos induziu a considerar a possibilidade do envolvimento do mecanismo de Russell na geração de $^1\text{O}_2$ observada para a reação de HOCl com LAOOH ou EYPCOOH. Nesse mecanismo a presença do hidrogênio- α é essencial para que a decomposição do intermediário tetróxido libere o oxigênio molecular na forma excitada (Howard e Ingold, 1968).

Para a caracterização do mecanismo envolvido na geração de $^1\text{O}_2$, realizaram-se experimentos utilizando, $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, captador químico EAS e detecção dos produtos por HPLC-MS/MS. A incubação $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com HOCl na presença de EAS resultou na geração de uma mistura de endoperóxidos contendo $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ na proporção de 40:28:32. Por outro lado, o mesmo experimento realizado em um sistema em que o oxigênio foi parcialmente removido, resultou na detecção de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ e $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ na proporção de 21:17:62. A comparação dos resultados obtidos nessas duas condições indica que o oxigênio molecular ($^{16}\text{O}_2$) presente na reação está envolvido na formação de níveis elevados do endoperóxido não-marcado ou parcialmente marcado. Os mecanismos pelos quais oxigênio leva à formação dessa mistura de endoperóxidos foram discutidos para a reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com metais. Estes incluem mecanismos já descritos na literatura, como a transferência de energia de $^{18}[^1\text{O}_2]$ para $^{16}\text{O}_2$, gerando $^1\text{O}_2$ não-marcado (Jones e Bayes 1972; Martinez *et al.*, 2004) ou mecanismos nos quais ocorre uma troca rápida dos oxigênios presentes em $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^*$ com o $^{16}\text{O}_2$, resultando em radicais peroxilas não-marcados (Chan *et al.*, 1979).

Em resumo, apesar das trocas observadas, os resultados mostram a formação de $^{18}[^1\text{O}_2]$ na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl, indicando que os átomos de oxigênio presente na molécula de $^1\text{O}_2$ derivam dos átomos de oxigênio presentes no

hidroperóxido. A formação de $^{18}[^1\text{O}_2]$ na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com HOCl poderia ser ocorrer um mecanismo semelhante ao descrito para a reação de H_2O_2 com HOCl ou pelo mecanismo de Russell.

O mecanismo descrito para a reação de H_2O_2 com HOCl é baseado em estudos conduzidos por Cahill e Taube (1952) os quais mostraram que o oxigênio derivado da reação de H_2O_2 e HOCl é proveniente do peróxido, utilizando H_2O_2 marcado com oxigênio-18 ($\text{H}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$). O mecanismo proposto para essa reação envolve um ataque nucleofílico mediado por $\text{H}^{18}\text{O}_2^-$ sobre o átomo de cloro de HOCl , formando um intermediário $[\text{H}^{18}\text{O}^{18}\text{O}-\text{Cl}-\text{OH}]^-$, que por meio de uma transferência de dois elétrons gera $^{18}[^1\text{O}_2]$, com ambos os oxigênios derivados do peróxido (Held *et al.*, 1978) (**reação 5.6**). De forma similar, poderia se pensar na possibilidade de um ataque nucleofílico mediado por $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^-$ sobre o átomo de cloro de HOCl para formar o intermediário $[\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}-\text{Cl}-\text{OH}]^-$ que se decompõe gerando $^{18}[^1\text{O}_2]$ (**reação 5.7**).

Um segundo mecanismo pelo qual $^{18}[^1\text{O}_2]$ poderia ser formado é o mecanismo de Russell (Russell 1957; Miyamoto *et al.*, 2003a e 2003b). Nesse mecanismo, a reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl geraria radicais peroxilas, e a combinação desses radicais peroxila levariam a formação de um intermediário linear tetróxido que se decompõe gerando $^{18}[^1\text{O}_2]$ (**reação 4.5**).

Evidências a favor do mecanismo de Russell foram obtidas. Uma delas é a importância do hidrogênio- α para a geração de $^1\text{O}_2$ na reação induzida por HOCl ,

discutida anteriormente. E a segunda é a detecção de radicais peroxila nessa reação. Esses radicais foram detectados na reação de LAOOH com HOCl por estudos de EPR em fluxo. É sabido que radicais peroxila apresentam um valor característico de $g = 2.014$ (Goldstein *et al.*, 1968; Ingold, 1969; Kalyanamaran, 1982; Chamulitrat e Mason, 1989). Este valor de g serve para diferenciar os radicais peroxila de outros radicais ($R^\bullet$) os quais possuem valores de g menores que 2.0100, próximo do elétron livre ($g = 2.0023$) (Thomas, 1963 e Thomas, 1964) e de radicais alcóxila ($RO^\bullet$), os quais não são detectados por EPR em fluxo (Symons, 1969). O espectro obtido para a reação mostrou um dubleto com valor de $g = 2.014$, indicando, portanto, a formação de radicais LAOO $^\bullet$.

No entanto, a formação desses radicais por meio da oxidação por um elétron de LAOOH por HOCl é termodinamicamente desfavorável pois o HOCl é um forte oxidante por dois elétrons ($E^0\text{HOCl}/\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cl}^- = 1.08 \text{ V}$), mas um fraco oxidante por um elétron (Koppenol, 1994). O potencial de redução de HOCl está na faixa de 0,17 a 0,25 V (Koppenol, 1994) enquanto o potencial redução do sistema ROOH/ROO $^\bullet$ é de aproximadamente 1 V (Koppenol, 1990; Buettner, 1993).

Para explicar a formação de LAOO $^\bullet$ vasculhamos na literatura estudos sugerindo a formação de radicais mediados por HOCl. Encontramos alguns estudos, sendo que um deles propõe a transferência de Cl^+ na reação de HOCl e NO_2^- , formando um intermediário Cl-ONO que poderia se decompor gerando radicais $\text{Cl}^\bullet$ e $^\bullet\text{NO}_2$ (Eiserich *et al.*, 1996). Reação similar é reportado para a reação de HOCl com tióis (RSH) e aminas (RNH), no qual ocorre a formação de RSCl e RNHCl. Ambos os produtos são relativamente instáveis, decompondo-se (térmica ou catalisada por metais) para gerar radicais $\text{RS}^\bullet$ e $\text{Cl}^\bullet$ (Davies e Hawkins, 2000) ou $\text{RNH}^\bullet$ e $\text{Cl}^\bullet$ (Hawkins e Davies, 1998a; Hawkins e Davies, 1998b), respectivamente.

Com base nesses dados, pode-se propor que o HOCl reage com o LAOOH por meio de um mecanismo envolvendo transferência de Cl^+ , gerando uma espécie intermediária LAOOCI (**reação 5.8**), que se decompõe homoliticamente gerando radicais $\text{LAO}^\bullet$ e $\text{OCl}^\bullet$ (**reação 5.8**) ou $\text{LAOO}^\bullet$ e $\text{Cl}^\bullet$ (**reação 5.9**). O radical $\text{Cl}^\bullet$ é oxidante potente ($E^\circ \text{Cl}^\bullet/\text{Cl} = 2.2 - 2.6 \text{ V}$) (Wardman, 1989), portanto ele poderia promover a oxidação por um elétron de LAOOH para gerar $\text{LAOO}^\bullet$. O mesmo poderia ocorrer para $\text{LAO}^\bullet$ ($E^\circ \text{LAO}^\bullet/\text{LAOH} = 1,6 \text{ V}$) (Koppenol, 1990; Buettner 1993).

Uma outra reação mediada por HOCl que resulta na formação de radicais, é a reação com metais ou $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerando radicais $^\bullet\text{OH}$ (**reação 5.14 e 5.15**) (Folkes *et al.*, 1995; Long e Bielski, 1980; Candeias *et al.*, 1993). A reação de HOCl com Fe^{2+} é similar à reação de Fenton porém com uma cinética mais rápida ($k \sim 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 4-5) (Folkes *et al.*, 1995). Os $^\bullet\text{OH}$ formados nessa reação poderia reagir com LAOOH para gerar $\text{LAOO}^\bullet$. Porém os dados experimentais, obtidos por meio da utilização de Chelex[®] e manitol, apontam que não há envolvimento de metais e nem de $^\bullet\text{OH}$ nos mecanismos que levam a formação de $^1\text{O}_2$. Tanto o tratamento do tampão com Chelex[®] como a adição de manitol (1 ou 10 mM) na reação não inibiram a formação de $^1\text{O}_2$ monitorada por meio de medidas de emissão em 1270 nm.

Resumindo, os dados de luminescência e de captação química com EAS mostram claramente que a reação de HOCl com LAOOH ou EYPCOOH gera $^1\text{O}_2$. Experimentos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo responsável pela geração de $^1\text{O}_2$ nesse sistema, porém, a detecção de $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e HOCl, a detecção de radicais peroxila por EPR, e o fato do hidrogênio- α ser fundamental para a geração de $^1\text{O}_2$, suportam o envolvimento do mecanismo de Russell.

Finalmente, considerando-se que normalmente processos inflamatórios são acompanhados de peroxidação lipídica (Podrez *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002) é muito provável que haja a formação concomitante de hidroperóxidos de lipídios e HOCl em sítios muito próximos. Estudo recente, sugere que a mieloperoxidase enzima responsável pela produção de HOCl, seja um importante agente catalisador da peroxidação lipídica em sítios inflamatórios (Zhang *et al.*, 2002). Deste modo, a geração de $^1\text{O}_2$ pela reação de HOCl com hidroperóxidos de lipídios pode estar contribuindo, pelo menos em parte, para a formação de um amplo espectro de produtos de oxidação, normalmente detectados em tecidos ou células submetidos à condições de estresse oxidativo, como ocorre na aterosclerose.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A estratégia utilizada para a síntese de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ por meio da fotossensibilização de LA na presença de azul de metileno em ambiente hermeticamente fechado contendo $^{18}\text{O}_2$, mostrou-se bastante eficiente, resultando na geração do hidroperóxido marcado com uma pureza maior que 99 %, como confirmado pela análise no espectrômetro de massa.

A utilização de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, captadores químicos específicos para $^1\text{O}_2$, HPLC-MS/MS e medidas de luminescência por meio de um sistema de detecção de emissão de luz desenvolvido em colaboração com a empresa Edinburgh Instruments Ltd., permitiram caracterizar e demonstrar de forma inequívoca a geração de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH ou EYPCOOH com oxidantes de relevância biológica, como metais (Ce^{4+} ou Fe^{2+}), peroxinitrito (ONOO^-) e ácido hipocloroso (HOCl).

A formação de $^1\text{O}_2$ nesses sistemas foi evidenciada por meio da detecção da emissão bimolecular e monomolecular do $^1\text{O}_2$ na região do visível e do infravermelho, respectivamente. Provas diagnósticas da formação de $^1\text{O}_2$ também foram obtidas pela observação do aumento da intensidade da emissão de luz na presença de D_2O e pela inibição desta na presença de azida de sódio, um forte supressor físico de $^1\text{O}_2$. Além disso, a formação de $^1\text{O}_2$ para os três sistemas foi inequivocamente demonstrada pela aquisição de espectros de emissão na região do infravermelho apresentando emissão máxima em 1270 nm, característico do decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$.

Utilizando $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ e DPA ou EAS como captador químico para $^1\text{O}_2$,

observou-se a formação do endoperóxido correspondente marcado ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ ou $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$), indicando a formação de $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ na reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com os três oxidantes testados. Em todos eles observou-se também a formação de endoperóxidos não marcados ($\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ ou $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) ou parcialmente marcados ($\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ ou $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$). Testes realizados na presença e na ausência de oxigênio dissolvido no meio de reação mostraram que este favorece a formação dos endoperóxidos não-marcados ou parcialmente marcados, indicando a participação de mecanismo de troca ou de transferência de energia entre oxigênios marcados com não marcados. Observou-se também um possível mecanismo de troca envolvendo o oxigênio presente na água.

A análise dos produtos da reação de $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ com Ce^{4+} por HPLC-MS/MS permitiu também a detecção dos produtos da reação, álcool e cetona marcada, característicos do mecanismo de Russell, evidenciando a formação de $^1\text{O}_2$ por esse mecanismo.

As particularidades de cada um dos três sistemas geradores de $^1\text{O}_2$ e os mecanismos envolvidos na geração de $^1\text{O}_2$ foram investigadas. O rendimento de $^1\text{O}_2$ estimado para a reação de LAOOH com Ce^{4+} foi de aproximadamente 7 %, consistente com os rendimentos calculados para a reação de hidroperóxidos orgânicos primários com Ce^{4+} descritos na literatura. A formação de $^1\text{O}_2$ na reação com ferro mostrou ocorrer apenas com o Fe^{2+} , sugerindo que a reação de Fe^{3+} com LOOH não é um eficiente gerador de radicais peroxila.

A geração de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com peroxinitrito mostrou sofrer inibição na presença DMSO e manitol, sugerindo o envolvimento de $\cdot\text{OH}$ no mecanismo de reação. Esse resultado é consistente com a geração deste radical

durante a decomposição homolítica do peroxinitrito e com o potencial desse radical em reagir com LAOOH gerando LAOO[•]. Esse fato e a detecção de $^{18}[^1\text{O}_2]$ na reação de LA¹⁸O¹⁸OH e peroxinitrito apontam o envolvimento do mecanismo de Russell na formação de $^1\text{O}_2$. O rendimento de $^1\text{O}_2$ estimado para a reação foi de 1-4 %.

A formação de $^1\text{O}_2$ na reação de LAOOH com HOCl mostrou ser dependente do pH, sendo máximo em pH neutro e alcalino. O rendimento máximo de $^1\text{O}_2$ em pH fisiológico para esta reação foi de 13 ± 2 %. A formação de $^1\text{O}_2$ mostrou ser dependente da presença de hidrogênio- α , uma vez que a reação de HOCl com hidroperóxidos terciários (*t*-BuOOH e CuOOH) não geraram $^1\text{O}_2$. O espectro adquirido por EPR em fluxo para a reação de LAOOH e HOCl mostrou um sinal com valor de $g = 2.014$, característico de radicais peroxila, indicando a formação de LAOO[•] na reação. Esses dados e a detecção de $^{18}[^1\text{O}_2]$ na reação de LA¹⁸O¹⁸OH e HOCl indicam fortemente o envolvimento do mecanismo proposto por Russell na formação de $^1\text{O}_2$ observado para esse sistema. Experimentos utilizando lipossomos enriquecidos com EYPCOOH mostraram que o HOCl também pode mediar a formação de $^1\text{O}_2$ em membranas por meio de sua interação com hidroperóxidos de fosfolípidios.

Em conjunto, os dados obtidos mostraram de forma clara e inequívoca que as reações de hidroperóxidos de lipídios com oxidantes de relevância biológica como, por exemplo, metais, peroxinitrito ou ácido hipocloroso, geram $^1\text{O}_2$.

Perspectivas

7. PERSPECTIVAS

Os dados deste trabalho indicam o potencial envolvimento de $^1\text{O}_2$ nos mecanismos patofisiológicos mediados por LOOH em sistemas biológicos onde haja a coexistência de outros oxidantes como os metais, o peroxinitrito ou o ácido hipocloroso. A formação de $^1\text{O}_2$ na interação de LOOH com proteínas contendo grupamento heme também foi proposto por outros pesquisadores. No entanto, até o momento, não há evidências sobre a geração de $^1\text{O}_2$ *in vivo* a partir de LOOH. Deste modo, a demonstração da formação de $^1\text{O}_2$ em sistemas mais complexos é fundamental para o esclarecimento da relevância biológica desse processo *in vivo*. Para isso também é importante o desenvolvimento de sondas sensíveis e específicas para $^1\text{O}_2$.

Estudos recentes mostram que LOOH estão envolvidos na sinalização da morte celular por apoptose. Verificou-se que a formação de hidroperóxidos de cardiolipina na membrana interna mitocondrial promove alterações nas interações hidrofóbicas com o citocromo c, resultando na liberação deste para o citossol. Considerando que a mitocôndria é uma das principais fontes de espécies reativas em sistema biológico, os hidroperóxidos de lipídios gerados poderiam interagir com outros oxidantes potentes e funcionar como fonte de $^1\text{O}_2$.

Este trabalho mostrou que a utilização de hidroperóxidos de lipídios marcados isotopicamente com oxigênio-18 acoplados a detecção de produtos por HPLC-MS/MS é uma ferramenta útil para a elucidação do mecanismo de geração de $^1\text{O}_2$ por meio do mecanismo de Russell. Estes hidroperóxidos marcados também podem servir como ferramentas úteis para a caracterização de modificações específicas em proteínas e DNA. Estudos nesse sentido estão sendo conduzidos em nosso laboratório.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, L.C., Fabian, I., Suzuki, K., Gordon G., 1992. Hypochlorous acid decomposition in the pH 5-8 region. *Inorg. Chem.* 31, 3534-3541.
- Allen, R.C., 1994. Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. *Environ. Health Perspect.* 102, 201-208.
- Allen, R.C., Stjernholm, R.L., Steele R.H., 1972. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun* 47:679-684.
- Arudi, R.L., Bielski, B.H., Allen, A.O., 1984. Search of singlet oxygen luminescence in the disproportionation of HO_2/O_2^- . *Photochem Photobiol* 39, 703-706.
- Aubry, J.M., Rigaudy J., Ferrandini C., Pucheault J., 1981. Search of singlet oxygen in the disproportionation of superoxide anion, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4965-4966.
- Aubry, J.M., Cazin B., 1988. Chemical sources of singlet oxygen II. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* 27, 2013.
- Aubry, J.M., 1991. New chemical sources of singlet oxygen. In *Membrane Lipid Oxidation*, Vigo-pelfrey, C., Ed., CRC Press, Boca Raton, Vol. 2.
- Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C.X., Menezes, S.L. 2002. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic.Biol. Med.*, 32, 841-859.
- Augusto, O., Gatti, R.M., Radi, R., 1994. Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinocydonimine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 118-125.
- Aw, T.Y., 1999. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 557-565.
- Babior, B.M., 1978, Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298, 659-668.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S., Curnutte, J.T., 1973. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Investig.* 52, 741-744.
- Baker, M.A., He, S., 1991. Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. *Free Rad.*

- Biol. Med.* 11, 563-572.
- Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G. 1997. Reduction of thymine hydroperoxide by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and glutathione transferases. *FEBS Lett.* 410, 210-212.
- Baynes, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40, 405-412.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624.
- Bennett, J.E., Summers, R., 1973. Electron-spin resonance spectra of secondary alkylperoxy radicals. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 269, 1043-1049.
- Benzi, G., Moretti, A., 1995. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 16, 661-674.
- Berliner, J.A., Heinecke, J.W., 1996. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 707-727.
- Bermejo, P., Gomez-Serranillos, P., Santos, J., Pastor, E., Gil, P., 1997. Determination of malonaldehyde in Alzheimer's disease: a comparative study of high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid test. *Gerontology* 43, 218-222.
- Bielski, B.H.J., Saito, E., 1971. Deuterium isotope effect on the decay kinetics of perhydroxyl radical. *J. Phys. Chem.* 75, 2263-2266.
- Blair, I.A., 2001. Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage. *Experim. Gerontol.* 36, 1473-1481.
- Bloodworth, A.J., Eggelte, H.J., 1985. Endoperoxides.. In: *Singlet O₂*. Vol II, AA Frimer (ed.) pp 93-204, CRC press, Boca Raton.
- Bonini, M.G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A.M., Augusto, O. 1999. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274, 10802-10806.
- Bonini, M.G., Augusto, O., 2001. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 276, 9749-54.
- Bonini, M.G., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Augusto, O., 2004. Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J Biol Chem.* 279, 51836-43.
- Brash, A.R., 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of

- substrate. *J Biol. Chem.* 274:23679-82
- Brigelius-Flohé, R. 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951-965.
- Browne, R.J., Ogryso, E.A., 1964. Chemiluminescence from reactions of chlorine with aqueous hydrogen peroxide. *P. Chem. Soc. London*, 117.
- Buege, J., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- Burcham, P.C., Harkin, L.A., 1999. Mutations at G:C base pairs predominate after replication of peroxy radical-damaged pSP189 plasmids in human cells. *Mutagenesis* 14, 135-140.
- Burcham, P.C., 1999. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.* 443, 11-36.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1986. Vitamin-E application of the principles of physical organic-chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19, 194-201.
- Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B., 1980. Chemiluminescence of lipid vesicles supplemented with cytochrome c and hydroperoxide. *Biochem. J.* 188, 577-583.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222-230.
- Cadenas, E., Sies H., 1984. Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Methods Enzymol.* 105, 221-231.
- Cadenas, E., Sies, H., 2000. Formation of electronically excited states during the oxidation of arachidonic acid by prostaglandin endoperoxide synthase. *Methods Enzymology* 319, 67-77.
- Cahill, A.E., Taube, H. 1952. The use of heavy oxygen in the study of reactions of hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2312-2318.
- Candeias, L.P., Patel, K.B., Stratford, M.R.L., Wardman, P., 1993. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett.* 333, 151-153.
- Carr, A.C., van den Berg, J.J.M, Winterbourn, C.C., 1996. Chlorination of cholesterol in cell membranes by hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 63-69.
- Chae, H.Z., Kang, S.W., Rhee, S.G., 1999. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Methods Enzymol.* 300, 219-226.
- Chamulitrat, W., Mason, R.P., 1989. Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of

- polyunsaturated fatty acids by lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 264, 20968-20973.
- Chan, H.W.-S., Levett, G., Matthew, J.A., 1979. The mechanism of rearrangement of linoleate hydroperoxides. *Chem. Phys. Lipids* 24, 245-256.
- Cheson, B.D., Christensen, R.L., Sperling, R., Kohler, B.E., Babior, B.M., 1976. The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J. Clin. Invest.* 58, 789-796.
- Cilento G, Adam W., 1995. From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.* 19,103-114.
- Cistola, D.P., Small, D.M., 1991. Fatty acid distribution in systems modelling the normal and diabetic human circulation. *J. Clin. Invest.* 87, 1431-1441.
- Coddington, J.W., Hurst, J.K., Lyman, S.V., 1999. Hydroxyl radical formation during peroxynitrous decomposition, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 2438-2443.
- Corey, E.J., Taylor, W.C., 1964. Study of peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 3881-3882.
- Crabb, J. W., Oneil, J., Miyagi, M., West, K., Hoff, H.F., 2002. Hydroxynonenal inactivates cathepsin B by forming Michael adducts with active site residues. *Protein Science* 11, 831-40.
- Dalle Carbonare, M., Pathak, M.A., 1992. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B* 14, 105-124.
- Daum G., 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 1-42.
- Davies, M.J., Hawkins, C.L., 2000. Hypochlorite-induced oxidation of thiols: formation of thiyl radicals and the role of sulfenyl chlorides as intermediates. *Free Radic. Res.* 33, 719-729.
- Davies, M.J., 2004. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol Sci.* 3, 17-25.
- Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M., Radi, R., 1996. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49-58.
- 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-naphthylene)dipropionate endoperoxide. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2909-2914.
- Di Mascio, P., Catalani, L.H., Bechara, E.J., 1992. Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipoperoxidation? *Free Radic. Biol. Med.* 12, 471-478.

- Di Mascio, P., Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Briviba, K., and Sies, H., 1994. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 355, 287-289.
- Dix, T.A., Marnett, L.J., 1985. Conversion of linoleic acid hydroperoxide to hydroxy, keto, epoxyhydroxy, and hydroxy fatty acids by hematin. *J. Biol. Chem.* 260:5351-5357
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Koberlik, M., Moan, J., Peng, Q., 1998. Photodynamic therapy. *J. Natl. Canc. Inst.* 90, 889-905.
- Duling, D.R., 1994. Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J. Magnet. Reson. Series B*, 104, 105-110.
- Echtay K.S., Roussel D., St-Pierre J., Jekabsons M.B., Cadenas S., Stuart J.A., Harper J.A., Roebuck S.J., Morrison A., Pickering S., Clapham J.C., Brand M.D., 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96-99.
- Echtay K.S., Esteves T.C., Pakay J.L., Jekabsons M.K., Lambert A.J., Portero-Otin M., Pamplona R., Vidal-Puig A.J., Wang S., Roebuck S.J., Brand M., 2003. A signaling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO J.* 22, 4103-4110.
- Eiserich, J.P., Cross, C.E., Jones, A.D., Halliwell, B., van der Vliet, A., 1996. Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J. Biol. Chem.* 271, 19199-19208.
- Ek-von Mentzer, B.A., Zhang, F., Hamilton, J.A., 2001. Binding of 13-HPODE and 15-HETE to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins. Implications for transmembrane and intracellular transport and for protection from lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* 276, 15575-15580.
- Esterbauer, H. Shaur, J.S., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81-128.
- Esterbauer, H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid oxidation-products. *Am. J. Clin. Nutr.* 57 (suppl): 779S-786S.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G., 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 341-390.
- Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Schneider, J.E., 1990. Mediation of 8-hydroxy-guanine formation in DNA by thiazin dyes plus light. *Free Radic Biol Med.* 8(4), 327-330.
- Folkes, L.K., Candeias, L.P., Wardman, P., 1995. Kinetics and mechanisms of hypochlorous

- acid reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 120-126.
- Foote, C.S., 1968. Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* 162, 963-970.
- Foote, C.S., 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659.
- Foote, C.S., Clennam, E.L., 1995. Properties and reactions of singlet dioxygen. *In Active oxygen in chemistry*, Foote, C.S., Valentine, J.S., Greenberg, A., and Liebman, J.F., Eds. Vol. 2, p 105.
- Foote, C.S., Denny R.W., 1971. Chemistry of singlet oxygen. 12. Electronic effects on rate and products of reaction with olefins. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 5162
- Foote, C.S., Wexler, S., 1964a. Olefin oxidations with excited singlet molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 3879.
- Foote, C.S., Wexler, S., 1964b. Singlet oxygen. A probable intermediate in photosensitized autoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 3880.
- Foote, C.S., Shook, FC, Abakerli, RA, 1980. Chemistry of superoxide ion. 4. Singlet oxygen is not the major product of dismutation. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 2503-2504.
- Foote, C.S., Shook, FC, Abakerli, RA, 1984. Characterization of singlet oxygen. *Methods in Enzymol.* 105, 36-47.
- Frankel, E.N., 1985. Chemistry of free radical and singlet oxygen of lipids. *Prog. Lipid Res.* 23, 197-221.
- Frankel, E.N., 1991. Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food. Agr.* 54: 495-511.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., and Bressler, T.R., 1979. Analysis of autooxidized fats by gas-chromatography mass spectrometry. V. Photosensitized oxidation. *Lipids*, 14, 961-967.
- Fridovich, I., 1978. Biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.
- Frimer, A.A., 1985. *Singlet O₂*, CRC Press: Boca Raton, Vol. I.
- Fu, Y., Kanofsky, J.R., 1995. Singlet oxygen generation from liposomes: a comparison of time-resolved 1270 nm emission with singlet-oxygen kinetics calculated from a one dimensional model of singlet oxygen diffusion and quenching. *Photochem Photobiol* 62, 692-702.
- Gardner, H.W., Kleiman, R., 1981. Degradation of linoleic acid hydroperoxides by a cysteine-FeCl₃ catalyst as a model for similar biochemical reactions. II. Specificity in formation of fatty acid epoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 665:113-125.
- Gardner H.W., 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 65-86.

- Gatti, R.M.; Alvarez, B.; Vásquez-Vivar, J.; Radi, R.; Augusto, O., 1998. Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxyxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 349, 36-46.
- Gilbert, B.C., Kelsall, P.A., Sexton, M.D., McConnachie, G.D.G., Symons, M.C.R., 1984. Electron-spin resonance studies of the photolysis and radiolysis of o,o'-dialkyl hydrogen phosphorodithioates [(RO)₂P(S)SH], corresponding disulfides, and related compounds – formation of the thio and dithio radicals, radical ions, and phosphorus-centered radicals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 629-639.
- Girotti A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39, 1529-1542.
- Girotti, A.W., 1992. Photosensitized oxidation of cholesterol in biological system: reaction pathways, cytotoxic effects, and defense mechanisms, *J. Photochem. Photobiol.* 13, 105-118.
- Girotti, A.W., Kriska, T., 2004. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signalling. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 301-310.
- Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., van Nieuwenhoven, F.A., van der Vusse, G.J., 1997. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57, 3-9.
- Goglia F., Skulachev V.R., 2003. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. *FASEB J.* 17, 1585-1591.
- Goldstein, B.D., Balchum, O.J., Demopoulos, H.B., Duke, P.S., 1968. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. Free radical signals associated with ozonization of linoleic acid. *Arch. Environm. Health* 17, 46-49.
- Gunstone, F.D., 1984. Reaction of oxygen and unsaturated fatty acids. *JAOCS* 61, 441-447
- Hagihara, M., Nishigaki, I., Maseki, M., Yagi, K., 1984. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in the lipoprotein fractions of human serum. *J. Gerontol.* 39, 269-272.
- Hall, R.D., Chamulitrat, W., Takahashi, N., Chignell, C.F., and Mason, R.P., 1989. Detection of singlet oxygen oxygen phosphorescence during chloroperoxidase-catalyzed decomposition of ethyl hydroperoxide. *J. Biol. Chem.* 264, 7900-7906.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 186: 1-85.
- Halliwell, G., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Inc., New York.

- Hamberg, M., Samuelsson, B., 1980. Stereochemistry in the formation of 9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid and 13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid from linoleic acid by fatty acid cyclooxygenase. *Biochim Biophys Acta* 617, 545-547.
- Hamilton, J.A., Kamp, F., 1999. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48, 2255-2269.
- Hampton, MB, Kettle, AJ, Winterbourn, CC, 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-3017.
- Harrison JE, Watson BD, Schultz J., 1978. Myeloperoxidase and singlet oxygen-reappraisal. *FEBS Lett* 92, 327-332.
- Hasty, N., Merkel, P.B., Radlick P., Kearns, D.R., 1972. Role of azide in singlet oxygen reactions: reaction of azide with singlet oxygen. *Tetrahedron Lett.*, 49-52.
- Hawco, F.J., O'Brien C.R., O'Brien, P.J., 1977. Singlet oxygen generation during hemoprotein catalyzed lipid peroxide decomposition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 354-361.
- Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J., 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*. 25, 259-274.
- Hawkins, C.L., Davies, M.J., 1998a. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.* 332, 617-625.
- Hawkins, C.L., Davies, M.J., 1998b. Reaction of HOCl with amino acids and peptides: EPR evidence for rapid rearrangement and fragmentation reactions of nitrogen-centered radicals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1937-1945.
- Heinecke J.W., 1999. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 133, 321-325.
- Held A.M., Halko D.J., Hurst J.K., 1978. Mechanism of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5732-5740.
- Henderson, J. P., Byun, J., Heinecke, J.W., 1999. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system by phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial RNA. *J. Biol. Chem.* 274, 33440-33448.
- Hirai, S., Okamoto, K., Morimatsu, M., 1982. Lipid peroxide in aging process. In: Yagi, K. (Ed.), *Proc. Int. Conf. on Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, 1980. Academic Press, New York, pp. 305-315.
- Hoebeke, M., 1995. The importance of liposomes as models in the understanding of photosensitization mechanisms. *J Photochem Photobiol B Biol* 28, 189-196.

- Hostetler K.Y., van den Bosch H., 1972. Subcellular and submitochondrial localization of biosynthesis of cardiolipin and related phospholipids in rat-liver. *Biochim. Biophys. Acta* 260, 380-386.
- Howard, J.A, Ingold, K.U., 1968. The self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 1056-1058.
- Howes, R.M., Steele, R.H., 1972. Microsomal (S) chemiluminescence (CL) induced by NADPH and its relation to lipid peroxidation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 2, 619-626.
- Hughes, M.N., Nicklim, H.G., 1968. *J. Chem. Soc. A.* 2, 450-456.
- Hwang, D., Rhee, S.H., 1999. Receptor mediated signalling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 545-556.
- Imai, H., Nakagawa, Y., 2003. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 145-169.
- Ingold, K.U., 1969. Peroxy radicals. *Accts. Chem. Res.* 2, 1-9.
- Inouye, S., 1984. Site-specific cleavage of double-stranded DNA by hydroperoxide of linoleic acid. *FEBS Lett.* 172, 231-234.
- Iverson S.L., Orrenius S., 2004. The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 37-46.
- Jaburek, M., Miyamoto S., Di Mascio, P., Garlid, K.D., Jezek, P., 2004. Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J. Biol. Chem.* 279:53097-53102, 2004.
- Janzen, E.G., Krygsmann, P.H., Lindsay, D.A., Haire, D.L., 1990. Detection of alkyl, alkoxyl, and alkylperoxyl radicals from the thermolysis of azobis(isobutyronitrile) by ESR/spin trapping. Evidence for double spin adducts from liquid-phase chromatography and mass spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 8279-8284.
- Jones, I.T.N, Bayes, K.D., 1972. Eletronic transfer from $^{32}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) to $^{36}\text{O}_2$ Σ^{-3}_g . *J. Chem. Phys.* 57, 1003.
- Kagan V.E., Borisenko G.G., Serinkan B.F., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Potapovich A.I., Kini V., Amoscato A.A., Fujii Y., 2004. Oxidative lipidomics of apoptosis: interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1963-1985.
- Kajiwara, T., Kearns, DR, 1973. Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 5886-5890.

- Kakinuma, K., Cadenas, E., Boveris, A., Chance, B., 1979. Low level chemiluminescence of intact polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* 102, 38-42.
- Kalyanamaran, B., Mason, R.P., Tainer, B., Eling, T.E., 1982. The free radical formed during the hydroperoxide-mediated deactivation of ram seminal vesicles is hemoprotein-derived. *J. Biol. Chem.* 257, 4764-4768.
- Kanofsky, J.R., 1986. Singlet oxygen production by bleomycin: a comparison with heme-containing compounds. *J. Biol. Chem.* 261, 13546-13550.
- Kanofsky, J.R., 1986a. Singlet oxygen production from the reactions of alkylperoxy radicals. Evidence from 1268 nm chemiluminescence. *J. Org. Chem.* 51, 3386-3388.
- Kanofsky, J.R., Axelrod, B., 1986. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 261, 1099-1104.
- Kanofsky, JR, 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chem. Biol. Interactions* 70, 1-28.
- Kautsky, H., 1939. Quenching of luminescence by oxygen. *Trans. Faraday Soc.* 35, 216.
- Kellog, R.E., 1969. Mechanism of chemiluminescence from peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 5433-5436.
- Kellogg, E.W. 3rd, Fridovich, I. 1975, Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* 250, 8812-8817.
- Khan, A.U., 1970. Singlet molecular oxygen from superoxide anion and sensitised fluorescence of organic molecules. *Science* 168, 476.
- Khan, A.U., 1981. Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) in the reaction of potassium superoxide with water. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6516-6517.
- Khan, A.U., 1984. Myeloperoxidase singlet molecular oxygen generation detected by direct infrared electronic emission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 668-675.
- Khan, A.U., Kasha, M., 1963. Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 39, 2105.
- Khan, A.U., Kasha, M., 1970. Chemiluminescence arising from simultaneous transitions in pairs of singlet oxygen molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 3293-3300.
- Khan, A.U., Kasha, M., 1979. Direct spectroscopic observation of singlet oxygen emission at 1268 nm excited by sensitizing dyes of biological interest in liquid solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6047-6049.
- Khan, A.U., Kasha, M. 1994a. Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: application to studies on the deleterious health effects of

- chlorinated drinking water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 12362-12364.
- Khan A.U., Kovacic D., Kolbanovskiy A., Desai M., Frenkel K., Geacintov N.E., 2000. The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO-) and singlet oxygen in aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 2984-2989.
- King, M.M., Lai, E.K., McCay, P.B., 1975. Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes. *J Biol Chem.* 250, 6496-502.
- Kiryu, C., Makiuchi, M., Miyazaki, J., Fujinaga, T., Kakinuma K., 1999. Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. *FEBS Lett*, 443, 154-158.
- Klebanoff S.J., 1999. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians.* 111, 383-389. Review.
- Koga, S., Nakano, M., Uehara, K., 1991. Mechanism for the generation of superoxide anion and singlet oxygen during heme compound-catalyzed linoleic acid hydroperoxide decomposition. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 223-229.
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S., 1992. Peroxyxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxic.* 5, 834-842.
- Koppenol, W.H., 1990. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS Lett.* 264, 165-167.
- Koppenol, W.H., 1994. Thermodynamic considerations on the formation of reactive species from hypochlorite, superoxide and nitrogen monoxide. Could nitrosyl chloride be produced by neutrophils and macrophages? *FEBS Lett.* 347, 5-8.
- Krinsky, N.I., 1974. Singlet excited oxygen as a mediator of the antibacterial action of leukocytes. *Science.* 1974, 186, 363-365.
- Kühn, H., Borchert, A., 2002. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 154-172.
- Kühn, H., Wiesner, R., Lankin, V.Z., Nekrasov, A., Alder, L. and Schewe, T., 1987. Analysis of the stereochemistry of lipoxygenase-derived hydroxypolyenoic fatty acids by means of chiral phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 160, 24-34.
- Kulig, M.J., Smith, L.L., 1973. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *J. Org. Chem.* 38, 3639-3642.
- Lassegue, B., Clempus, R.E., 2003. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R277-297.
- Loidl-Stahlhofen, A., Hannemann, K. and Spiteller, G., 1994. Generation of α -hydroxylaldehydic compounds in the course of lipid peroxidation. *Biochim.*

- Biophys. Acta* 1213, 140-148.
- Long, C.A., Bielski, B.H.J., 1980. Rate of reaction of superoxide radical with chloride-containing species *J. Phys. Chem.* 84, 555-557.
- Loureiro, A.P., Di Mascio, P., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., 2000. Trans-trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 601-609.
- Loureiro, A.P., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G., 2002. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova* 25, 777-793.
- Lymar, S.V.; Hurst, J. K. 1995. Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8867-8868.
- Lymar, S.V.; Hurst, J.K. 1998. CO₂-catalyzed one-electron oxidations by peroxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.*, 37, 294-301.
- MacMillan, D.K., Murphy, R.C 1995. Analysis of lipid hydroperoxides and long-chain conjugated keto acids by negative ion electrospray mass spectrometry. *J. Am. Mass Spectrom.*, 6, 1190-1201.
- Markesbery, W.R., 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134-147.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malonaldehyde. *Mutat. Res.* 424, 83-95.
- Marnett, L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Martinez, G.R., Di Mascio P., Bonini M.G., Augusto O., Briviba K., Sies H., Maurer P., Rothlisberger U., Herold S., Koppenol W.H., 2000a. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen (¹Δ_g O₂) and nitroxyl (NO⁻). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97, 10307-10312.
- Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P., 2000b. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 10212-10213.
- Martinez, G.R., Medeiros M.H.G., Ravanat J.L., Cadet J., Di Mascio P., 2002. [¹⁸O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives. *Biol Chem.* 383, 607-17.
- Martinez, G.R., Ravanat J.L., Cadet J., Miyamoto S., Medeiros M.H.G., Di Mascio P., 2004. Energy transfer between singlet (¹Δ_g) and triplet (³Σ_g⁻) molecular oxygen in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3056-3057.

- Masuda M., Suzuki T., Friesen M.D., Ravanat J.L., Cadet J., Pignatelli B., Nishino H., Ohshima H., 2001. Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. Catalysis by nicotine and trimethylamine. *J. Biol. Chem.* 276, 40486-40496.
- McCall, D.B., 1984. Sodium 9,10-bis(2-ethylene)anthracene disulfate: a new water-soluble singlet oxygen trap for biological systems and polymer-immobilized naphthalene endoperoxides: a new convenient singlet oxygen generator. *Tese da Wayne State University*.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxido dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- McCord, J.M., Keele, B.B.Jr, Fridovich, I., 1971. An enzyme-based theory for obligate anaerobiosis: the physiological production of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 1024-1027.
- Mehlhorn, R.J., Keith, D.A., 1972. In, *Membrane Molecular Biology*, Fox, C.F., Keith, D.A. eds., Simauer Associates, Stanford, CT, pp. 192-227.
- Mendenhall, G.D., Sheng, X.C., Wilson, T., 1991. Yields of excited carbonyl species from alkoxyl and from alkylperoxy radical dismutation. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 8976-8977.
- Mentzer, B.A.E., Zhang, F., Hamilton, J.A., 2001. Binding of 13-HODE and 15-HETE to phospholipid bilayers, albumin, and intracellular fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 15575-15580.
- Merényi, G., Lind, J. 1997. Thermodynamics of peroxynitrite and its CO₂ adduct. *Chem. Res. Toxicol.* , 10, 1216-1220.
- Merényi, G., Lind, J., 1998. Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH) / peroxynitrite (ONOO⁻) system. *Chem Res Toxicol* 11, 243-6.
- Merényi, G., Lind, J., Czapski, G., Goldstein, S., 2000. The decomposition of peroxynitrite does not yield nitroxyl anion and singlet oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 8216-8218.
- Merényi, G.; Lind, J.; Goldstein, S.; Czapski, G. 1998. Peroxynitrous acid homolyzes into ^{*}OH and ^{*}NO₂ radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 712-713.
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., 1972. Remarkable solvent effects on the lifetime of 1dg oxygen. *J Am Chem Soc.* 94, 1029-1030.
- Mills, G.C., 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229, 189-197.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2003a. Direct evidence of singlet molecular oxygen [O₂(¹Δ_g)] production in the reaction of linoleic acid

- hydroperoxide with peroxynitrite. *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., Dupas, C., Murota, K., Terao, J., 2003c. Phospholipid hydroperoxides are detoxified by phospholipase A2 and GSH peroxidase in rat gastric mucosa. *Lipids*, 38, 641-649.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. ^{18}O -Labeled lipid hydroperoxides and HPLC coupled to mass spectrometry as valuable tools for studying the generation of singlet oxygen in biological system. *Biofactors*, 22, 333-339.
- Morris, J.C., 1966. Acid ionisation constant of HOCl from 5 to 35 degrees, *J Phys Chem* 70, 3798.
- Mulliez, E., Leblanc, J.P., Girerd, J.J., Rigaud, M., Chottard, J.C. 1987. 5-Lipoxygenase from potato-tubers – improved purification and physiological characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 916, 13-23.
- Munday, R., Winterbourn, C.C., 1989. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism *Biochem. Pharm.* 38, 4349-4352.
- Murray, R.W., 1979. Chemical sources of singlet oxygen, in Singlet Oxygen (H.H. Wasserman and R.W. Murray, eds.), pp. 59-114, Academic Press, New York.
- Musatov, A., Carroll, C.A., Liu, Y.C., Henderson, G.I., Weintraub, S.T., Robinson, N.C., 2002. Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 41, 8212-8220.
- Naito, C., Kawamura, M., Yamamoto, Y., 1993. Lipid peroxidation as the initiating factor of atherosclerosis. *Ann. New York Acad. Sci.* 676, 27-45.
- Nakano, M, Noguchi, T., Sugioka, K., Fukuyama, H., Sato, M., Shimizu, Y., Tsuji, Y., and Inaba, H., 1975. Spectroscopic evidence for the generation of singlet oxygen in the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent microsomal lipid peroxidation system. *J. Biol. Chem.* 250, 2404.
- Nigam S., Schewe T., 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488, 167-181.
- Nilsson, R., Kearns, D.R., 1974. Role of singlet oxygen in some chemiluminescence and

- enzyme oxidation reactions. *J. Phys. Chem.* 78, 1681-1683.
- Niu, Q., and Mendenhall, G.D., 1990. Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g \text{O}_2$) from alkylperoxyl radical recombination. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1656-1657.
- Noguchi, N., Nakada, A., Itoh, Y., Watanabe, A., Niki, E., 2002. Formation of active oxygen species and lipid peroxidation induced by hypochlorite. *Arch Biochem Biophys.*, 397, 440-447.
- Oae, S., Fujimori, K., 1983. Preparation and uses of isotopically labelled peroxides. In *The Chemistry of Peroxides*, Patai, S., Ed., John Wiley & Sons, pp. 585-648.
- O'Donnell, V.B., Eiserich, J.P., Bloodsworth, A., Chumley, P.H., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V.M., Freeman, B.A. 1999a. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species. *Methods Enzymol.* 454-470.
- O'Donnell, V.B., Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM, Freeman BA. 1999b. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol* 12, 83-92.
- Ogura, Y., Yamazaki, I., 1983. Steady-state kinetics of the catalase reaction in the presence of cyanide *J. Biochem.* 94, 403-408.
- Osipov, A.N., Panasenko, O.M., Chekanov, A.V., Arnhold, J., 2002. Interaction of tert-butyl hydroperoxide with hypochlorous acid. A spin trapping and chemiluminescence study. *Free Radic Res.* 36, 749-754.
- Otamiri, T., Sjobahl, R., 1989. Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer* 64, 422-425.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 99, 1259-1263.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.
- Panasenko, O.M., 1997. The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *Biofactors* 6, 181-190.
- Panasenko, O.M., Evgina, S.A., Aidyraliev, R.K., Sergienko, V.I., Vladimirov, Y.A., 1994. Peroxidation of human blood lipoproteins induced by exogenous hypochlorite or hypochlorite generated in the system of "myeloperoxidase $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^-$ ". *Free Radic Biol. Med.* 16, 143-148.

- Panasenko, O.M., Arnhold, J., Vladimirov, Y.A., Arnhold, K., Sergienko, V.I., 1997a. Hypochlorite-induced peroxidation of egg yolk phosphatidylcholine is mediated by hydroperoxides *Free Radic. Res.* 27, 1-12.
- Panasenko, O.M., Arnhold, J., Schiller, J., 1997b. Hypochlorite reacts with an organic hydroperoxide forming free radical, but not singlet oxygen, and thus initiates lipid peroxidation, *Biochemistry (Moscow)*, 62, 951-959.
- Panasenko, O.M., Arnhold J., 1999. Linoleic acid hydroperoxide favours hypochlorite- and myeloperoxidase-induced lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 30, 479-487.
- Panasenko, O.M., Osipov A.N., Chekanov A.V., Arnhold J., Sergienko V.I. 2002. Peroxyl radical is produced upon the interaction of hypochlorite with tert-butyl hydroperoxide. *Biochemistry (Mosc)*. 67, 880-888.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., 1997. Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 5-8.
- Paradies, G., Ruggiero, F.M., Petrosillo, G., Quagliariello, E., 1998. Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alterations. *FEBS Lett.* 424, 155-158.
- Park, J.-W., Floyd, R.A., 1992. Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 12, 245-250.
- Patel, R.P., Moellering, D., Murphy-Ullrich, J., Jo, H., Beckman, J.S., Darley-Usmar, V.M., 2000. Cell signalling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1780-1794.
- Pattison, D.I., Hawkins, C.L., Davies, M.J., 2003. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chem. Res. Toxicol.* 16, 439-449.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., Paradies, G., 2001. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in apoptosis. *FEBS Lett.* 509, 435-438.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulou, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., Behne, D., 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J.* 15, 1236-1238.
- Pierlot, C., Aubry, J.M., Briviba, K., Sies, H., Di Mascio, P., 2000. Naphthalene

- endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods in Enzymol.* 319, 3-20.
- Podrez, E.A., Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L., 2000. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol Med.* 28, 1717-1725.
- Porter, N.A. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids.* 30, 277-290.
- Porter, N.A., 1986. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262-268.
- Pradhan, D., Weiser, M., Lumley-Sapanski, K., Frazier, D., Kemper, S., Williamson, P., Schlegel, R.A., 1990. Peroxidation-induced perturbations of erythrocyte lipid organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 398-404.
- Prutz, W.A., 1996. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA and other biological substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 332, 110-120.
- Prutz, W.A., 1998. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 183-191.
- Pryor, W.A., Porter, N.A., 1990. Suggested mechanism for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 541-543.
- Qian, S.Y., Wang, H.P., Schafer, F.Q., Buettner, G.R. 2000. EPR detection of lipid-derived free radicals from PUFA, LDL, and cell oxidations. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 568-579.
- Qiong, G., Qian, S.Y., Mason, R.P., 2003. Separation and identification of DMPO adducts of oxygen-centered radicals formed from organic hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 14, 862-871.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487.
- Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A., 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 463-488.
- Rao, G.N., Glasgow, W.C., Eling, T.E. e Runge, M.S., 1996. Role of hydroperoxyeicosatetraenoic acids in oxidative stress-induced activating protein 1 (AP-1) activity. *J. Biol. Chem.* 271(44): 27760-27764.
- Ravanat, J.-L., Di Mascio P., Martinez, G.R., Medeiros, H.G., Cadet, J., 2000. Singlet oxygen

- induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 275, 40601-40604.
- Ravanat, J.-L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Cadet, J., 2004. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 23-30.
- Reis, A.R., Domingues, R.M., Amado, F.M.L., Ferrer-Correia, A.J.V., Domingues, P., 2003. Detection and characterization by mass spectrometry of radical adducts produced by linoleic acid oxidation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 14, 1250-1261.
- Rosen, H., Klebanoff, S.J., 1977. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 252, 4803-4810.
- Rota, C., Barr, D.P., Martin, M.V., Guengerich, F.P., Tomasi, A., Mason, R.P., 1997. Detection of free radicals produced from the reaction of cytochrome P-450 with linoleic acid hydroperoxide. *Biochem. J.* 328, 567-571.
- Rowley, D., Gutteridge, J.M.C., Blake, D., Farr, M., Halliwell, B., 1984. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin. Sci.* 66, 691-695.
- Russell, G.A., 1957. Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3871-3877.
- Ryter, S.W., Tyrrell, R.M., 1998. Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): a possible effector of eukariotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1520.
- Salgo, M.G., Corongiu, F.P., Sevaniam, A., 1993. Enhanced interfacial catalysis and hydrolytic specificity of phospholipase A2 toward peroxidized phosphatidylcholine vesicles. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 123-132.
- Sarkany, R.P.E., 2001. The management of porphyria cutanea tarda. *Clin. Experim. Dermat.*, 26, 225-232.
- Sawada, M., Carlson, J.C., 1987. Changes in superoxide radical and lipid peroxide formation in the brain, heart and liver during lifetime of the rat. *Mech. Ageing Devel.* 41, 125-137.
- Schilstra, M.J., Veldink, G.A., Verhagen, J., Vliegthart, J.F.G., 1992. Effect of lipid hydroperoxides on lipoxygenase kinetics, *Biochemistry* 33, 7692-7699
- Schlame, M., Rua, D., Greenberg, M.L., 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog. Lipid Res.* 39, 257-228.
- Schneider, C., Tallman, K.A., Porter, N.A., Brash, A.R., 2001. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformations of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *J. Biol. Chem.* 276, 20831-20838.

- Seliger, H.H., 1960. A photoelectric method for the measurement of spectra of light sources of rapidly varying intensities. *Anal. Biochem.* 1, 60-65.
- Shidoji Y., Hayashi K., Komura S., Ohishi N., Yagi K., 1999. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 343-347.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.*, 91:31S-38S.
- Spalteholz H., Wenske K., Panasencko O.M., Schiller J., Arnhold J., 2004. Evaluation of products upon the reaction of hypohalous acid with unsaturated phosphatidylcholines. *Chem. Phys. Lipids* 129, 85-96.
- Spickett C.M., Jerlich A., Panasencko O.M., Arnhold J., Pitt A.R., Stelmazynska T., Schaur R.J., 2000. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol*, 47, 889-899.
- Spiteller, G., 1998. Linoleic acid peroxidation – the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein – and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids* 95, 105-162.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 191-208.
- Steinbeck, M.J., Khan, A.U., Karnovsky, M.J., 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J Biol Chem.* 267, 13425-33.
- Sugihara T., Rawvicz W., Evans E.A., Hebbel R.P., 1991. Lipid hydroperoxides permit deformation-dependent leak of noncovalent cation from erythrocytes. *Blood* 77, 2757-2763.
- Sugioka, K., Nakano, M., 1976. A possible mechanism of the generation of singlet molecular oxygen in NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 423, 203-216.
- Symons, M.C.R., 1969. Shape of alkyl radicals by electron spin resonance. *Nature* 223, 1123.
- Takayama, F., Egashira, T., and Yamanaka, Y., 2001. Singlet oxygen generation from phosphatidylcholine hydroperoxide in the presence of copper. *Life Sciences* 68, 1807-1815.
- Tatsuzawa, H., Maruyama, T., Hori, K., Yoshiaki, S., Nakano, M., 1999. Singlet oxygen ($^1\Delta_g$ O₂) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 647-650.

- Terao, J., Matsushita, S., 1977. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54, 234-238.
- Terao, J., Matsushita, S., 1981. The isomeric compositions of hydroperoxides produced by oxidation of arachdonic acid with singlet oxygen. *Agric. Biol. Chem.* 45, 587-593.
- Terao, J., Hirota, M., Kawakatsu, M., Matsushita, S., 1981. Structural analysis of hydroperoxides formed by oxidation of phosphatidylcholine with singlet oxygen. *Lipids* 16, 427-432.
- Terao, J., Shibata, S.S., Matsushita, S., 1988. Selective quantification of arachdonic acid hydroperoxides and their hydroxy derivatives in reverse-phase high performance liquid-chromatography. *Anal. Biochem.* 169, 415-423.
- Timmins, G.S., dos Santos, R.E., Whitwood, A.C., Catalani, L.H., Di Mascio, P., Gilbert, B.C., Bechara, E.J., 1997. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1090-6.
- Thomas, J.P., Maioriono, M., Ursini, F., Girotti, A.W., 1990. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* 265, 454-461.
- Thomas, J.R., 1963. Stability of cumylperoxy radical-pyridine charge-transfer complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 591
- Thomas, J.R., 1964. Identification of peroxy radicals by electron paramagnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 959
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.
- 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.
- Tyrrell, R.M., 1994. The molecular and cellular aspects of solar ultraviolet radiation. *Mol. Aspect Med.* 15, 1-77.
- Tyurina, Y.Y., Shvedova, A.A., Kawai, K., Tyurin, V.A., Kommineni, C., Quinn, P.J., Schor, N.F., Fabisiak, P., Kagan, V.E., 2000. Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine. *Toxicology* 148, 93-103.
- Uchida, K., 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 42, 318-343.

- Ueda, K., Kobayashi, S., Morita, J., Komano, T., 1985. Site-specific DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim. Biophys. Acta* 341-348.
- Uri, N., 1961. Physico-chemical aspects of autoxidation. In *Autoxidation and Antioxidants* (Lundberg, W.O., ed.), vol I, pp. 55-106, John Wiley, Interscience, New York.
- 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.
- Ursini, F., Maiorino, M., Valente, M., Ferri, L., Gregolin, C., 1982. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta* 710, 197-211.
- Valentine, M.R., Rodrigues, H., Termini, J., 1998. Mutagenesis by peroxy radical is dominated by transversions at deoxyguanosine: evidence for the lack of involvement of 8-oxo-dG1 and/or abasic site formation. *Biochemistry* 37, 7030-7038.
- 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
- Vila, A., Korytowski, W., Girotti, A.W., 2000. Dissemination of peroxidative stress via intermembrane transfer of lipid hydroperoxides: model studies with cholesterol hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 208-218.
- Vila, A., Korytowski, W., Girotti, A.W., 2002. Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: assessment of reaction kinetics and prooxidant effects. *Biochemistry* 41, 13705-13716.
- Vila, A., Levchenko, V.V., Korytowski, W., Girotti, A.W., 2004. Sterol carrier protein-2-facilitated intermembrane transfer of cholesterol- and phospholipid-derived hydroperoxides. *Biochemistry* 43, 12592-12605.
- Vork, M.M., Glatz, J.F.C., van der Vusse, G.J., 1997. Modeling intracellular fatty acid transport: possible mechanistic role of cytoplasmic fatty acid binding protein. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 57, 11-16.
- Wardman, P., 1989. Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous-solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 18, 1637-1755.
- Wasserman, H.H., Scheffer, J.R., and Cooper, J.L., 1972, Singlet oxygen reactions with 9,10-diphenylanthracene peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4991.
- Weisiger, R.A., Fridovich, I., 1973. Mitochondrial superoxido dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248, 4793-4796.

- Weitberg, A.B., Corvese, D. 1989. Hydroxy- and hydroperoxy -6,8,11,14- eicosatetraenoic acids induce DNA strand breaks in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 10, 1029-1031.
- Weitzman, S.A., Gordon, L.I., 1990. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*. 1990 76, 655-663.
- Whiteman, M., Jenner, A., Halliwell, B., 1997. Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1240-1246.
- Wilcox, A.L., Marnett, L.J., 1993. Polyunsaturated fatty acid alkoxyl radicals exist as carbon-centered epoxyallylic radicals: a key step in hydroperoxide-amplified lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 413-416.
- Winterbourn C.C., Kettle A.J., 2000. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic. Bio./ Med.* 29, 403-409.
- Winterbourn, C.C., van den Berg, J.J., Roitman, E., Kuypers, F.A., 1992. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 547-555.
- Yamamoto, S., 1992. Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1128, 117-131.
- Yamazaki, S., Ozawa, N., Hiratsuka, A., Watabe, T., 1999. Photogeneration of 3-hydroxy-5-cholest-6-ene-5-hydroperoxide in rat skin: evidence for occurrence of singlet oxygen in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 301-308.
- Yang, M-H., Schaich, K.M., 1996. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 225-236.
- Yoshikawa, T (ed) 2001. *Oxidative stress and digestive diseases*. Basel, Karger.
- Zhang, R., Brennan M.L., Shen, Z., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Molenda, C.E., Hazen, S.L., 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J. Biol. Chem.* 277, 46116-22.

Anexos

ANEXO I

Composição de ácidos graxos de diferente tecidos

Na tabela abaixo são mostrados as porcentagens de diferentes ácidos graxos presentes em eritrócitos, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético de humanos. Pode se observar que dentre os ácidos graxos poliinsaturados os principais são o ácido linoleico (LA) e o ácido araquidônico (AA).

Tabela I-1. *Composição de ácidos graxos de diferentes tecidos de humanos.*

Ácido graxo	Porcentagem de Ácidos Graxos (%)			
	Eritrócitos*	Fígado*	Tecido Adiposo*	Músculo Esquelético**
14:0	0,4 ± 0,1	19,4 ± 0,9	2,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1
16:0	22,6 ± 1,0	17,6 ± 0,4	27,5 ± 3,3	23,9 ± 0,7
18:0	17,6 ± 0,9	0,1 ± 0,1	38,9 ± 2,7	13,8 ± 0,7
16:1	---	2,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,3
18:1	14,6 ± 1,2	25,3 ± 0,8	19,2 ± 2,5	12,4 ± 1,6
18:2 (LA)	10,5 ± 1,5	17,4 ± 0,9	8,7 ± 1,1	30,2 ± 1,9
20:3	---	---	---	1,3 ± 0,2
20:4 (AA)	19,5 ± 1,3	8,1 ± 0,8	0,34 ± 0,04	10,9 ± 1,0
22:5	---	---	---	1,4 ± 0,1
22:4	---	---	---	---
22:6	5,8 ± 1,2	6,8 ± 0,8	0,08 ± 0,01	2,2 ± 0,4
24:0	5,1 ± 0,7	---	---	---
Outros	3,9	5,3	2,9	2,0
Referências	1	2	2	3

* Ácidos graxos totais. ** Ácidos graxos de fosfolipídios

1. Guarini, P., Stanzial, A.M., Olivieri, O., Casaril, M., Galvani, S., Pantalena, M., Corrocher, R. 1998. *Clin. Chim. Acta* 270, 139.

2. Araya, J., Rodrigo, R., Videla, L.A., Thielemann, L., Orellana, M., Pettinelli, P., Poniachik, J., 2004. *Clin. Sci.* 106, 635.

3. Andersson, A., Nalsen, C., Tengblad, S., Vessby, B., 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 1222.

ANEXO II

Cálculo da quantidade de oxigênio singlete a partir dos dados de emissão monomolecular

Cálculos da quantidade de $^1\text{O}_2$ a partir dos dados de sua emissão monomolecular foram realizados utilizando o gerador de $^1\text{O}_2$ hidrossolúvel, DHPNO₂, como padrão. Sabe-se que a termólise desse endoperóxido gera $^1\text{O}_2$ com um rendimento de 59 % e que a constante de sua termólise a 37°C é de $k=5,02 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Pierlot *et al.*, 2000) (**Figura II-1**). Com base nesses dados estima-se que a termólise a 37°C de uma solução 10 mM de DHPNO₂ produza 2,96 μM de $^1\text{O}_2$ por segundo.

Figura II-1. Termólise de DHPNO₂ gerando $^1\text{O}_2$ a um rendimento de 59 %.

Primeiramente, estudou-se o efeito do pH sobre a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado durante a termólise de DHPNO₂ a 37°C. Verificou-se que não há diferença na cinética de emissão adquiridas em pH 4,5, 7,4 ou 9,2, sugerindo que o pH não interfere na quantidade de $^1\text{O}_2$ detectado (**Figura II-2**).

Figura II-2. Cinética de emissão de luz na termólise de DHPNO₂ 10 mM em tampão fosfato 0,1 M preparado em D₂O, pH 4,5, 7,4 e 9,2 a 37°C.

Para o cálculo da quantidade de ¹O₂, integrou-se a área sob a curva de emissão de luz em que houve geração constante de ¹O₂ a partir de DHPNO₂. Na Figura II-3 são mostrados passo a passo, a determinação dessa área. Observou-se uma emissão de luz constante na região de 300 a 400 s. Integrando-se a área desse intervalo encontrou-se um valor de área de aproximadamente 58000 (unidades arbitrárias). Considerando que a termólise de DHPNO₂ nessas condições gera 2,96 μM de ¹O₂ por segundo, a quantidade total de ¹O₂ gerado para esse intervalo de tempo (100 s) seria de 296 μM. Ou seja, uma área de 58000 equivale a geração de 296 μM de ¹O₂, ou em outras palavras, uma unidade de área corresponde a 5,1 nM de ¹O₂. Esse valor foi utilizado para realizar as estimativas da quantidade de ¹O₂ a partir dos dados de emissão de luz para outros sistemas geradores de ¹O₂.

Figura II-3. Estimativa da quantidade de 1O_2 por meio de medidas da cinética de emissão monomolecularar de 1O_2 gerado na termólise de 10 mM DHPNO₂ a 37°C como referência. A, Cinética total de emissão. B, Seleção da faixa de emissão em que a quantidade de 1O_2 gerado é praticamente constante. C, Cálculo da área sob a curva de emissão no intervalo de tempo de 300 a 400 s utilizando o programa Origin[®] 6.0.

Referências

Pierlot C., Aubry J.M., Briviba K., Sies H., Di Mascio P., **2000**. *Methods in Enzymol.* 319, 3-20.

ANEXO III

Determinação da constante de supressão de oxigênio singlete para lipídios

O $^1\text{O}_2$ gerado nas reações de fotossensibilização ou por fontes químicas como, por exemplo, durante a peroxidação lipídica, pode sofrer basicamente três tipos de reações que levam à sua desativação (**Figura III-1**). Dois deles dependem do(s) composto(s) ou *quencher* (Q) presente no sistema: (i) a supressão física (constante de velocidade: k_q), em que ocorre a liberação de energia na forma de calor por meio de um mecanismo de transferência de energia ou de carga, e (ii) a supressão química ou (constante de velocidade: k_r), no qual ocorre a formação de produtos de oxidação (QO_2). Esses dois processos ocorrem simultaneamente sendo a sua soma ($k_q + k_r$) denominada de k_t ou constante total de *quenching*. O terceiro tipo depende do solvente. Nele o $^1\text{O}_2$ é desativado por interação com o solvente (constante de velocidade: k_d).

Baseados nas constantes de velocidade dos três processos, equações matemáticas foram desenvolvidas para determinar as reações de $^1\text{O}_2$. Quando $[\text{Q}] (k_r + k_q) > k_d$, o composto (Q) interage com a maioria do $^1\text{O}_2$ formado, surgindo várias possibilidades de reação: (i) $k_r \gg k_q$, o produto de oxidação QO_2 é formado na maioria das colisões de Q com o $^1\text{O}_2$, (ii) $k_r \sim k_q$, o Q continua sendo oxidado a QO_2 , porém em quantidades menores pois parte de $^1\text{O}_2$ é desativado ao seu estado fundamental pela interação com Q, e (iii) $k_q \gg k_r$, não há formação de QO_2 em quantidades relevantes no processo, pois há predomínio da supressão física de $^1\text{O}_2$ (Manring e Foote 1983).

Figura III-1. Caminhos de reação para o $^1\text{O}_2$ gerado por fontes químicas ou biológicas. No esquema Q representa o substrato, QO_2 o produto de resultante da reação do substrato com o $^1\text{O}_2$ e E a energia liberada no processo de desativação. As constantes de velocidade das três vias estão representadas por k_q , k_r , e k_e que correspondem as constantes de desativação física, química e pelo solvente, respectivamente.

A fim de caracterizar a reatividade de $^1\text{O}_2$ frente aos lipídios presentes em sistema biológico, realizaram-se experimentos com o intuito de determinar a constante total de *quenching* (k_t) para os seguintes lipídios: ácido linoléico (LA), fosfatidilcolina -PC (utilizamos a fosfatidilcolina de ovo ou EYPC), colesterol (Ch) e o linoleato de colesterol (Ch-LA) (**Figura III-2**).

Figura III-2. Estrutura do ácido linoleico, fosfatidilcolina, colesterol e linoleato de colesterol.

O k_t foi determinado por meio de medidas do decaimento monomolecular de $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização em função do tempo na ausência e na presença de diferentes concentrações do lipídio. Os experimentos foram realizados na presença do agente fotossensibilizante, fenalenona, dissolvido em clorofórmio:metanol (1;1, v/v). A **Figura III-3** mostra decaimento do sinal de $^1\text{O}_2$ obtido na ausência e na presença de 0,6 M de LA. Fazendo-se a exponencial de primeira ordem do decaimento observado encontra-se o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ na ausência e na presença de diferentes concentrações do lipídio (τ).

Figura III-3. Decaimento da luminescência em 1270 nm observada para a solução contendo fenalenona em clorofórmio:metanol (1:1, v/v) na ausência (**A**) e na presença de 0,6 M de LA (**B**). A figura no inset encontra-se na escala linear.

O k_t para cada um desses lipídios foi determinado por meio da construção de curvas conhecidas como Stern-Volmer (**Figura III-4**). Essa curva é representada pela equação matemática (Eq.1):

$$\tau_0 / \tau = 1 + (k_q + k_r) k_d^{-1} [Q] \quad (\text{Eq.1})$$

Considerando que $k_q + k_r$ é igual a k_t e $1/k_d$ é igual a τ_0 , a equação pode ser reescrita como (Eq.2):

$$\tau_0 / \tau = 1 + k_t \tau_0 [Q] \quad (\text{Eq.2})$$

Dividindo-se a equação por τ_0 tem-se (Eq.3):

$$1/\tau = 1/\tau_0 + k_{\text{q}}[Q] \quad (\text{Eq.3})$$

Como $1/\tau$ corresponde a k_{obs} e $1/\tau_0$ é igual a k_{d} , tem-se a equação simplificada (Eq.4):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{d}} + k_{\text{q}}[Q] \quad (\text{Eq.4})$$

Onde: τ_0 = tempo de vida do $^1\text{O}_2$ na ausência de Q

τ = o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ na presença de Q

k_{q} = constante de velocidade de desativação física

k_{r} = constante de velocidade de desativação química

k_{d} = constante de velocidade de desativação pelo solvente

k_{t} = constante de velocidade total de desativação ou $k_{\text{q}} + k_{\text{r}}$

k_{obs} = constante de velocidade observada na presença de Q

Q = *quencher*

A Figura III-4 mostra as curvas de $k_{\text{obs}} = 1/\tau$ em função da concentração dos lipídios. De acordo com a Eq.4, o coeficiente angular da reta corresponde ao k_{t} e o coeficiente linear corresponde ao k_{d} . Com o dados de k_{d} é possível determinar a meia vida de $^1\text{O}_2$ no solvente utilizado, pois $\tau_0 = 1/k_{\text{d}}$. Assim pelos dados da Figura III-4, k_{d} é igual a 4840 s^{-1} e portanto a meia vida de $^1\text{O}_2$ em clorofórmio:metanol (1:1, v/v) é de $20,7 \text{ } \mu\text{s}$.

Os tempos de vida de $^1\text{O}_2$ em clorofórmio, metanol e clorofórmio:metanol (1:1, v/v) foram determinados experimentalmente e os valores encontrados foram $210,6 \pm 2,0 \text{ } \mu\text{s}$, $9,6 \pm 0,1 \text{ } \mu\text{s}$ e $21,8 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{s}$, respectivamente. O tempo de vida de $^1\text{O}_2$ determinado para o clorofórmio e o metanol estão de acordo com os dados da literatura e o valor encontrado para a mistura está de acordo com o determinado pela curva da Figura III-4.

Figura III-4. Curvas de k_{obs} em relação a concentração de ácido linoleico (LA), fosfatidilcolina de gema de ovo (EYPC), colesterol (Ch) e linoleato de colesterol (Ch-LA).

Tabela III-1. Constantes totais de quenching (k_t) para lipídios determinados experimentalmente e reportados na literatura.

Lipídio	k_t ($10^4 M^{-1}s^{-1}$)		Referência
	Experimental	Literatura	
LA	13.6	4.2	Krasnovsky 1983
		7.3	Vever-Bizet <i>et al.</i> 1989
EYPC	8.2	1.2 -30	Krasnovsky 1979 e 1983
Ch	8.2	5.7	Vever-Bizet <i>et al.</i> 1989
		6.6	Schenk <i>et al.</i> 1957
Ch-LA	9.5	----	

Os k_t determinados experimentalmente para os lipídios estão próximos dos valores encontrados na literatura (**Tabela III-1**). De modo geral, eles se encontram na faixa de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Sabe-se que os valores de *quenching* para ácidos graxos saturados variam de $(2,3-11) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, próximos dos valores de k_q para substâncias orgânicas simples como os alcanos, alcoois e acetona (Krasnovsky 1983). Estas constantes representam o *quenching* físico (k_q), pois não se observa nenhuma destruição do composto. Já os valores de *quenching* para ácidos graxos insaturados são maiores, visto que cada dupla ligação aumenta o valor do *quenching*. Esse efeito deve-se à reação do $^1\text{O}_2$ com a dupla ligação (aumento do k_r) formando hidroperóxidos ou endoperóxidos.

Referências

- Krasnovsky AA, Kagan VE, **1979**. *FEBS Lett.* 155, 233-236.
Krasnovsky AA, Kagan VE, Minin, A.A., **1983**. *FEBS Lett.* 108, 152-154.
Manring LE, Kanner RC, Foote CS, **1983**. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4707-4710.
Schenk GO, Gollnick K, Neumuller AO, **1957**. *Ann. Chem.* 603, 46-59.
Vever-Bizet C, Dellinger M, Brault D, Rougee M, Bensansson V, **1989**. *Photochem Photobiol* 50, 321-325.

ANEXO IV

Espectrometria de massa em tandem (MS/MS)

Espectrômetros de massa contendo quadrupolos em arranjo sequencial permitem a realização de experimentos de MS sequencial do tipo MS/MS ou MS² ou tandem. Nesse tipo de experimento, os íons gerados na fase gasosa podem ser selecionados e em seguida fragmentados por processos de dissociação induzida por colisão (CID). Este tipo de experimento é útil para a elucidação estrutural de compostos.

Os experimentos do tipo MS/MS descritos nesta tese foram realizados e um espectrômetro de massa triplo-quadrupolo (Quattro II da Micromass Manchester, Reino Unido) utilizando ionização por electrospray (ESI) ou ionização química induzida a pressão atmosférica (APCI). Esse espectrômetro é composto de três quadrupolos denominados Q1, q2 e Q3, onde Q1 e Q2 são os quadrupolos de seleção ou varredura e q2 é o quadrupolo de colisão ou câmara de colisão.

Os quadrupolos Q1 e Q2 consistem de um arranjo de quatro barras cilíndricas e paralelas de aço inox. Às barras adjacentes é aplicada uma voltagem e uma radiofrequência, sendo que os cilindros opostos são conectados eletricamente. Este arranjo cria um campo elétrico entre as barras, fazendo com que os íons oscilem nas direções x e y. Deste modo, variando-se os parâmetros de voltagem e radiofrequência é possível fazer com que o quadrupolo funcione como um filtro de massa onde apenas um íon de m/z de interesse percorre uma trajetória estável entre os quadrupolos e atinge o detector ou o segundo quadrupolo.

HPLC – MS/MS

Figura IV-1. Esquema do equipamento de HPLC-MS/MS. O esquema ilustra uma coluna de HPLC por onde a amostra é inserida no espectrômetro de massa. A amostra é ionizada, e os íons em fase gasosa passam por Q1, onde é possível realizar a seleção do íon de interesse (íon pai). Este sofre dissociação na câmara de colisão (q2) e os fragmentos produzidos são detectados no segundo quadrupolo.

Para representar os experimentos de MS/MS pode-se utilizar a notação introduzida por Schwartz *et al.* (1990) como mostra a **Figura IV-2**. Os círculos cheios representam o quadrupolo operando como filtro de massa e o vazado representa o quadrupolo operando no modo de varredura. As setas entre os círculos representam os quadrupolos de colisão as moléculas selecionadas sofrem dissociação ou fragmentação através da colisão de um gás inerte, como, por exemplo, o argônio.

Figura IV-2. Notação utilizada para representar os experimentos no espectrômetro de massa. A. Detecção dos íons filhos em Q3, resultantes da fragmentação em q2 de um íon de interesse selecionado em Q1. B. Detecção de uma transição de massa específica do composto de interesse, por meio da seleção do íon pai de interesse em Q1, seguido de fragmentação em q2 e seleção de um íon filho de interesse em Q3. Esse modo de detecção é conhecida como MRM.

Referências

Schwartz, J.C., Wade, A.P., Enke, C.G., Cooks, R.G., **1990**. *Anal. Chem.* 62, 1809.

ANEXO V

Caracterização dos hidroperóxidos de fosfatidilcolina por espectrometria de massa

Nos experimentos realizados com lipossomos foram utilizadas diferentes concentrações de hidroperóxidos de fosfatidilcolina (EYPCOOH) para estudar a geração de $^1\text{O}_2$ na reação com metais ou hipoclorito. A caracterização desses hidroperóxidos foi feita por espectrometria de massa no modo ESI⁺. Essa técnica tem sido utilizada para a caracterização de fosfolipídios presentes em membranas celulares (Brugger *et al.* 1997, Han *et al.* 1994, Smith *et al.* 1995, Kim *et al.* 1994) e para a detecção de produtos da peroxidação lipídica de fosfolipídios em membranas artificiais (Spickett *et al.* 1998) e em células submetidas ao estresse oxidativo (Spickett *et al.* 2001).

EYPC é composto de uma mistura de diferentes espécies de fosfatidilcolina (PC) (**Tabela V-1**) onde predominam as espécies de fosfatidilcolina contendo ácido palmítico na posição *sn*-1 e ácido oleico (PC 34:1, 38 %) ou ácido linoleico (PC 34:2, 19-22 %) na posição *sn*-2. De fato, o espectro de massa de EYPC (**Figura V-1 A**) mostrou dois íons majoritários, um em *m/z* 761 e o outro em *m/z* 759, correspondentes aos íons moleculares ($[\text{M}]^+$) de PC 34:1 e PC 34:2. No espectro também apareceram íons menos intensos em *m/z* 783, 787, 789 e 811, correspondentes aos íons moleculares ($[\text{M}]^+$) de PC 36:4, PC 36:2, PC 36:1 e PC 38:4.

Os EYPCOOH foram sintetizados por dois métodos: a fotossensibilização utilizando azul de metileno como agente fotossensibilizante e a síntese enzimática

utilizando lipoxigenase de soja. Ambos os métodos são muito utilizados para a síntese de hidroperóxidos de lipídios sendo que diferem basicamente no tipo de produtos formados. A fotossensibilização envolve a reação de $^1\text{O}_2$ com insaturações presentes na cadeia do lipídio resultando em vários hidroperóxidos isômeros de posição. Por exemplo, a fotossensibilização de ácido oleico (18:1) resulta em hidroperóxidos na posição 9 e 10 e do ácido linoleico (18:2) em hidroperóxidos na posição 9, 10, 12 e 13. Por outro lado, a síntese enzimática via lipoxigenase ocorre de maneira estereo-dirigida gerando um número menor e específico de hidroperóxidos.

Tabela V-1. *Espécies moleculares de fosfatidilcolina (PC) presentes na fosfatidilcolina de gema de ovo contendo diferentes ácidos graxos esterificados na posição sn1 e sn2, e os respectivos pesos moleculares antes da oxidação e após adição de um grupamento hidroperóxido.*

Fosfatidilcolina No. Carbonos:Dupla	Ácido graxo sn1 : sn2	Peso Molecular (g)		Porcentagem	
		Não oxidado	Hidroperóxido	% ^a	% ^b
PC 34:2	16:0 - 18:2	759,1	791,1	19	22
PC 34:1	16:0 - 18:1	761,1	793,1	38	38
PC 36:4	16:0 - 20:4	783,1	815,1	6	
PC 36:2	18:0 - 18:2	787,2	819,2	8	11
PC 36:1	18:0 - 18:1	789,2	821,2	9	9
PC 38:4	18:0 - 20:4	811,2	843,2	7	4

^a Sakamoto *et al.* 2002; ^b Kuskis 1985

O espectro de massa dos EYPCOOH sintetizados por fotossensibilização mostrou dois íons principais, um em m/z 791 e o outro em 793, correspondentes aos íons

moleculares dos hidroperóxidos de PC 34:2 (16:0-18:2 OOH) e PC 34:1 (16:0-18:1 OOH), e outros íons menos intensos em m/z 819, 821 e 843, correspondentes aos hidroperóxidos de PC 36:2 (18:0-18:2 OOH), PC 36:1 (18:0-18:1 OOH) e PC 38:4 (18:0-20:4 OOH) (**Figura V-1 B**). Esses resultados refletem basicamente a formação inespecífica de hidroperóxidos em todos os ácidos graxos contendo insaturações presentes em EYPC, o que está de acordo com a reatividade de $^1\text{O}_2$, descrito no parágrafo anterior.

Já o espectro de massa dos EYPCOOH sintetizados com lipoxigenase-1, mostrou um número menor de íons, apresentando um íon majoritário em m/z 291, correspondente ao hidroperóxido de PC 36:2 (18:0-18:2 OOH) e íons menos intensos em m/z 819 e 843, correspondentes a PC 36:2 (18:0-18:2 OOH) e PC 38:4 (18:0-20:4 OOH) (**Figura V-1 C**). Esses resultados estão de acordo com a especificidade da lipoxigenase-1 encontrada na soja que reage com PC em pH 9, gerando exclusivamente hidroperóxidos de ácido linoleico na posição C-13 e hidroperóxidos de ácido araquidônico na posição C-15 (Brash *et al.* 1987).

Em resumo, esses resultados mostram que a técnica de análise de hidroperóxidos por *electrospray* no modo de ionização positiva é útil para a caracterização das diferentes espécies moleculares de hidroperóxidos de fosfatidilcolina. Além disso, nossos resultados mostram que os EYPCOOH foram sintetizados com sucesso tanto pela fotossensibilização como pela lipoxigenase e que os tipos de hidroperóxidos formados pelos dois métodos são diferentes.

Figura 4. Espectros de massa de EYPC (A) e EYPCOOH sintetizados por fotossensibilização (B) ou lipoxigenase (C) e purificados por HPLC. O espectro foi adquirido no modo ESI^+ utilizando voltagem de cone de 20 V. As estruturas de fosfatidilcolina contendo palmitoil-oleoil (PC 34:1), palmitoil-linoleoil (PC 34:2) e

palmitoil-araquidonoil (PC 36:4) foram colocadas para ilustração. Os (OOH) representam a adição de um grupamento hidroperóxido (+32 u.m.a) no fosfolípido.

Referências

- Brash, A.R., Ingram, C.D., Harris, T.M., **1987**. *Biochemistry* 26, 5465-71.
- Brugger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., Lehmann, W.D., **1997**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2339-2344.
- Han, X., Gross, R.W., **1994**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10635-10639.
- Kim, H.Y., Wang, T.C., Ma, Y.C., **1994**. *Anal. Chem.* 66, 3977-3982.
- Sakamoto, M., Tazuma, S., Chayama, K., **2002**. *Biochem. J.* 362, 105-112.
- Smith, P.B., Snyder, A.P., Harden, C.S., **1995**. *Anal. Chem.* 67, 1824-1830.
- Spickett, C.M., Pitt, A.R., Brown, A.J., **1998**. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 613-620.
- Spickett, C.M., Rennie, N., Winter, H., Zamboni, L., Landi, L., Jerlich, A., Schaur, R.J., Pitt, A.R., **2001**. *Biochem. J.* 355, 449-457.

Curriculum Vitae

CURRICULUM VITAE

Nome: **Sayuri Miyamoto**

Local e data de nascimento: Pilar do Sul, SP, 05 de Abril de 1972.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 1987 – 1989 Ensino médio: Colégio Cidade de Itapetininga, Itapetininga, SP.
- 1990 – 1994 Graduação: Bacharelado em Farmácia e Bioquímica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- 1998 – 2000 Mestrado em Nutrição no Departamento de Nutrição da Escola de Medicina da Universidade de Tokushima, Tokushima, Japão, sob a orientação do Prof. Dr. Junji Terao. Bolsista da Rotary Yoneyama Foundation.
- 2001 – 2005 Doutorado em Ciências no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, sob a orientação do Prof. Dr. Paolo Di Mascio e co-orientação do Prof. Dr. Junji Terao. Bolsista da FAPESP.

ESTÁGIOS NO EXTERIOR

- 1994 (Jun-Dez) Estágio técnico na empresa Novo Nordisk A/S, Copenhagen, Dinamarca, no laboratório de bioquímica aplicada de enzimas, sob a supervisão de Henrik Lund. Bolsista do programa de Intercâmbio Internacional de Estudantes Universitários das Áreas Técnicas (IAESTE). Trabalho realizado: Efeito de detergentes no processo de *desizing* catalisado por amilases.
- 1996-1998 Estágio de aperfeiçoamento técnico na *National Food Research Institute* (Ministry of Agriculture, Fisheries and Forest), Tsukuba, Japão, no laboratório de pesquisa de lípidios, sob a orientação do Prof. Dr. Junji Terao. Bolsista da Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA). Trabalho realizado: Síntese e estudo da atividade antioxidante de um novo derivado da vitamina E.

TRABALHOS PUBLICADOS**Artigos completos publicados**

1. Shimokomaki, M., Silva, L.C., Miyamoto, S., Kubota, E. Presence of new disulphide-bonded collagens in shark *Prionace glauca* muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 106 B (2), 337-339, **1993**.
2. Miyamoto, S., Koga, T., Terao, J. Synthesis of a novel phosphate ester of a vitamin E derivative and its antioxidant activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (12), 2463-2466, **1998**.
3. Miyamoto, S., Kuwata, G., Imai, M., Nagao, A., Terao, J. Protective effect of phytic acid hydrolysis products on iron ion-induced lipid peroxidation of liposomal membranes. *Lipids* 35, 1411-1413, **2000**.
4. Terao, J., Miyoshi, M., Miyamoto, S. Thin layer-chromatography blotting for the fluorescence detection of phospholipid hydroperoxides and cholesteryl ester hydroperoxides. *J. Chromatogr. B* 765, 199-203, **2001**.
5. Murota K., Shimizu S., Miyamoto S., Izumi T., Obata A., Kikuchi M., Terao J., Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.* 132 (7), 1956-1961, **2002**.
6. Almeida, E.A., Miyamoto, S., Martinez, G.R., M.H.G. and Di Mascio, P. Direct evidences of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline solutions. *Anal. Chimica Acta*, 482 (1), 99-104, **2003**.
7. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P.B., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. Direct evidence of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxyxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* 125(15), 4510-4517, **2003**.
8. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. 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(20), 6172-6179, **2003**.
9. Soares, A.L., Ida, E.I., Miyamoto, S., Hernández-Blasquez, F.J., Olivo, R., Pinheiro, J.W., Shimokomaki, M., Phospholipase A_2 activity in poultry PSE, Pale, Soft, Exudative, Meat. *J. Food Biochem*, 27 (4), 309-320, **2003**.
10. Miyamoto, S., Dupas, C., Murota, K., Terao, J., Detoxification of phospholipid hydroperoxides in rat gastric mucosa involves the consecutive action of phospholipase A_2 and glutathione peroxidase. *Lipids*. 38 (6), 641-649, **2003**.
11. Martinez, G.R., Loureiro, A.P., Marques, S.A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L.F., Onuki, J., Almeida, E.A., Garcia, C.C., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H.G., Di

- Mascio, P. Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutat. Res.* 544 (2-3), 115-27, **2003**.
12. Murota, K., Mitsukuni, Y., Ichikawa, M., Tsuchida, T., Miyamoto, S., Terao, J. Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa against iron ion-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1907-1912, **2004**.
13. Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Cadet, J., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. Energy transfer between singlet ($^1\Delta_g$) and triplet ($^3\Sigma_g^-$) molecular oxygen in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 126 (10), 3056-3057, **2004**.
14. Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bainy, A.C.D., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Poll. Bulletin*, 49 (5-6), 386-392, **2004**.
15. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P.B., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. ^{18}O -Labeled lipid hydroperoxides and HPLC coupled to mass spectrometry as valuable tools for studying the generation of singlet oxygen in biological system. *Biofactors* 22(1-4), 333-339, **2004**.
16. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P.B., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. ^{18}O -Labeled singlet oxygen generation in the reaction of ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide with metal ions and peroxyxynitrite. *Proceedings of the XII Biennial Meeting of the Society for Free Radicals International*. Eds. Puntarolo S., Boveris A., Medimond, Itália, pp. 1-6, **2004**.
17. Bonini, M.G., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Augusto, O. Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J. Biol. Chem.* 279, 51836-51843, **2004**.
18. Jaburek, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Garlid, K.D., Jezek, P. Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J. Biol. Chem.* 279, 53097-53102, **2004**.

Capítulo de livros publicados

1. Miyamoto, S., Murota, K., Terao, J. High oxidizability of large intestinal mucosa in iron-ion induced lipid peroxidation. In: Yoshikawa T. (ed) *Free Radicals in Digestive Diseases*, Karger, Basel, pp. 103-113, **2001**.
2. Miyamoto, S., Murota, K., Kuwata, G., Imai, M., Terao, J. Antioxidant activity of phytic acid hydrolysis products on iron ion-induced oxidative damage in biological system. *Free Radical in Foods: Chemistry, Nutrition and Health*. ACS Symposium Series 807, American Chemical Society, Oxford University Press, Washington DC, pp. 241-250, **2002**.

Resumos publicados em revistas indexadas

1. Miyamoto, S., Terao, J., Kuwata, G., Imai, M., Antioxidant activity of phytic acid hydrolysis products. *Anticancer Res.* 19, 3806, **1999**.
2. Miyamoto, S., Terao, J., Kuwata, G., Imai, M., Effect of phytic acid hydrolysis products on metal catalyzed lipid peroxidation. *Revista de Farmácia e Bioquímica da USP*, 34 (suppl 1), 3806, **1999**.
3. Miyamoto, S., Terao J., Phospholipid hydroperoxides are efficiently eliminated in rat gastric mucosa: involvement of phospholipase A2 and glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 31, S87-S87, Suppl. 1, **2001**.
4. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G. and Di Mascio, P., New evidences for singlet oxygen generation from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: Studies using O-18-labeled linoleic acid hydroperoxide. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 30, Suppl. 1, **2002**.
5. Bonini, M.G., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Augusto, O., Evidences for the production of carbonate radical anion during xanthine oxidase (XOD) turnover. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 40 Suppl. 1, **2003**.
6. Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Singlet oxygen generation in the reaction of hypochlorite with lipid hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.* 36, Suppl. 1, page S95, **2004**.
7. Di Mascio P., Martinez G.R., Miyamoto S., Ravanat J.L., Cadet J., Medeiros M.H.G., ¹⁸O-Labeled singlet molecular oxygen: chemical generation, Russell mechanism studies and DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 36, Suppl. 1, page S28, **2004**.
8. Miyamoto, S., Rettori, D., Augusto, O., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Linoleic acid hydroperoxides reacts with hypochlorite generating peroxy radical intermediates and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* 37, Suppl 1, page S16, **2004**.
9. Bonini, M., Miyamoto, S., Di Mascio, P., Augusto, O., Production of carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *Free Radic. Biol. Med.* 37, Suppl 1, page S25, 2004.
10. Brochini, C.B., Miyamoto S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., The reaction of ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide with dGuo in the presence of ascorbate or iron II generates ¹⁸O-labeled 8-oxo-7,8-dihydro-2'- deoxyguanosine. *Free Radic. Biol. Med.* 37, Suppl 1, page S105, 2004.
11. Jezek, P., Miyamoto S., Di Mascio, P., Garlid, K.D., Jaburek, M., Mitochondrial uncoupling protein UCP2 as down-regulator of mitochondrial ROS production via hydroperoxide fatty acid cycling. *Free Radic. Biol. Med.* 37, Suppl 1, page S118, 2004.

PRÊMIOS

Prêmio “**Auxílio à Pesquisa**” concedido pelo *Fundo Bunka de Pesquisa Banco Sumitomo Mitsui e Sociedade Brasileira de Cultura Japonesa* com o projeto intitulado “Papel dos hidroperóxidos de lipídeos nas patologias gastrointestinais: efeitos patofisiológicos e proteção por antioxidantes naturais”, **2001**.

Prêmio “**Young Scholar Award**” concedido pela *Ochi Foundation* (Japão) pelo trabalho “¹⁸O-labeled lipid hydroperoxides and HPLC coupled to mass spectrometry as valuable tools for studying lipid peroxidation in biological system” apresentado no *3rd International Conference on Food Factors* realizado em Tokyo no Japão de 1 a 4 de Dezembro de **2003**.

Prêmio “**Young Investigator Award**” concedido pela *International Society for Free Radical Biology & Medicine* pelo trabalho “Singlet oxygen generation in the reaction of hypochlorite with lipid hydroperoxides” apresentado no congresso *12th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International* realizado em Buenos Aires, Argentina de 5 a 9 de Maio de **2004**.

Prêmio “**Travel Award**” concedido pela *Society for Free Radical Biology and Medicine* pelo trabalho “Linoleic acid hydroperoxides reacts with hypochlorite generating peroxy radical intermediates and singlet oxygen” apresentado no congresso *11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine* realizado em St. Thomas – US Virgin Islands, nos dias 17 a 21 de Novembro de **2004**.

Prêmio “**Jovens Talentos na Pós-Graduação do IQ-USP**” concedido pelo *II Congresso do Instituto de Química* realizado nos dias 16 e 17 de Dezembro de **2004**.

*Artigos Publicados Relacionados
com os Dados da Tese*

Singlet Molecular Oxygen Generated from Lipid Hydroperoxides by the Russell Mechanism: Studies Using ^{18}O -Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide and Monomol Light Emission Measurements

Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez, Marisa H. G. Medeiros, and
Paolo Di Mascio*

Contribution from the Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

Received October 28, 2002; E-mail: pdmascio@iq.usp.br

Abstract: The decomposition of lipid hydroperoxides into peroxy radicals is a potential source of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in biological systems. We report herein on evidence of the generation of $^1\text{O}_2$ from lipid hydroperoxides involving a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate proposed by Russell. Using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) in the presence of Ce^{4+} or Fe^{2+} , we observed the formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}[^1\text{O}_2]$) by chemical trapping of $^1\text{O}_2$ with 9,10-diphenylanthracene (DPA) and detected the corresponding ^{18}O -labeled DPA endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Spectroscopic evidence for the generation of $^1\text{O}_2$ was obtained by measuring (i) the dimol light emission in the red spectral region ($\lambda > 570 \text{ nm}$); (ii) the monomol light emission in the near-infrared (IR) region ($\lambda = 1270 \text{ nm}$); and (iii) the quenching effect of sodium azide. Moreover, the presence of $^1\text{O}_2$ was unequivocally demonstrated by the direct spectral characterization of the near-IR light emission. For the sake of comparison, $^1\text{O}_2$ deriving from the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$ and $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ systems or from the thermolysis of the endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene was also monitored. These chemical trapping and photoemission properties clearly demonstrate that the decomposition of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ generates $^{18}[^1\text{O}_2]$, consistent with the Russell mechanism and pointing to the involvement of $^1\text{O}_2$ in lipid hydroperoxide mediated cytotoxicity.

Introduction

Lipid peroxidation is considered a key chemical event of the oxidative stress associated with several diseases.^{1–6} Lipid hydroperoxides are the primary products of lipid peroxidation, and it is assumed that their decomposition is involved in the generation of toxic products and in the induction of tissue injury.^{7–9} Lipid hydroperoxides are also generated in singlet molecular oxygen [$^1\text{O}_2$, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$] mediated oxidations^{10,11} and by the action of enzymes such as lipoxygenases¹² and cyclooxygenases.¹³ Despite their relative stability in organic solutions, lipid hydroperoxides are easily decomposed by metal ions, generating peroxy and/or alkoxyl radicals, which are responsible

for the propagation of lipid peroxidation and the generation of toxic compounds.¹⁴

Following the suggestion of Russell,¹⁵ Howard and Ingold¹⁶ found that the self-reaction of peroxy radicals generates $^1\text{O}_2$. Russell proposed the formation of a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate that decomposes to give an alcohol, ketone, and molecular oxygen (Scheme 1). It has been postulated that this reaction may generate either an electronically excited oxygen molecule (Scheme 1A) or an electronically excited ketone (Scheme 1B). Indeed, $^1\text{O}_2$ and triplet carbonyls have been identified as the chemiluminescence (CL) emitters in the ultraweak CL associated with lipid peroxidation in a biological system.^{17–19} The generation of $^1\text{O}_2$ during the metal-catalyzed decomposition of alkylhydroperoxides has been studied by several authors.^{20–24} Niu and Mendenhall reported

- (1) Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jurgens, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 341–390.
- (2) Berliner, J. A.; Heinecke, J. W. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 707–727.
- (3) Markesbery, W. R. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 134–147.
- (4) Rowley, D.; Gutteridge, J. M. C.; Blake, D.; Farr, M.; Halliwell, B. *Clin. Sci.* **1984**, *66*, 691–695.
- (5) Baynes, J. W. *Diabetes* **1991**, *40*, 405–412.
- (6) Otamiri, T.; Sjob Dahl, R. *Cancer* **1989**, *64*, 422–425.
- (7) Esterbauer, H. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, *57*, 779S–786S.
- (8) Girotti, A. W. *J. Lipid Res.* **1998**, *39*, 1529–1542.
- (9) Spiteller, G. *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *95*, 105–162.
- (10) Terao, J.; Matsushita, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1977**, *54*, 234–238.
- (11) Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Bressler, T. R. *Lipids* **1979**, *14*, 961–967.
- (12) Brash, A. R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23679–23682.
- (13) Hamberg, M.; Samuelsson, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *617*, 545–547.

- (14) Gardner, H. W. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 65–86.
- (15) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871–3877.
- (16) Howard, J. A.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1057–1058.
- (17) King, M. M.; Lai, E. K.; McCay, P. B. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 6496.
- (18) Sugioka, K.; Nakano, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *423*, 203–216.
- (19) Sies, H. *Arch. Toxicol.* **1987**, *60*, 138–143.
- (20) Hawco, F. J.; O'Brien, P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *76*, 354–361.
- (21) Kanofsky, J. R. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3386–3388.
- (22) Koga, S.; Nakano, M.; Uehara, K. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *289*, 223–229.
- (23) Niu, Q.; Mendenhall, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1656–1657.
- (24) Mendenhall, G. D.; Sheng, X. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8976–8977.

Scheme 1. Proposed Russell Mechanism for the Self-Reaction of Peroxyl Radicals (LAOO•) Involving a Cyclic Mechanism from a Linear Tetraoxide Intermediate (LAOOOLA) and the Corresponding Products: [A] Alcohol (LAOH), Ketone (LAO), and ¹O₂; or [B] Alcohol (LAOH), Excited Ketone (LAO*), and O₂

that the yields of ¹O₂ in the case of simple alkylhydroperoxides, ranged from 3.9% to 14.0%.²³ In contrast, the yields of excited carbonyls were 10³–10⁴ lower, suggesting that the self-reaction of peroxyl radical deriving from fatty acids generates predominantly ¹O₂.²⁴

Singlet oxygen exhibits substantial reactivity toward electron-rich organic molecules including, among others, the guanine moiety of DNA.^{25,26} Evidence has accumulated indicating that ¹O₂ is implicated in the genotoxic effect of the UVA component of solar radiation and likely plays an important role in the cell signaling cascade²⁷ and in the induction of gene expression.²⁸

We report here on studies we pursued to clearly demonstrate the generation of ¹O₂ from lipid hydroperoxides by the mechanism proposed by Russell. For this purpose, we used ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide (LA¹⁸O¹⁸OH) and ceric ion (Ce⁴⁺) or ferrous ion (Fe²⁺) as a mechanistic tool. Our study was based on the specific detection and quantification of ¹⁸O-labeled singlet oxygen (¹⁸[¹O₂]) generated by the combination of two ¹⁸O-labeled peroxyl radicals, using 9,10-diphenylanthracene (DPA) as the chemical trap. The corresponding DPA endoperoxide containing labeled oxygen (DPA¹⁸O¹⁸O) was detected and quantified by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Additional evidence for the generation of ¹O₂ was obtained by direct measurement of (i) dimol light emission in the red spectral region (λ > 570 nm) using a red-sensitive photomultiplier (PMT); (ii) monomol light emission in the near-infrared (IR) region (λ = 1270 nm) with a liquid nitrogen cooled germanium diode detector; and (iii) the ¹O₂ spectrum in the near-IR region using a specific IR-PMT coupled to a monochromator.

Experimental Section

Materials. Linoleic acid (LA) and sodium azide were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Ceric sulfate was supplied by BDH Limited (Poole, U.K.). Methylene blue and iron(II) sulfate heptahydrate came from Merck (Rio de Janeiro, Brazil and Darmstadt, Germany, respectively). Silica gel 60 (230–400 mesh), deuterium oxide, 9,10-diphenylanthracene, and 9,10-dibromanthracene were from Aldrich (Steinheim, Germany), and hydrogen peroxide was purchased from Peróxidos do Brasil (Paraná, Brazil). All of the other solvents were of HPLC grade and were acquired from Merck (Rio de Janeiro, Brazil). The water used in the experiments was treated with the Nanopure Water System (Barnstead, Dubuque, IA).

Synthesis of ¹⁸O-Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide (LA¹⁸O¹⁸OH). LA¹⁸O¹⁸OH was synthesized by photooxidation of linoleic acid under an ¹⁸O₂-saturated atmosphere using methylene blue as the photosensitizer. Briefly, 1 g of linoleic acid was dissolved in 50 mL of chloroform previously purged with nitrogen gas for 20 min. Next, 100 μL of methylene blue solution (100 mM in methanol) was added, and the oxygen contained in the system was removed by successive freezing and thawing under vacuum. This procedure was repeated at least five times to ensure complete removal of ¹⁶O₂. Thereafter, the whole system was connected to an ¹⁸O₂ gas cylinder (Isotec-Sigma, St. Louis, MO) under 0.5 atm. The mixture was irradiated with two tungsten lamps (500 W) for 5 h and stirred continuously. The LA¹⁸O¹⁸OH was purified by column chromatography, using silica gel 60 (230–400 mesh) according to the method described by Kühn.²⁹ After purification, the LA¹⁸O¹⁸OH was dissolved in chloroform and stored at –20 °C. The LA¹⁸O¹⁸OH concentration was determined by absorbance at 234 nm (ε₂₃₄ = 25 000 M^{–1} cm^{–1}),³⁰ considering that 60% of the hydroperoxides contain conjugated diene.^{10,11}

Synthesis of the LA¹⁸O¹⁸OH was confirmed by mass spectrometry, using a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, U.K.) in the negative electrospray ionization mode (ESI[–]). The source temperature of the mass spectrometer was kept at 100 °C, and the flow rates of drying and nebulizing gas were optimized at 300 and 15 L/h, respectively. The cone voltage was set to 20 V, and the collision energy was set at 30 eV. The capillary potential and high electrode potential were set to 3.0 and 0.5 kV, respectively. Full scan data were acquired over a mass range from 50 to 400 m/z. For the analysis, 20 μL of LA¹⁸O¹⁸OH solution (300 pg/μL) was injected through an LC-18 column (Supelco, 150 × 4.6 mm, 5 μm) and eluted with a linear gradient from 75% to 100% acetonitrile for 10 min at a flow rate of 1 mL/min. The data were processed and transformed into molecular mass values on a mass scale by means of the Mass Lynx NT data system, version 3.20 (Micromass, Altricham, U.K.).

Chemical Detection of Singlet Molecular Oxygen. The generation of ¹O₂ was monitored by chemical trapping with 9,10-diphenylanthracene (DPA). This method is based on the rapid and specific reaction of ¹O₂ with DPA (k_r = 1.3 × 10⁶ M^{–1} s^{–1}), which forms a stable DPA endoperoxide (DPAO₂).^{31,32} The DPAO₂ was quantified using 9,10-dibromanthracene (DBA) as an internal standard. DPAO₂ and DBA were analyzed by an HPLC system (SPD 10 AVVP, Shimadzu, Kyoto, Japan) connected to an automatic SIL-10ADVP autoinjector and to a UV–visible detector (SPD 10 AVVP, Shimadzu, Kyoto, Japan) and a Quattro II Micromass mass spectrometer (Manchester, U.K.). The compounds were diluted 1:125 in acetonitrile, and 50 μL was injected. The reaction products were separated by a reversed-phase Luna LC-18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm particle, Phenomenex, CA), using a gradient system of acetonitrile (solvent B) and water (solvent A). Elution was started with a increasing linear gradient of B from 75% to 100% over the course of 10 min, followed by an isocratic elution for 7 min, ending with a decreasing gradient back to 75% within 3 min at a flow rate of 0.8 mL/min. The eluent was monitored with a UV detector at 210 nm and with the mass spectrometer utilizing atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in the positive ion mode. The probe and source temperature of the mass spectrometer were held at 300 and 150 °C, respectively. DPAO₂ was monitored at a cone voltage of 15 V and collision energy of 15 eV. In the same run, DBA was monitored at a cone voltage of 20 V and collision energy of 40 eV. Full-scan data were acquired over a mass range of 100–500 Da. The quantification was performed in the multiple reaction monitoring mode (MRM), by selecting a specific mass transition of the target compound. The data

(25) Cadet, J.; Douki, T.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L. *Methods Enzymol.* **2000**, 319, 143–153.

(26) Kang, P.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4865–4873.

(27) Klotz, L. O.; Briviba, K.; Sies, H. *Methods Enzymol.* **2000**, 319, 130–143.

(28) Ryter, S. W.; Tyrrell, R. M. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, 24, 1520–1534.

(29) Kühn, H.; Wiesner, R.; Lankin, V. Z.; Nekrasov, A.; Alder, L.; Schewe, T. *Anal. Biochem.* **1987**, 160, 24–34.

(30) Mulliez, E.; Leblanc, J. P.; Gierd, J. J.; Rigaud, M.; Chottard, J. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 916, 13–23.

(31) Corey, E. J.; Taylor, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2909–2914.

(32) Turro, N. J.; Chow, M. F.; Rigaudy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7218–7224.

were processed and transformed into molecular mass values on mass scale using the aforementioned software.

Incubations of LA¹⁸O¹⁸OH with Ceric Ion. LA¹⁸O¹⁸OH was incubated with Ce⁴⁺ in D₂O:chloroform (1:1, v/v) and DMSO:chloroform (1:1, v/v) systems. A Ce⁴⁺ solution was prepared in D₂O or DMSO, and the DPA and LA¹⁸O¹⁸OH solutions were prepared in chloroform. In the case of the reaction conducted under deaerated conditions, Ce⁴⁺ and DPA/LA¹⁸O¹⁸OH solutions were purged with nitrogen gas for 20 min. For the reaction, an aliquot of 100 μ L of Ce⁴⁺ solution (final concentration: 25 mM) and 100 μ L of DPA/LA¹⁸O¹⁸OH solution (final concentration: 60 and 25 mM, respectively) was poured into a small glass vial and incubated under vigorous mixing at 37 °C for 1 h. Similarly, deaerated incubation was conducted in a sealed flask purged with nitrogen. Following incubation, an aliquot of the samples was dried under a nitrogen stream and diluted three times in acetone. An aliquot of 50 μ L of this solution was mixed with 50 μ L of sodium azide (final concentration: 20 mM) and 25 μ L of 1 mM DBA solution in acetonitrile.

Incubations of LA¹⁶O¹⁶OH with Ceric or Ferrous Ion. LA¹⁶O¹⁶OH was incubated with Ce⁴⁺ or Fe²⁺ in D₂O:chloroform (1:1, v/v). A Ce⁴⁺ or Fe²⁺ solution was prepared in D₂O, and the DPA and LA¹⁶O¹⁶OH solutions were prepared in chloroform. For the reaction, an aliquot of 100 μ L of Ce⁴⁺ or Fe²⁺ solution (final concentration: 50 mM) and 100 μ L of DPA/LA¹⁶O¹⁶OH solution (final concentration: 60 and 50 mM, respectively) was poured into a small glass vial and incubated under vigorous mixing at 37 °C for 1 h. Following incubation, an aliquot of the samples was dried under a nitrogen stream and diluted three times in acetone. An aliquot of 50 μ L of this solution was mixed with 50 μ L of sodium azide (final concentration: 20 mM) solution in acetonitrile.

Dimol Light Emission of Singlet Oxygen ($\lambda = 634$ and 703 nm). Light emission of ¹O₂ in the visible region was measured with a photoncounter, following the method described previously by Cadenas and Sies.^{33,34} The photoncounting device consisted of a red-sensitive photomultiplier tube (9203BM Thor EMI Electron Tubes, U.K.) cooled to -20 °C by a thermoelectric cooler (FACT 50 MKIII, EMI Gencom, Plainview, NY). The potential applied to the photomultiplier was -1.200 V. The phototube output was connected to an amplifier discriminator (model 1121, Princeton Instruments, NJ), which transmitted the signal to a computer. Selective light emission at wavelengths $\lambda > 570$ nm was obtained with a cutoff filter (03IFS006, Melles Griot visible filters) placed between the cuvette and the photomultiplier tube. Sample solutions were poured into a thermostated glass cuvette (35 mm $\times$ 7 mm $\times$ 55 mm) with mirrored walls, and the reactant was injected through a small polyethylene tube under continuous stirring. The CL signal was monitored during the injection of 0.1 mL of 100 mM Ce⁴⁺ solution in methanol (final concentration: 2 mM) into 5 mL of 0.2 mM LAOOH solution in methanol. For comparison, the CL signal of the reaction of H₂O₂ by hypochlorite was also monitored. The reaction was performed by injecting 0.4 mL of 0.28 M hypochlorite solution (final concentration: 22.4 mM) into 5 mL of 2.2 mM hydrogen peroxide solution.

Monomol Light Emission of Singlet Oxygen ($\lambda = 1270$ nm). Infrared light emission of ¹O₂ at 1270 nm was monitored with a liquid nitrogen cooled photodiode germanium detector (Ge-Diode, model EI-L, Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, U.K.), sensitive in the spectral region from 800 to 1700 nm, as described elsewhere.³⁴ A silicon filter and a band-pass filter at 1270 nm with a 10 nm half-bandwidth were used (Spectrogon U.K. Ltd., Glenrothes, UK). The Ge-Diode system was equipped with a bias power supply (model PS-1) set to provide 160 V to the detector, a muon filter (model MF-1) to filter cosmic and ionizing radiation, an optical chopper (Bentham 218, Bentham Instruments, U.K.) set at a frequency of 125 Hz, and a lock-in

amplifier (Bentham 225, Bentham Instruments, U.K.) to process the signal from the detector. The detector's signal was registered by the F-900 version 6.22 software program (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, U.K.). The optimal condition to detect the ¹O₂ monomol light emission was adjusted with the endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene (DMNO₂, 15 mM in chloroform) heated to 40 °C. For the experiments, the photodiode detector was filled with liquid nitrogen and left to equilibrate for 2 h before use. The assay was conducted at 37 °C in a thermostated quartz cuvette (10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 30 mm) under continuous stirring with a small magnetic bar (Cuv-o-stir, model 333, Hellma, Mülheim, Germany). After the baseline was recorded with the assay solvent, the reactant was injected into the cuvette with a syringe injection pump (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA). For the assay, 0.5 mL of LAOOH (100 mM in methanol, final concentration: 20 mM) was infused through a small polyethylene tube into 2.0 mL of 200 mM Ce⁴⁺ solution in methanol at a constant flux at a flow rate of 0.7 mL/min. The effect of NaN₃ was tested by injecting a 10 mM solution of NaN₃ by another tube immediately following the appearance of an intense CL signal in the LAOOH and Ce⁴⁺ reaction.

Singlet Oxygen Spectrum in the Infrared Region. The ¹O₂ monomol light emission spectrum was measured with a special photocounting apparatus developed in our laboratory and equipped with a monochromator capable of selecting emissions in the near-infrared region (800–1400 nm). The apparatus consisted of a photomultiplier tube (R5509 PMT, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan) cooled to -80 °C with liquid nitrogen (S600 PHOTOCOOL, PC176TSC005 cooler, Products for Research Inc., MA) to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage DC power supply (Model C3360, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan), and the applied potential was set to -1.5 kV. The light emitted from the sample was processed through a monochromator (M300, Bentham Instruments, U.K.) equipped with a diffraction grating (Type G306R1u0, Bentham Instruments, U.K.) capable of selecting wavelengths in the infrared region. The control of the monochromator and the acquisition of data were done by means of the F900 software described earlier. Experiments were conducted in quartz cuvettes under continuous stirring, as described above. Typically, from three to five scans in the range of 1200–1350 nm were recorded and averaged to yield the spectrum. The ¹O₂ spectrum generated in the LAOOH/Ce⁴⁺ reaction was recorded during the injection of 200 mM Ce⁴⁺ (final concentration: 40 mM) into 1.8 mL of 100 mM LAOOH solution in methanol at a flow rate of 0.7 mL/min. The ¹O₂ spectra generated in the H₂O₂/OCl⁻, H₂O₂/MoO₄²⁻ reaction and during the thermodissociation of DMNO₂ were measured similarly. For the H₂O₂/OCl⁻, 2 mL of hypochlorite (0.28 M) was injected into 1 mL of 3 M H₂O₂ (final concentration: 1 M) at a flux rate of 1.4 mL/min, and, for the H₂O₂/MoO₄²⁻, 0.1 mL of 0.5 M MoO₄²⁻ (final concentration: 25 mM) was added to 1.9 mL of 35% H₂O₂, with the reaction proceeding autocatalytically. In the case of the endoperoxide, a 15 mM solution of DMNO₂ in chloroform was incubated at 37 °C.

Results and Discussion

Synthesis and Characterization of ¹⁸O-Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide (LA¹⁸O¹⁸OH). LA¹⁸O¹⁸OH was synthesized by photooxidation, using methylene blue as a sensitizer in an atmosphere saturated with ¹⁸O-isotopically labeled molecular oxygen (¹⁸O₂). The incorporation of two atoms of ¹⁸O into the hydroperoxyl moiety of linoleic acid (LA) is consistent with data from electrospray ionization mass spectrometry in the negative mode (ESI⁻/MS) (Figure 1).

Mass spectra of both LAOOH (Figure 1A) and LA¹⁸O¹⁸OH (Figure 1B) show two intense peaks, one corresponding to the molecular ion and the other corresponding to the dehydrated product. The mass spectrum of LAOOH displays a molecular

(33) Cadenas, E.; Sies, H. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 221–231.

(34) Di Mascio, P.; Sies, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2909–2914.

Figure 1. Electrospray ionization mass spectra of (A) unlabeled (LAOOH) and (B) ^{18}O -labeled ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) linoleic acid hydroperoxide obtained in the negative ion mode. The structure of 9-hydroperoxyoctadienoic acid, one of the four LAOOH isomers, is represented in the figure.

Scheme 2. Chemical Trapping of $^{18}\text{O}_2$ with 9,10-Diphenylanthracene (DPA) Yielding the Corresponding ^{18}O -Labeled DPA Endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$)

ion $[\text{M} - \text{H}]^-$ at m/z 311 and a dehydrated product $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$ at m/z 293. The mass spectrum of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ exhibits an intense ion at m/z 315, corresponding to the labeled hydroperoxide molecular ion $[\text{M} - \text{H}]^-$, and another peak at m/z 295, corresponding to the labeled dehydrated product $[\text{M} - \text{H}_2^{18}\text{O} - \text{H}]^-$. The increase by 4 atomic mass units (amu) for the mole-

cular ion and 2 amu for the dehydrated product in the mass spectrum of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ indicates that two atoms of ^{18}O were successfully incorporated into the hydroperoxyl group. The detection of only trace amounts of the ion peak at m/z 311 ($\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$) demonstrates that $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ is almost 100% pure.

Characterization of Singlet Oxygen Generated in the Reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ceric Ion, Using 9,10-Diphenylanthracene. Labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}\text{O}_2$) generated through the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} was chemically trapped with 9,10-diphenylanthracene (DPA), generating the corresponding labeled endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) (Scheme 2).

The analysis of DPAO_2 generated in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with Ce^{4+} , performed by HPLC-MS in the full scan mode, revealed that besides the $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, two other DPA adduct species were detected: the unlabeled endoperoxide ($\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), and endoperoxide with one labeled oxygen ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$). The tandem mass spectra (MS2 full scan) of all endoperoxides were recorded, by selecting in the first analyzer (MS1) the molecular ions of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$, and $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, at m/z 363 (Figure 2A), at m/z 365 (Figure 2B), and at m/z 367 (Figure 2C), respectively. As expected, all of the endoperoxides showed an intense fragment ion at m/z 330 corresponding to the loss of one oxygen molecule.

Figure 3 shows typical chromatograms of DPAO_2 quantification. The reaction products were separated by HPLC, and the peaks eluting from the column were monitored by the UV at 210 nm (Figure 3A) and by recording the specific mass transitions in the multiple reaction monitoring mode (MRM) of the mass spectrometer. The following mass transitions were monitored for DPA endoperoxides: m/z 367 to 330 for $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (Figure 3B), m/z 365 to 330 for $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ (Figure 3C), and m/z 363 to 330 for $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (Figure 3D). For the internal standard, 9,10-dibromoanthracene (DBA) (Figure 3E), the mass transition from m/z 336 to 176, corresponding to the loss of two Br ($[(\text{M} - 2\text{Br}) + \text{H}]^+ = m/z$ 176) from the molecular ion ($[\text{M} + \text{H}]^+ = m/z$ 336), was monitored.

Figure 2. Positive APCI-mass spectra in the MS/MS mode of the endoperoxides of 9,10-diphenylanthracene formed in the incubation of 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with 25 mM Ce^{4+} and 60 mM DPA in D_2O :chloroform (1:1, v/v) under vigorous mixing at 37°C for 1 h. The MS2 full scan was acquired by selecting in the first analyzer the ions with m/z = 363, 365, or 367. (A) Spectrum of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$. (B) Spectrum of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$. (C) Spectrum of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$.

Figure 3. Typical chromatograms for the quantification of the corresponding ^{18}O -labeled DPA endoperoxide (DPAO_2) by HPLC coupled to tandem mass spectrometry in the MRM mode. (A) UV chromatogram at 210 nm. Specific mass transitions for (B) $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, m/z 367 $\rightarrow$ 330; (C) $\text{DPA}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, m/z 365 $\rightarrow$ 330; (D) $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, m/z 363 $\rightarrow$ 330; and (E) internal standard 9,10-dibromoanthracene (DBA), m/z 336 $\rightarrow$ 176. $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) was incubated with 25 mM Ce^{4+} and 60 mM DPA in D_2O :chloroform (1:1, v/v) under vigorous mixing at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 h.

Figure 4. Relative percentage of the 9,10-diphenylanthracene endoperoxides (A) $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$, (B) $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$, and (C) $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$. The control, 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ ($\square$) or 25 mM $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with 25 mM Ce^{4+} ($\blacksquare$), reactions were carried out in D_2O , deaerated D_2O , DMSO, and deaerated DMSO, all containing chloroform (1:1, v/v), and 60 mM DPA under vigorous mixing at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 h. Data are mean values $\pm$ SD ($n = 4$) for different experiments.

Figure 4A shows the generation of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ in the incubation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with Ce^{4+} , clearly demonstrating the

formation of $^{18}[\text{O}_2]$ that probably occurs via the combination of ^{18}O -labeled peroxy radical of linoleic acid ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$). On the other hand, $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ (Figure 4B) and $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (Figure 4C) were also detected, indicating that the generation of $^{16}\text{O}_2$ consisted of $^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ and $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$.

The yields of the total endoperoxides formed in D_2O , deaerated D_2O , DMSO, and deaerated DMSO were 5.0%, 1.5%, 1.5%, and 0.9%, respectively. The ratios of these three differently labeled endoperoxides ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$: $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$: $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) in the same experimental conditions were (1.1:28.1:70.8), (8.5:30.3:61.2), (28.6:11.9:59.5), and (51.5:11.8:36.7), respectively. These data suggest that besides labeled peroxy radicals ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$), two other peroxy radicals containing unlabeled oxygen ($\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$) and one labeled oxygen ($\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$) are involved in the generation of $^{16}\text{O}_2$.

According to Russell's mechanism, the bimolecular reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$ with $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$ or $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$ would generate $^{16}\text{O}_2$ containing ^{18}O and ^{16}O , while the self-reaction of $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$ or $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$ would generate $^{16}\text{O}_2$ containing unlabeled oxygen.

Our results show that, when $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} were incubated in a deaerated solution of D_2O or DMSO, the amount of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (Figure 4A) increased, while the amount of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (Figure 4C) decreased, suggesting the involvement of an oxygen exchange mechanism during the incubation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} . Data from the literature suggest that $^{16}\text{O}_2$ dissolved in the reaction system can easily replace the $^{18}\text{O}_2$ of the peroxy radical moiety.³⁵ On the basis of this fact, we hypothesized that $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$, which is formed by the one-electron oxidation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ mediated by Ce^{4+} , has its oxygen rapidly replaced by the residual $^{16}\text{O}_2$ dissolved in the reaction system, thereby generating $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^\bullet$ (Scheme 3). Another mechanism for the generation of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ may occur by the energy transfer from $^{18}[\text{O}_2]$ to $^{16}\text{O}_2$ in the fundamental ground state ($^3\Sigma_g^-$), yielding $^{16}[\text{O}_2]$. In fact, Jones and Baves showed that 50% of the $^{16}[\text{O}_2]$ was converted to $^{18}[\text{O}_2]$ in the gas phase in the presence of $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$).³⁶ The triplet carbonyls

Scheme 3. ^{16}O -Exchange Reaction of ^{18}O -Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) with $^{16}\text{O}_2$

produced during the Russell mechanism could also be involved in such exchange mechanism by quenching $^{16}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$), yielding $^{16}[^1\text{O}_2]$.³⁷

The amount of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ (Figure 4A) increased 26 times and $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ decreased by more than 60% (Figure 4B) when the incubation was done in DMSO as compared to that done in D_2O , while using DMSO led to a 16% decrease in the amount of $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$. From this result, we can speculate that the interaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with water could form $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$, thus lowering the yields of $^{18}[^1\text{O}_2]$ when the reaction is conducted in D_2O . A similar exchange of water with the peroxy group has also been proposed by Loidl-Stahlhofen.³⁸ It is known that, under acidic conditions, hydroperoxides are prone to heterolytic cleavage (Hock/Criegee rearrangement). During this process, water could exchange with the protonated hydroxyl group, forming $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$ (Supporting Information Figure 1).

Our results show variations in the amount of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ according to the level of oxygen dissolved in the system and the presence of water. Nevertheless, they serve as evidence for the generation of $^{18}[^1\text{O}_2]$ in the $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} reaction. While the purity of the labeled $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ used in this study was near 100%, nonlabeled products such as $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ and $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ were detected.

When Fe^{2+} was used instead of Ce^{4+} , $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ was also detected in the same incubation conditions (Supporting Information Figure 2). Figure 5A shows the amount of DPAO_2 generated in the reaction of $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ in the presence of Fe^{2+} as compared to that with Ce^{4+} . In this experiment, after 1 h of incubation, 50% of $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ was consumed, and the yields of DPAO_2 for Ce^{4+} and Fe^{2+} were $6.6 \pm 1.1\%$ and $1.0 \pm 0.4\%$, respectively. Figure 5B shows the time course of DPAO_2 formation without metal (a) and in the presence of Fe^{2+} (b) or Ce^{4+} (c).

Besides the oxygen production, decomposition products arising from the Russell mechanism, ketone and alcohol, were also detected by HPLC mass spectrometry as described in Supporting Information Figures 3 and 4, respectively.

In oxygen-18 tracer studies with mass spectrometry, Bartlett and Traylor, using cumylperoxy radicals which do not have the α -hydrogen, demonstrated that evolution of oxygen occurs during the interaction between the radicals via a head-to-head mechanism.^{39,40} Using similar labeling experiments coupled to electron spin resonance spectroscopy, Bennett and Howard also

Figure 5. Quantification of DPAO_2 formed in the reaction of LAOOH with Ce^{4+} or Fe^{2+} . (A) DPAO_2 concentration in the reaction of 50 mM LAOOH with 50 mM Ce^{4+} or Fe^{2+} and 60 mM DPA in D_2O :chloroform (1:1, v/v) at 37°C for 1 h. Data are mean values $\pm$ SD ($n = 4$) for different experiments. (B) Time-course of DPAO_2 generation in the same experimental condition as described for (A). (a) Control: DPA alone; (b) with Fe^{2+} ; and (c) with Ce^{4+} .

obtained evidence supporting the generation of molecular oxygen by the Russell mechanism, using a mixture of equimolar amounts of various ^{18}O -labeled and unlabeled peroxy radicals.⁴¹ Furthermore, the oxygen evolved from the self-reaction of primary, secondary, and tertiary alkylperoxy radicals involves a head-to-head interaction between two radicals instead of a head-to-tail reaction. However, they have not found whether the oxygen generated in this reaction was in the singlet state.

Considering the products detected here ($^1\text{O}_2$, ketone, and alcohol), the interaction of two linoleic acid peroxy radicals is most likely to occur by a head-to-head mechanism, as proposed by Russell.

These results described here provide new evidence of the generation of $^1\text{O}_2$ during the decomposition of lipid hydroperoxides catalyzed by metal ions (Ce^{4+} and Fe^{2+}), involving the bimolecular interaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}^\bullet$ via a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate. Moreover, the detection of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ and $\text{DPA}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ showed additional mechanistic features involved in the hydroperoxide decomposition.

(35) Chan, H. W.-S.; Levett, G.; Matthew, J. A. *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *24*, 245–256.

(36) Jones, I. T. N.; Bayes, K. D. *J. Chem. Phys.* **1972**, *2*, 1003–1004.

(37) Darmanyan, A. P.; Foote, C. S. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4573–4576.

(38) Loidl-Stahlhofen, A.; Hannemann, K.; Spiteller, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1213*, 140–148.

(39) Bartlett, P. D.; Traylor, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2407–2410.

(40) Traylor, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2411–2413.

(41) Bennett, J. E.; Howard, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4008–4010.

Figure 6. Dimol light emission of singlet oxygen ($\lambda > 570$ nm) generated in the reaction of (A) LAOOH/ Ce^{4+} and (B) H_2O_2 /hypochlorite. The light emission signal was monitored during the injection of 100 mM Ce^{4+} solution in methanol (final concentration: 2 mM) into 5 mL of 0.2 mM LAOOH methanol solution under continuous stirring. The reaction H_2O_2 /hypochlorite was performed by injecting 0.4 mL of 0.28 M hypochlorite solution (final concentration: 22.4 mM) into 5 mL of 2.2 mM hydrogen peroxide solution.

Characterization of Singlet Oxygen Generated in the Reaction of LAOOH and Ceric Ion by Chemiluminescence Measurements. The chemiluminescence (CL) produced by a chemical reaction provides important information about the excited species being generated. The measurement of CL originating from the radiative transition of $^1\text{O}_2$ to its ground state ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) is an important method for the detection and characterization of $^1\text{O}_2$.^{42–44} Two types of CL arise from $^1\text{O}_2$: dimol light emission (eq 1), which corresponds to the simultaneous deactivation of two molecules of $^1\text{O}_2$ to the ground state with photoemission in the visible red region, and monomol light emission (eq 2), which corresponds to the deactivation of one molecule of $^1\text{O}_2$ to the ground state with photoemission in the near-IR at 1270 nm.

The CL arising from the reaction of LAOOH and Ce^{4+} was recorded in the visible red region ($\lambda > 570$ nm) (Figure 6) and in the near-IR region ($\lambda = 1270$ nm) (Figure 7). As shown in Figure 6 (trace A), an injection of Ce^{4+} into a solution of LAOOH produced an intense light in the red spectral region. For comparative purposes, the reaction of H_2O_2 and hypochlorite (eq 3) was used here as an authentic source of $^1\text{O}_2$.⁴⁵

Figure 7 shows the CL signal recorded in the near-IR region using the Ge-Diode detector. An intense emission signal was observed upon injection of Ce^{4+} into the LAOOH solution, indicating that $^1\text{O}_2$ was generated (Figure 7, trace A). For further characterization of $^1\text{O}_2$, the effect of azide, a known physical quencher of $^1\text{O}_2$, was tested. As expected, the injection of azide

Figure 7. Monomol light emission at $\lambda = 1270$ nm of singlet oxygen generated by the reaction of LAOOH/ Ce^{4+} (A), and the quenching effect of $^1\text{O}_2$ by NaN_3 (B). For the assay, 0.5 mL of 100 mM LAOOH methanol solution (final concentration: 20 mM) was infused into 2.0 mL of 200 mM Ce^{4+} methanol solution at a constant flow rate of 0.7 mL/min under continuous stirring. NaN_3 (final concentration: 10 mM) was injected by another polyethylene tube.

into the LAOOH and Ce^{4+} mixture effectively quenched the germanium diode signal (Figure 7, trace B).

In addition to the direct kinetic detection of the monomol emission of $^1\text{O}_2$ at 1270 nm, further direct evidence of $^1\text{O}_2$ generation was obtained by measuring the infrared light emission spectrum produced in the LAOOH and Ce^{4+} reaction. Figure 8 shows the characteristic monomol light emission spectra of $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$), with maximum intensity at 1270 nm, obtained for the LAOOH and Ce^{4+} reaction (Figure 8A). For comparison, we recorded the infrared light emission spectrum of $^1\text{O}_2$ generated by H_2O_2 /hypochlorite (Figure 8B), H_2O_2 /molybdate (Figure 8C), and 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide (DMNO₂) (Figure 8D). As mentioned earlier, the reaction of H_2O_2 /hypochlorite (eq 3) is a well-known source of $^1\text{O}_2$, which yields $^1\text{O}_2$ in almost stoichiometric amounts. Disproportionation of H_2O_2 catalyzed by molybdate ions is known to generate a huge flux of $^1\text{O}_2$ in aqueous solutions at room temperature (eq 4).⁴⁶

Thermolysis of DMNO₂ (eq 5), generating the dimethylnaphthalene (DMN) and the $^1\text{O}_2$, is temperature-dependent.^{47–49} At a fixed temperature of 37 °C, DMNO₂ releases 88 $\mu\text{M}/\text{min}$ of $^1\text{O}_2$ in a constant flux. As expected, an emission maximum at 1270 nm was observed in all of the systems tested, which is an unambiguous proof of $^1\text{O}_2$ generated in the LAOOH and Ce^{4+} reaction.

(42) Khan, A. U.; Kasha, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 3293–3300.

(43) Krasnovsky, A. A. *Photochem. Photobiol.* **1979**, 29, 29–36.

(44) Kasha, M.; Khan, A. U. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 6047.

(45) Khan, A. U.; Kasha, M. *J. Chem. Phys.* **1963**, 39, 2105.

(46) Aubry, J.-M.; Cazin, B. *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 2013.

(47) Di Mascio, P.; Bechara, E. J. H.; Rubim, J. C. *Appl. Spectrosc.* **1992**, 46, 236–239.

(48) Briviba, K.; Saha-Möller, C. R.; Adam, W.; Sies, H. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, 38, 647–651.

Figure 8. Monomol light emission spectra of singlet oxygen ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) obtained in the reaction of (A) LAOOH/ Ce^{4+} ; (B) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$; (C) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$; and (D) DMNO_2 . LAOOH/ Ce^{4+} reaction was recorded during the injection of 200 mM of Ce^{4+} (final concentration: 40 mM) into 1.8 mL of 100 mM LAOOH methanol solution at a flow rate of 0.7 mL/min. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$ reaction: 2 mL of 0.28 M hypochlorite was injected into 1 mL of 3 M H_2O_2 (final concentration: 1 M) at a flux rate of 1.4 mL/min. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MoO}_4^{2-}$ reaction: 0.1 mL of 0.5 M MoO_4^{2-} (final concentration: 25 mM) was added to 1.9 mL of 10 M H_2O_2 with the reaction proceeding autocatalytically. DMNO_2 : 15 mM in chloroform was incubated at 37 °C. For equipment conditions, see the Experimental Section.

Conclusions

Taken together, the results discussed herein provide direct evidence of the generation of $^1\text{O}_2$ during the decomposition of LAOOH catalyzed by metal ions (Ce^{4+} and Fe^{2+}). Detection of $^{18}\text{O}_2$ in the $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} reaction serves as strong

supporting evidence for Russell's mechanism, in which two peroxy radicals combine via an intermediate tetraoxide, generating an alcohol, a ketone, and singlet oxygen. The emission of dimol light in the red spectral region ($\lambda > 570$ nm) and the emission of monomol light in the near-infrared region ($\lambda = 1270$ nm), accompanied by the quenching effect of sodium azide, are indications of molecular oxygen in the excited singlet state. Moreover, the emission of $^1\text{O}_2$ dimol and monomol light with a characteristic intense band at 1270 nm unequivocally demonstrates the generation of oxygen in the excited singlet state.

Considering that lipid hydroperoxides generate easily in cell membranes, these results point to a potential role of $^1\text{O}_2$ in the cytotoxicity mechanism of LAOOH. Taking into account the longer half-lifetime of peroxy radical (7 s) as compared to those of other reactive oxygen species ($\text{LAO}^\bullet$, $\text{LA}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$ are 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-10} s, respectively),⁵⁰ this allows for the migration of fatty acid peroxy radicals to other sites, where it can combine with another peroxy radical and generate $^1\text{O}_2$.

Acknowledgment. This work was supported by the Brazilian research funding institutions FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRONEX/FINEP (Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência), and Fundo Bunka de Pesquisa Banco Sumitomo Mitsui. We thank Clécio F. Klitzke for his assistance in the mass spectrometry analysis. S.M. and G.R.M. are recipients of FAPESP fellowships.

Supporting Information Available: Electrospray ionization mass spectra of $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$, the exchange product of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with water; detection of DPA endoperoxide (DPAO_2) formed in the incubation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with Fe^{2+} ; analysis of the labeled ketone (LA^{18}O) and the alcohol (LA^{18}OH) after the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with Ce^{4+} by HPLC-APCI-MS (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA029115O

(49) Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 3–20.

(50) Pryor, W. A. In *Free Radical in Molecular Biology, Aging, and Disease*; Armstrong, D., Sohal, R. S., Cutler, R. G., Slater, T. F., Eds.; Raven Press: New York, 1984; pp 13–41.

Singlet Molecular Oxygen Generated from Lipid Hydroperoxides by the Russell Mechanism: Studies using ^{18}O -Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide and Monomol Light Emission Measurements

Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez, Marisa H. G. Medeiros and Paolo Di Mascio

Supplemental Figure 1.

Electrospray ionization mass spectra of ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide (A: $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, B: $\text{LA}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$, C: $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$) obtained in the negative ion mode. The structure of 9-hydroperoxyoctadienoic acid, one of the four LAOOH isomers, is represented in the figure. A 25 mM solution of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ was incubated in a biphasic solvent system consisted of chloroform: $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (10%) (1:1, v/v) at 37°C under vigorous mix for 1 hour. Aliquot of the chloroform phase was evaporated under nitrogen stream, diluted in acetonitrile and then analyzed by HPLC-ESI-MS. The sample was separated on a Luna LC-18 column (250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) eluted with 65 % acetonitrile in water at a flow rate of 0.6 ml/min. The cone voltage in the mass spectrometer was set to -40 V. All other

parameters were the same as described for the analysis of LA¹⁸O¹⁸OH in the experimental section of the manuscript.

Supplemental Figure 2.

Detection of DPA endoperoxide (DPAO₂) formed in the incubation of 50 mM LA¹⁸O¹⁸OH with 50 mM Fe²⁺ and 60 mM DPA in D₂O:chloroform (1:1, v/v) under vigorous mixing at 37°C for 1 hour, by HPLC-UV-APCI-MS/MS in the MRM mode. (A) UV chromatogram at 210 nm. (B) DPA¹⁸O¹⁸O, m/z 367→330. (C) DPA¹⁶O¹⁸O, m/z 365→330. (D) DPA¹⁶O¹⁶O, m/z 363→330. (E) internal standard: 9,10-dibromoanthracene (DBA), m/z 336→176.

Supplemental Figure 3.

Analysis of the labeled ketone (LA¹⁸O) arising from the self-reaction of peroxy radicals in the reaction of 25 mM LA¹⁸O¹⁸OH with 25 mM Ce⁴⁺ in a biphasic solvent system consisted of chloroform:D₂O (1:1, v/v) incubated at 37°C under vigorous mixing for 1 hour. **A.** UV chromatogram at $\lambda=270$ nm of the incubation mixture and **B.** UV chromatogram at $\lambda=270$ nm of the LA¹⁸O standard (prepared by oxidation of the LA¹⁸OH with K₂Cr₂O₇) and **C.** Mass spectra of LA¹⁸O formed in the presence of LA¹⁸O¹⁸OH and Ce⁴⁺ detected by HPLC-APCI-MS in the positive ion mode. For the analysis, an aliquot of the chloroform phase was evaporated under nitrogen stream, diluted in hexane:isopropanol (99:1, v/v) and then analyzed by HPLC-APCI-MS system. LA¹⁸O was separated in a silica column (250×4.6 mm, 5 μ m) eluted with hexane:isopropanol:formic acid (97:3:0.06, v/v/v) at a flow rate of 1.0 ml/min.

For its detection, the source and the probe temperature of the mass spectrometer was kept at 120°C and 150 °C, respectively and the cone voltage was set to 10 V.

Supplemental Figure 4.

Analysis of the labeled alcohol (LA¹⁸OH) arising from the self-reaction of peroxy radicals in the reaction of 25 mM LA¹⁸O¹⁸OH with 25 mM Ce⁴⁺ in a biphasic solvent system consisted of chloroform:D₂O (1:1, v/v) incubated at 37°C under vigorous mixing for 1 hour. **A.** UV chromatogram at $\lambda=210$ nm of the incubation mixture and **B.** UV chromatogram at $\lambda=210$ nm of the LA¹⁸OH standard (prepared by reduction of the LA¹⁸O¹⁸OH with NaBH₄, Terao et al. 1988, *Anal. Biochem.* 169, 415-423) and **C.** Mass spectra of LA¹⁸OH formed in the presence of LA¹⁸O¹⁸OH and Ce⁴⁺ detected by HPLC-APCI-MS in the negative ion mode. For the analysis, an aliquot of the chloroform phase was evaporated under nitrogen stream, diluted in acetonitrile and then analyzed by HPLC-APCI-MS system. The

sample was separated on Supelco LC-18 column (150×4.6 mm, 5 µm) eluted with 65 % acetonitrile in water at a flow rate of 0.6 ml/min and the source and the probe temperature of the mass spectrometer was kept at 150°C and 300°C, respectively and the cone voltage was set to 20 V.

Direct Evidence of Singlet Molecular Oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] Production in the Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Peroxynitrite

Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez, Ana Paula B. Martins,
Marisa H. G. Medeiros, and Paolo Di Mascio*

Contribution from the Departamento de Bioquímica, Instituto de Química,
Universidade de São Paulo, CP 26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

Received November 7, 2002; E-mail: pdmascio@iq.usp.br

Abstract: Peroxynitrite ($ONOO^-$), a biologically active species, can induce lipid peroxidation in biological membranes, thereby leading to the formation of various hydroperoxides. We report herein on the formation of singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] in the reaction of peroxynitrite with linoleic acid hydroperoxide (LAOOH) or ^{18}O -labeled LAOOH. The formation of $O_2(^1\Delta_g)$ was characterized by (i) dimol light emission in the red spectral region ($\lambda > 570$ nm) using a red-sensitive photomultiplier; (ii) monomol light emission in the near-infrared region ($\lambda = 1270$ nm) with a liquid nitrogen-cooled germanium diode or a photomultiplier coupled to a monochromator; (iii) the enhancing effect of deuterium oxide on chemiluminescence intensity, as well as the quenching effect of sodium azide; and (iv) chemical trapping of $O_2(^1\Delta_g)$ or ^{18}O -labeled $O_2(^1\Delta_g)$ with the 9,10-diphenylanthracene (DPA) and detection of the corresponding DPAO₂ or ^{18}O -labeled DPA endoperoxide by HPLC coupled to tandem mass spectrometry. Moreover, the presence of $O_2(^1\Delta_g)$ was unequivocally demonstrated by a direct spectral characterization of the near-infrared light emission attributed to the transition of $O_2(^1\Delta_g)$ to the triplet ground state. For the sake of comparison, $O_2(^1\Delta_g)$ deriving from the thermolysis of the endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene or from the H_2O_2 /hypochlorite and H_2O_2 /molybdate systems were also monitored. These novel observations identified the generation of $O_2(^1\Delta_g)$ in the reaction of LAOOH with peroxynitrite, suggesting a potential $O_2(^1\Delta_g)$ -dependent mechanism that contributes to cytotoxicity mediated by lipid hydroperoxides and peroxynitrite reactions in biological systems.

Introduction

Lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids leads to a complex mixture of hydroperoxides.^{1,2} Attention has focused on this process because of its role in destructive biological processes. The oxidation of lipids has been implicated in modifications of membrane structure, DNA damage and protein modification.^{3–6} It is also increasingly recognized that lipid peroxidation is associated with the mechanism of tumor initiation,^{7–10} deposition of arterial plaque,^{11,12} radiation damage,^{13,14} and aging.^{15,16}

Chemiluminescence (CL) arising from lipid peroxidation has been used as a sensitive detector of oxidative stress both in vitro and in vivo.^{17,18} Several authors have attributed ultraweak CL associated with lipid peroxidation to the radiative deactivation of singlet oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] and to triplet-excited carbonyls.^{19–21} It has been proposed that the latter emitters arise from the thermolysis of dioxetane intermediates²² and annihilation of alkoxy,²³ as well as peroxy radicals.^{24–27} Following the suggestion of Russell,²⁴ Howard and Ingold²⁵ found that the self-reaction of peroxy radicals generates $O_2(^1\Delta_g)$. Russell

- (1) Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Bessler, T. R. *Lipids* **1979**, *14*, 961–967.
- (2) Terao, J.; Matsushita, S. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1977**, *54*, 234–238.
- (3) Marnett, L. J. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 361–70.
- (4) Refsgaard, H. H. F.; Tsai, L.; Stadtman, E. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 611–616.
- (5) Kato, Y.; Mori, Y.; Makino, Y.; Morimitsu, Y.; Hiroi, S.; Ishikawa, T.; Osawa, T. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20 406–20 414.
- (6) Moriya, M.; Zhang, W.; Johnson, F.; Grollman, A. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 11 899–11 903.
- (7) Fink, S. P.; Reddy, G. R.; Marnett, L. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 8652–8657.
- (8) Chung, F. L.; Chen, H. J. C.; Nath, R. G. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2105–2111.
- (9) Burcham, P. C. *Mutagenesis* **1998**, *13*, 287–305.
- (10) Pan, J.; Chung, F. L. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 367–372.
- (11) Esterbauer, H.; Gebicki, J.; Puhl, H.; Jurgens, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *13*, 341–390.
- (12) Berliner, J. A.; Heinecke, J. W. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 707–727.
- (13) Vile, G. F.; Tyrrell, R. M. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 721–730.

- (14) Morlière, P.; Moysan, A.; Tirache, I. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 365–371.
- (15) Choe, M.; Jackson, C.; Yu, B. P. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 977–984.
- (16) Spitteller, G. *Exp. Gerontol.* **2001**, *36*, 1425–1457.
- (17) Cadenas, E.; Boveris, A.; Chance, B. *Biochem. J.* **1980**, *188*, 577–583.
- (18) Boveris, A.; Cadenas, E.; Reiter, R.; Filipkowski, M.; Nakase, Y.; Chance, B. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **1980**, *77*, 347–351.
- (19) Boveris, A.; Cadenas, E.; Chance, B. *Fed. Proc.* **1981**, *40*, 195–198.
- (20) Lissi, E. A.; Caceres, T.; Videla, L. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1988**, *4*, 93–97.
- (21) Prat, A. G.; Turrens, J. F. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8*, 319–325.
- (22) Briviba, K.; Saha-Moller, C. R.; Adam, W.; Sies, H. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 647–651.
- (23) Phillips, D.; Assimov, V.; Karpukhin, O.; Shiliapintokh, V. *Nature* **1967**, *215*, 1163–1165.
- (24) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871–3877.
- (25) Howard, J. A.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1057–1058.
- (26) Hawco, F. J.; O'Brien, P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *76*, 354–361.
- (27) Kanofsky, J. R. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3386–3388.

Scheme 1. Proposed Russell Mechanism for the Self-Reaction of Linoleic Acid (LA) Peroxyl Radicals (LAOO•) Generating the Tetraoxide Intermediate (LAOOOOLA) and the Corresponding Products: (A) Alcohol (LAOH), Ketone (LAO) and $O_2(^1\Delta_g)$; or (B) Alcohol (LAOH), Excited Ketone (LAO*) and $O_2(^3\Sigma_g^-)$

proposed the formation of a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate that decomposes to give an alcohol, ketone and molecular oxygen (Scheme 1). It has been postulated that this reaction may generate either an electronically excited oxygen molecule (Scheme 1A) or an electronically excited ketone (Scheme 1B). Indeed, $O_2(^1\Delta_g)$ and triplet carbonyls have been identified as the CL emitters in the ultra-weak CL associated with lipid peroxidation in biological system.^{28,29} Niu and Mendenhall reported that the yields of 1O_2 , in the case of simple alkylhydroperoxides, ranged from 3.9 to 14.0%.³⁰ By contrast, the yields of excited carbonyls were 10^3 – 10^4 lower, suggesting that the self-reaction of peroxyl radical deriving from fatty acids generates predominantly $O_2(^1\Delta_g)$.³¹

Singlet oxygen displays considerable reactivity toward electron-rich organic molecules including, among others, the guanine moiety of DNA.^{32,33} Evidence has accumulated indicating that $O_2(^1\Delta_g)$ is implicated in the genotoxic effect of the UVA component of solar radiation and is likely to play an important role in the cell signaling cascade³⁴ and induction of gene expression.³⁵ Various authors have investigated the generation of $O_2(^1\Delta_g)$ in biological systems, which has been proposed to occur by type II photosensitization mechanism³⁶ and enzymatic processes of peroxidases and oxidases.^{37,38} Other chemical reactions are also able to produce $O_2(^1\Delta_g)$, such as the reaction of hydrogen peroxide with hypochlorite³⁹ and the reaction of ONOO[−] with hydrogen peroxide⁴⁰ or *tert*-butyl hydroperoxide.⁴¹

Peroxynitrite (oxoperoxonitrate (1^-), ONOO[−]) and its conjugated acid, peroxynitrous acid (ONOOH, $pK_a = 6.8$), are strong oxidants of biological importance produced by the reaction of the superoxide anion radical and nitrogen monoxide.^{42,43} Peroxynitrite reacts rapidly ($k = 10^3$ – $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) with a number of biological targets, including lipids, thiols, amino

acid residues, and DNA bases.^{44–46} Among biomolecules, lipids containing polyunsaturated fatty acids are key targets of peroxynitrite oxidation.^{47–49} Studies *in vitro* have shown that the reaction of peroxynitrite with pure lipids generates nitrated oxidized derivatives⁵⁰ as well as several lipid oxidation products, including lipid peroxides such as linoleic acid hydroperoxide.⁴⁷ It is known that one-electron oxidation of lipid hydroperoxides mediated by strong oxidants generates peroxyl radicals. We postulate, now, that the reaction of lipid hydroperoxides with peroxynitrite can also promote the generation of peroxyl radicals, thus generating $O_2(^1\Delta_g)$ as an intermediate oxidant by following the mechanism proposed by Russell.

For this purpose, we study here the chemiluminescence-generating reaction of linoleic acid hydroperoxides (LAOOH) or ^{18}O -labeled LAOOH (LA- $^{18}O^{18}OH$) with ONOO[−], using (i) CL measurement of the dimol and monomol light emission in the visible ($\lambda > 570 \text{ nm}$) and infrared ($\lambda = 1270 \text{ nm}$) spectral region (eq 1 and 2, respectively); (ii) the enhanced effect of D_2O and sodium azide quenching on the CL; (iii) the near-infrared emission spectrum characteristic of $O_2(^1\Delta_g)$; and (iv) the chemical trap of $O_2(^1\Delta_g)$ by the 9,10-diphenylanthracene (DPA) and quantification and detection of the corresponding DPAO₂ or ^{18}O -labeled DPA endoperoxide (DPA- $^{18}O^{18}O$) respectively (eq 3 and 7), to provide additional evidence for the formation of $O_2(^1\Delta_g)$ in this system

Materials and Methods

Chemicals. Peroxynitrite was synthesized from sodium nitrite (0.6 M) and hydrogen peroxide (0.65 M) in a quenched-flow reactor;^{46,51}

- (28) Sugioka, K.; Nakano, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *423*, 203–216.
- (29) Sies, H. *Arch. Toxicol.* **1987**, *60*, 138–143.
- (30) Niu, Q.; Mendenhall, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1656–1657.
- (31) Mendenhall, G. D.; Sheng, X. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8976–8977.
- (32) Cadet, J.; Douki, T.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 143–153.
- (33) Kang, P.; Foote, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4865–4873.
- (34) Klotz, L. O.; Briviba, K.; Sies, H. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 130–143.
- (35) Ryter, S. W.; Tyrrell, R. M. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 1520–1534.
- (36) Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- (37) Cilento, G. In *Chemical and Biological Generation of Excited States*; Adam, V., Cilento, G., Eds.; Academic Press: London, 1982; pp 277–307.
- (38) Cadenas, E.; Sies, H. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 67–77.
- (39) Khan, A. U.; Kasha, M. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 2105–2106.
- (40) Di Mascio, P.; Bechara, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Briviba, K.; Sies, H. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 287–289.
- (41) Di Mascio, P.; Briviba, K.; Sasaki, S. T.; Catalani, L. H.; Medeiros, M. H. G.; Bechara, E. J. H.; Sies, H. *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 1071–1074.
- (42) Beckman, J. S.; Koppenol, W. H. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271*, C1424–C1437.
- (43) Radi, R.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Ferrer-Sueta, G.; Rubbo, H. In *Nitric Oxide*; Ignarro, L., Ed.; Academic Press: London, 2000; pp 57–82.

- (44) Radi, R.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Naviliat, M.; Cayota, A. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 463–88.
- (45) Yermilov, V.; Yoshie, Y.; Rubio, J.; Ohshima, H. *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 67–70.
- (46) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1620–1624.
- (47) Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *288*, 481–487.
- (48) Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaram, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26 066–26 075.
- (49) Gadelha, F. R.; Thomson, L.; Fagian, M. M.; Costa, A. D.; Radi, R.; Vercesi, A. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *345*, 243–250.
- (50) O'Donnell, V. B.; Eiserich, J. P.; Chumley, P. H.; Jablonsky, M. J.; Krishna, N. R.; Kirk, M.; Barnes, S.; Darley-Usmar, V. M.; Freeman, B. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 83–92.
- (51) Bonini, M. G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A. M.; Augusto, O. J. *Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10 802–10 806.

excess hydrogen peroxide was used to minimize nitrite contamination.⁵² To eliminate excess hydrogen peroxide, the ONOO⁻ was treated with manganese dioxide. The concentration of the ONOO⁻ stock solutions was determined spectrophotometrically at 302 nm with an extinction coefficient of 1670 M⁻¹ cm⁻¹.⁵³ For the experiments, a solution of 100 mM ONOO⁻ was prepared in 0.1 M NaOH or D₂O immediately prior to use. The endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene (DMNO₂) was synthesized and used according to a method described previously.⁵⁴ The endoperoxide of 9,10-diphenylanthracene (DPAO₂) was prepared by photosensitized oxidation.⁵⁵ The 9,10-diphenylanthracene (DPA) was from Aldrich (Steinheim, Germany). Linoleic acid (LA) and all the other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO) and the solvents were from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium hypochlorite was analyzed spectrophotometrically in an alkaline solution (0.1 M NaOH) at 292 nm with an extinction coefficient of 350 M⁻¹ cm⁻¹.⁵⁶ All the solutions were prepared with distilled water purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA).

Linoleic Acid Hydroperoxide Synthesis and HPLC/Mass Spectrometry Analysis. Linoleic acid hydroperoxides (LAOOH) were synthesized by photooxidation using methylene blue as a sensitizer. Typically, 1 g of linoleic acid was dissolved in 50 mL of chloroform containing 0.2 mM of methylene blue and irradiated with a tungsten lamp (500 W) for 5 h. Irradiation was conducted in an ice-bath under a continuous flux of oxygen. The methylene blue was removed and LAOOH separated by silica gel column chromatography, following the procedure described by Kühn.⁵⁷ Briefly, the products were placed in the column and separated by a discontinuous gradient of *n*-hexane: diethyl ether from 9:1 to 5:5 (v/v). The concentration of LAOOH was determined spectrophotometrically at 234 nm ($\epsilon = 25 \times 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹),⁵⁸ considering that 60% of the hydroperoxides contain conjugated diene.^{1,2}

LAOOH was analyzed by HPLC electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectrometry (MS) in the negative ion mode. LAOOH was separated in an LC-18 column (Supelco, 150 × 4.6 mm, 5 μ m) and eluted for 10 min with a linear gradient of 75% to 100% acetonitrile. An ESI/APCI-MS analysis was made using a Platform II mass spectrometer (Micromass, Altricham, U.K.). The source temperature of the mass spectrometer was kept at 100 °C, and the flow rates of drying and nebulizing gas were optimized at 300 l/h and 15 l/h, respectively. The cone voltage was set to 20 V. Capillary potential and high electrode potential were set to 3.0 kV and 0.5 kV, respectively. For APCI-MS analysis the probe temperature was set to 250 °C. Full scan data were acquired over a mass range of 100–400 *m/z*. The data were processed and transformed into molecular mass values on a mass scale by means of the Mass Lynx NT data system, version 3.20 (Micromass, Altricham, U.K.).

Synthesis of ¹⁸O-Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide (LA¹⁸O¹⁸OH). LA¹⁸O¹⁸OH was prepared by photooxidation of linoleic acid under an ¹⁸O₂-saturated atmosphere using methylene blue as the photosensitizer. Briefly, 1 g of linoleic acid was dissolved in 50 mL of chloroform previously purged with nitrogen gas for 20 min. Then, 100 μ L of methylene blue solution (100 mM in methanol) was added, and the oxygen contained in the system was removed by successive freezing and thawing under vacuum. This procedure was repeated at least 5 times to ensure complete removal of ¹⁶O₂. Thereafter, the whole system

was connected to an ¹⁸O₂ gas cylinder under 0.5 atm. The mixture was irradiated with two tungsten lamps (500 W) for 5 h and stirred continuously. Characterization and purity of LA¹⁸O¹⁸OH was performed by MS as described above.

Dimol Light Emission of Singlet Oxygen. Low-level CL was measured with a single-photon counting system, described elsewhere,⁵⁹ equipped with a red-sensitive photomultiplier cooled to -20 °C by a thermoelectric cooler. The potential applied to the photomultiplier was -1.2 kV. The phototube output was connected to an amplifier discriminator (Model 1121, Princeton Instruments, NJ) and to the computer for data acquisition. Selective light emission at wavelengths of $\lambda > 570$ nm was obtained using a cutoff filter (Melles Griot visible filters, 03IFS006) placed between the cuvette and the photomultiplier tube. Sample solutions were poured into a thermostat-equipped glass cuvette (35 mm × 6 mm × 55 mm) with mirrored walls at 37 °C. Typically, the reactant was injected into the solution contained in the cuvette using a syringe injection pump (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA) at a controlled flow rate.

Monomol Light Emission of Singlet Oxygen. The infrared photoemission of O₂ (¹ Δ_g) at $\lambda = 1270$ nm was measured with a liquid nitrogen-cooled germanium photodetector (Ge-Diode, Model EI-L, Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, UK) or a special photocounting apparatus, which is described in the next method. The Ge-Diode detector, which is sensitive in the spectral region from 800 to 1800 nm, has a detector area of 0.25 cm² and a sapphire window, as described elsewhere.⁶⁰ A silicon filter and a band-pass filter at $\lambda = 1270$ nm with a 10 nm half-bandwidth were used (Spectrogon U.K. Ltd., Glenrothes, UK). A muon filter (Model MF-1) was used to filter cosmic and ionizing radiations. The power was provided by a bias power supply (Model PS-1) set to 160 V. The signal was processed through an optical chopper (Bentham 218, Bentham Instruments, UK) with a frequency of 125 Hz and a Lock-in Amplifier (Bentham 225, Bentham Instruments, UK). Emission signal data were acquired using the F-900 ver. 6.22 software program (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, UK). For the experiments, the photodiode detector was filled with liquid nitrogen and left to equilibrate for 2 h before use. The assay was conducted in a thermostated quartz cuvette (10 × 10 × 30 mm) under continuous stirring (Cuv-o-stir, model 333, Hellma, Mühlheim, Germany) at 37 °C. After recording the baseline with the assay solvent, the reactant was injected into the cuvette by means of a syringe injection pump, as describe earlier herein. Monomol light emissions were also measured using a monochromator fixed at $\lambda = 1270$ nm, with the equipment described in the next paragraph.

Spectral Measurements of Singlet Oxygen in the Near-Infrared Region. The singlet oxygen monomol light emission spectrum was measured with a special photocounting apparatus developed in our laboratory, equipped with a monochromator capable of selecting emissions in the near-infrared region (800–1400 nm). The apparatus consists of a photomultiplier tube (R5509 PMT, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan) cooled to -80 °C with liquid nitrogen (S600 PHOTOCOOL, PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA) to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage DC power supply (Model C3360, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan) and the applied potential was set to -1.5 kV. The light emitted from the sample was processed through a monochromator (M300, Bentham Instruments, UK) equipped with a diffraction grating (Type G306R1u0, Bentham Instruments, UK) capable of selecting wavelengths in the infrared region. The phototube output was connected to the computer and the signal acquired. The monochromator was controlled and the data acquired using the F-900 ver. 6.22 software program (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, U. K.). Experiments were conducted in quartz cuvettes, as described above. Typically, 3–5 scans in the range of 1200–1350 nm were recorded and averaged to yield the spectrum.

(52) Saha, A.; Goldstein, S.; Cabelli, D.; Czapski, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 653–659.

(53) Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *J. Chem. Soc. A* **1968**, *2*, 450–456.

(54) Di Mascio, P.; Bechara, E. J. H.; Rubim, J. C. *Appl. Spectrosc.* **1992**, *46*, 236–239.

(55) Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 3–20.

(56) Morris, J. C. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3798–3805.

(57) Kühn, H.; Wiesner, R.; Lankin, V. Z.; Nekrasov, A.; Alder, L.; Schewe, T. *Anal. Biochem.* **1987**, *160*, 24–34.

(58) Mulliez, E.; Leblanc, J. P.; Gierd, J. J.; Rigaud, M.; Chottard, J. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *916*, 13–23.

(59) Cadenas, E.; Sies, H. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 221–231.

(60) Di Mascio, P.; Sies, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2909–2914.

Chemical Trapping of Singlet Oxygen and HPLC/Mass Spectrometry Analysis. To chemically detect $O_2 (^1\Delta_g)$, we used 9,10-diphenylanthracene (DPA). This method is based on the rapid and specific reaction of $O_2 (^1\Delta_g)$ with DPA ($k_r = 1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (eq 7), which forms a stable DPA endoperoxide (DPAO₂).⁶¹ LAOOH (final concentration, 50 mM) was incubated with ONOO[−] (final concentration, 50 mM) in a biphasic system composed of chloroform and D₂O in the presence of 60 mM DPA and protected from light. For purposes of comparison, 60 mM DPA was incubated with 5 mM DMNO₂, a known generator of $O_2 (^1\Delta_g)$. DPAO₂ was separated from DPA by HPLC, using a system consisting of LC 10ADVP pumps connected to an automatic SIL-10ADVP injector (Shimadzu, Tokyo, Japan). For analytical purposes, the system was equipped with a $150 \times 4.6 \text{ ID mm}$ (particle size $5 \mu\text{m}$) Supelco C18 reverse-phase column and a $20 \times 2.1 \text{ mm}$ (particle size $5 \mu\text{m}$) Supelco C18 guard precolumn (Supelco, Bellefonte, PA), connected to a Shimadzu SPD-M10AVVP diode-array. Calibration curves for DPA and DPAO₂ were drawn in the range of 0.04–0.75 mM and 0.001–0.04 mM, respectively. After incubation, the samples were diluted 1:125 and $30 \mu\text{L}$ was injected into the HPLC. Solvent A and B were water and acetonitrile, respectively. The compounds were eluted using an increasing linear gradient of B from 65% to 100% during the first 30 min, keeping it constant for 10 min and returning to 65% in 5 min. The flow-rate was 0.6 mL/min. The data were acquired using the Shimadzu CLASS-VP, version 5.3 software program. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry analyses in the positive ion mode were made with a Platform II mass spectrometer (Micromass, Altricham, U. K.). The probe and source temperature of the mass spectrometer were maintained at 300 °C and 150 °C, respectively. DPAO₂ was monitored at a cone voltage of 15 V and the collision energy set to 15 eV. In the same run, the internal standard 9,10-dibromoanthracene was monitored at a cone voltage of 20 V and a collision energy of 45 eV. Full-scan data were acquired over a mass range of 100–500 m/z . Quantification was done in the multiple reaction monitoring mode (MRM) and the data were processed and transformed into molecular mass values on a mass scale using the aforementioned software program.

Results and Discussion

Light Emission Detection of Singlet Oxygen. The measurement of chemiluminescence (CL) originated by the radiative transition of $O_2 (^1\Delta_g)$ to its ground state is an important method for the detection and characterization of $O_2 (^1\Delta_g)$. Two types of CL derive from $O_2 (^1\Delta_g)$: dimol emission and monomol emission. In this experiment, the mixture of LAOOH and ONOO[−] produced a rapid increase in light emission in the wavelength corresponding to monomol and dimol emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ (see eq 1 and 2). As illustrated in Figure 1, trace b, the injection of ONOO[−] (5.2 mM concentration at CL maximum intensity) into a solution of 10 mM LAOOH in methanol produced a strong light emission in the red spectral region ($\lambda > 570 \text{ nm}$). For comparative purposes, $O_2 (^1\Delta_g)$ chemically generated in the thermolysis of 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide (DMNO₂) (Figure 1, trace a) or in the oxidation of H₂O₂ by hypochlorite (Figure 1, trace c) were monitored.

Thermolysis of DMNO₂ into the parent hydrocarbon (DMN) and molecular oxygen (eq 4) is temperature-dependent.⁶¹ At a fixed temperature, DMNO₂ liberates $O_2 (^1\Delta_g)$ at a constant flux, as depicted in Figure 1. In contrast, the yield of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the H₂O₂/hypochlorite system (eq 5) is almost quantitative but very fast compared with the thermodecomposition of DMNO₂ and the reaction of LAOOH and ONOO[−]. During injection of

Figure 1. Dimol light emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of LAOOH and peroxyntirite. Lane a, thermolysis of 6 mM DMNO₂ in chloroform; Lane b, injection of 100 mM ONOO[−] (5.2 mM after 18 s of injection) into 4 mL of 10 mM LAOOH in methanol, final pH 9; and Lane c, injection of 328 mM hypochlorite (9.2 mM after 10 s of injection) into 4 mL of 20 mM H₂O₂. Injection flux was set to 0.7 mL/min. All solutions were maintained under mixing at 37 °C.

peroxyntirite or LAOOH solution the pH changed from 6 to 9 or 13 to 11, respectively.

Using the Ge-Diode detector, the monomol light emission at $\lambda = 1270 \text{ nm}$ was observed in the reaction of LAOOH/peroxyntirite, as shown in Figure 2, trace b. Likewise, the production of $O_2 (^1\Delta_g)$ from H₂O₂/hypochlorite and from DMNO₂ are shown in traces c and a, respectively. Neither ONOO[−] nor LAOOH nor hypochlorite elicited CL when present alone.

The CL's intensity increased with the ONOO[−] concentration tested from 10 to 100 mM (data not shown). Singlet oxygen production was calibrated based on the rate of DMN generated from DMNO₂, considering that 70% of the oxygen released is in the excited state.⁶¹ At 37 °C, thermolysis of DMNO₂ yielded $88 \mu\text{M } O_2 (^1\Delta_g) \text{ min}^{-1}$, so that we roughly estimated a flash of $O_2 (^1\Delta_g)$ production of $318 \mu\text{M } O_2 (^1\Delta_g)$ for the reaction LAOOH/peroxyntirite shown in trace b of Figure 2. This corresponds to the generation of about 1% of $O_2 (^1\Delta_g)$ from the reaction of equimolar amounts of LAOOH and ONOO[−].

To further characterize the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of LAOOH and peroxyntirite, the effects of deuterated water and azide on CL intensity were examined using both the Ge-Diode detector (Figure 3A) and the special monochromator

(61) Turro, N. J.; Chow, M. F.; Rigaudy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7218–7224.

Figure 2. Monomol light emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of LAOOH and peroxyntirite. Lane *a*, thermodissociation of 13 mM $DMNO_2$ in methanol; Lane *b*, injection of 100 mM LAOOH methanol solution (22.5 mM after 50 s of injection) into 2 mL of 100 mM $ONOO^-$, final pH 11; and Lane *c*, injection of 328 mM hypochlorite (8 mM after 4 s of injection) into 2 mL of 20 mM H_2O_2 . Injection flux was set to 0.7 mL/min. All solutions were maintained under mixing at 37 °C.

Figure 3. Effect of D_2O and NaN_3 on the monomol emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of LAOOH and $ONOO^-$. A, time course of light emission monitored by Ge-Diode detector during injection of 100 mM LAOOH methanol solution (5.5 mM after 10 s of injection) into 2 mL of 100 mM $ONOO^-$ in H_2O (a), and 67% D_2O (b), final pH 11; and B, time interval of light emission monitored by photomultiplier with a monochromator set to $\lambda = 1270$ nm during injection of 100 mM peroxyntirite in 67% D_2O (5.5 mM after 10 s of injection) into 2 mL of 10 mM LAOOH, final pH 9 (a) without NaN_3 and (b) with 1 mM NaN_3 . The LAOOH solution was injected at a flow rate of 0.7 mL/min. All solutions were maintained under mixing at 37 °C.

coupled to a highly sensitive photomultiplier (Figure 3B). Upon replacement of H_2O by 67% D_2O , the monomol emission at $\lambda = 1270$ nm was increased (Figure 3A). This is consistent with the fact that the lifetime of $O_2 (^1\Delta_g)$ increases in D_2O .⁶² In

addition, sodium azide effectively quenched the CL signal's intensity (Figure 3B, line *b* compared with Figure 3B line *a*), which is a strong indication that $O_2 (^1\Delta_g)$ is the emitter.

Considering the fact that peroxyntirite decomposition generates hydroxyl radical ($\cdot OH$) or “OH-like species”,^{63–65} we assessed the possible involvement of these species in the process of $O_2 (^1\Delta_g)$ generation. For this purpose, we tested the effect of known $\cdot OH$ radical scavengers, dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.2–10% v/v) and mannitol (1 and 5 mM) in the CL signal. In both cases, CL was strongly inhibited. CL decreased by 50% with the addition of 1.5 mM mannitol and 0.5% DMSO. The addition of desferrioxamine, a known metal chelator and scavenger of hydroxyl radicals,⁶⁶ also decreased the CL intensity. It should be noted that DMSO and mannitol concentration used here, did not affect the $O_2 (^1\Delta_g)$ CL signal's intensity generated from the thermodissociation of $DMNO_2$. Therefore, it is strongly suggested that $\cdot OH$ or “OH-like” species are involved in the $O_2 (^1\Delta_g)$ generating process.

Singlet Oxygen Spectrum. Besides the direct kinetic detection of the monomol emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ at $\lambda = 1270$ nm, we also recorded the infrared light emission spectrum of $O_2 (^1\Delta_g)$ produced by the reaction of LAOOH with peroxyntirite (Figure 4 A). The emission spectra of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the oxidation of H_2O_2 by hypochlorite³⁹ (eq 5) (Figure 4B), the thermodissociation of $DMNO_2$ ⁵⁴ (eq 4) (Figure 4C), and the disproportionation of H_2O_2 catalyzed by molybdate ions⁶⁷ (eq 6) (Figure 4D) were also recorded for purposes of comparison. As expected, an emission maximum at $\lambda = 1270$ nm, characteristic of $O_2 (^1\Delta_g)$ monomol emission, was observed in all the systems tested, confirming the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of LAOOH and peroxyntirite

Chemical Trapping of Singlet Oxygen. The $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of LAOOH and $ONOO^-$ was chemically detected using the $O_2 (^1\Delta_g)$ chemical probe DPA (eq 7), which is suitable for reactions in organic phases.⁶⁸ The water soluble disodium salt anthracene derivative, anthracene-9,10-diyl-diethyl sulfate was recently used to chemically trap $O_2 (^1\Delta_g)$.⁶⁹ Detection of the anthracene endoperoxide (DPAO₂) provided further evidence of the formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in this system (Figure 5Bd). DPA

(62) Merkel, P. B.; Kearns, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1029–1030.

Figure 4. Monomol light emission spectrum of $O_2 ({}^1\Delta_g)$ generated in the reaction of LAOOH and $ONOO^-$ recorded in the near-infrared region between 1200 and 1350 nm. A, LAOOH/ $ONOO^-$, 1.0 mL of 100 mM LAOOH in methanol was injected into 2 mL of 100 mM $ONOO^-$ in 67% D_2O at a flow rate of 0.7 mL/min at 37 °C; B, H_2O_2 /hypochlorite, 2 mL of 0.3 M hypochlorite was injected into 1 mL of 3 M H_2O_2 at a flow rate of 1.4 mL/min at room temperature; C, thermodissociation of 15 mM $DMNO_2$ in chloroform at 40 °C; and D, H_2O_2 /molybdate, 1 mL of 0.5 M MoO_4^{2-} solution (0.1 M HCO_3^- , 0.1 M CO_3^{2-}) was mixed with 1 mL D_2O and with 0.1 mL of 10 M H_2O_2 at room temperature. All solutions were maintained under mixing.

and its endoperoxide (DPAO₂) were analyzed by gradient reverse-phase HPLC (Figure 5A) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (Figure 5C and 5D). The mass spectrum of DPA recorded in the positive mode exhibits a major $[M]^+$ ion at $m/z = 330$ (Figure 5C), corresponding to the positively charged molecular ion. The spectrum of DPAO₂ displays, as expected, an intense $[M+H]^+$ ion at $m/z = 363$ (Figure 5D). The incubation of LAOOH (final concentration, 50 mM) and peroxynitrite (final concentration, 50 mM) in the presence of 60 mM DPA resulted in the formation of DPAO₂ (Figure 5Bd), as proved by co-injection of DPAO₂ (Figure 5Be) and by its mass spectrum (Figure 5D). For comparison, we show the formation of DPAO₂ when 60 mM DPA was reacted with

Figure 5. Chemical detection of $O_2 ({}^1\Delta_g)$ by the formation of DPAO₂. A, a: DPA 0.48 mM, b: DPAO₂ 0.012 mM and c*: 60 mM DPA incubated with 5 mM $DMNO_2$; B, a*: Control, 60 mM DPA b*: 60 mM DPA incubated with 50 mM LAOOH, c*: 60 mM DPA incubated 50 mM $ONOO^-$, d*: 60 mM DPA incubated with 50 mM LAOOH and 50 mM $ONOO^-$, e*: aliquot of d spiked with pure DPAO₂; C, Mass spectra of DPA, and D, Mass spectra of DPAO₂. * Incubated samples were diluted 125 times before analysis by HPLC. Conditions: all solutions were incubated under mixing at 37 °C for 1 h, in a biphasic system composed of chloroform and D_2O (1:1, v/v) and protected from light.

$O_2 ({}^1\Delta_g)$ generated by thermal decomposition of 5 mM $DMNO_2$ (Figure 5Ac). In contrast, neither LAOOH nor $ONOO^-$ alone led to the formation of DPAO₂ (Figure 5Bb and 5Bc, respectively), as compared to the control (DPA) (Figure 5Ba). Quantitative measurements of DPAO₂ in the reaction of LAOOH and $ONOO^-$ (Figure 6) yielded an estimated $O_2 ({}^1\Delta_g)$ 1.2%, which is close to the values found by photoemission measurements.

Characterization of Labeled Singlet Oxygen Generated in the Reaction of LA¹⁸O¹⁸OH and Peroxynitrite, using 9,10-Diphenylanthracene. Figure 7 shows the mass spectra of both LAOOH (Figure 7A) and LA¹⁸O¹⁸OH (Figure 7B). The mass spectrum of LAOOH displays a molecular ion $[M-H]^-$ at m/z 311 and the mass spectrum of LA¹⁸O¹⁸OH exhibits an

- (63) Gatti, R. M.; Alvarez, B.; Vázquez-Vivar, J.; Radi, R.; Augusto, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *349*, 36–46.
 (64) Merényi, G.; Lind, J.; Goldstein, S.; Czapski, G. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 712–713.
 (65) Coddington, J. W.; Hurst, J. K.; Lyman, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2438–2443.
 (66) Denicola, A.; Souza, J. M.; Gatti, R. M.; Augusto, O.; Radi, R. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19*, 11–19.
 (67) Aubry, J. M.; Cazin, B. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013–2014.
 (68) Aubry, J. M. In *Membrane Lipid Oxidation*; Vigo-Pelfrey, C., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1991; pp 65–102.

- (69) Martinez, G. R.; Di Mascio, P.; Bonini, M. G.; Augusto, O.; Briviba, K.; Sies, H.; Maurer, P.; Röthlisberger, U.; Herold, S.; Koppenol, W. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 10 307–10 312.

Figure 6. Amount of DPAO₂ detected in the reaction of LAOOH and ONOO⁻ in a biphasic system. LAOOH (50 mM) in chloroform and D₂O (1:1, v/v) was incubated with 50 mM peroxyntirite in the presence of 60 mM DPA under mixing at 37 °C for 1 h. An aliquot of the chloroform phase was dried under a nitrogen stream, dissolved in acetone: acetonitrile (1:5, v/v) solution and analyzed by HPLC.

intense ion peak at m/z 315, corresponding to the labeled hydroperoxide molecular ion $[M-H]^-$. The increase by four atomic mass units (amu) for the molecular ion of LA¹⁸O¹⁸OH indicates that two atoms of ¹⁸O were successfully incorporated into the hydroperoxide. The detection of the ion peak at m/z 311 (LA¹⁶O¹⁶OH) demonstrates that LA¹⁸O¹⁸OH is 90% pure.

Labeled O₂ (¹Δ_g) (¹⁸[O₂ (¹Δ_g)] generated through the reaction of LA¹⁸O¹⁸OH and peroxyntirite was chemically trapped with 9,10-diphenylanthracene (DPA) generating the corresponding labeled endoperoxide (DPA¹⁸O¹⁸O) (eq 7) and detected by HPLC–MS/MS in the MRM mode (Figure 7C). The tandem mass spectra (MS2 full scan) of the labeled endoperoxide was recorded, by selecting in the first analyzer (MS1) the molecular ion of DPA¹⁸O¹⁸O at m/z 367 (Figure 7D). As expected the endoperoxide showed an intense fragment ion at m/z 330 corresponding to the loss of one labeled oxygen molecule.

The generation of DPA¹⁸O¹⁸O in the incubation of LA¹⁸O¹⁸OH with peroxyntirite clearly demonstrated the formation of ¹⁸[O₂ (¹Δ_g)] that probably occurs via the combination of ¹⁸O-labeled peroxy radical of linoleic acid (LA¹⁸O¹⁸O•). According to Russell's mechanism, the bimolecular reaction of LA¹⁸O¹⁸O• would generate O₂ (¹Δ_g) containing 18-oxygen atoms. Besides the oxygen production, the decomposition products arising from the Russell mechanism, ketone and alcohol were also characterized by HPLC mass spectrometry (not shown).

Oxygen-18 tracer studies with mass spectrometry^{70,71} and electron spin resonance spectroscopy,⁷² using various ¹⁸O-labeled and unlabeled peroxy radicals containing or not the α-hydrogen, demonstrated that evolution of oxygen occurs during the interaction between the radicals via head to head mechanism. Furthermore, the oxygen evolved from the self-reaction of primary, secondary, and tertiary alkylperoxy radicals involves a head to head interaction between two radicals instead of a head to tail reaction. However, they have not found whether the oxygen generated in this reaction was in the singlet state.

Considering the products detected here (O₂ (¹Δ_g), ketone and alcohol), the interaction of two linoleic acid peroxy radicals is most likely to occur by a head to head mechanism, as proposed by Russell.

Singlet Oxygen Formation. Peroxyntirite (ONOO⁻) and its conjugated acid (ONOOH, pK_a = 6.8) are strong oxidizing agents. Peroxyntirous acid is a powerful oxidizing agent with estimated one and two-electron reduction potentials of E° (ONOOH, H⁺/NO₂, H₂O) = 1.6–1.7 V and E° (ONOOH, H⁺/

NO₂⁻, H₂O) = 1.3–1.4 V, respectively.⁷³ In addition, it is reported that, upon protonation, ONOO⁻ can undergo decomposition via homolytic O–O cleavage to generate nitrogen dioxide radical (•NO₂) and hydroxyl radical (•OH) in approximately 30% yields (eq 8 and 9).^{63–65} At physiological conditions where normally the concentration of bicarbonate is high, ONOO⁻ reacts rapidly with CO₂ ($k = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) forming an unstable nitrosoperoxycarbonate anion adduct (ONOOCO₂⁻), which decomposes giving carbonate radical anion (CO₃^{•-}) and •NO₂ in approximately 35% yields (eq 10).^{51,74–76} All of these radical species generated from peroxyntirite are highly oxidizing agents. Hydroxyl radical is considered to be one of the most powerful oxidants, with E° (•OH, H⁺/H₂O) = 2.31 V at pH 7.0⁷⁷ reacting rapidly with most organic compounds ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). It is well-known that •OH stimulates lipid peroxidation by H• abstraction from unsaturated fatty acids. The carbonate radical anion has also a high reduction potential which is close to that of •OH at pH 7.0, E° (CO₃^{•-}/CO₃²⁻) = 1.78 V, and therefore being capable of oxidizing a variety of bimolecules.^{78,79} Indeed CO₃^{•-} is reported to react with thiols by one-electron oxidation mechanism generating thiol-derived radicals.⁷⁹ The nitrogen dioxide radical is also a moderately potent oxidant ($E^{\circ} = 0.99 \text{ V}$) capable of reacting by hydrogen atom abstraction as well.^{75,78,80} On the other hand, the standard reduction potential calculated for ROO•/ROOH is approximately 1.0 V.⁸¹ Considering this information, it is thermodynamically probable that the reaction of ONOO⁻ with lipid hydroperoxides generates peroxy radicals. Therefore, we can expect that LAOO• are produced by one-electron oxidation of LAOOH mediated by •OH (eq 11) and CO₃^{•-} (eq 12).

The peroxy radicals formed, combine via a tetraoxide intermediate, as proposed by Russell, which decomposes generating O₂ (¹Δ_g) and the corresponding alcohol and a ketone (eq 13 and Scheme 1A). Alternatively, the tetraoxide intermediate can also decompose, generating a triplet ketone in the excited state (LAO*, Scheme 1B), which produces O₂ (¹Δ_g) by energy transfer to the ground-state oxygen (eq 14)

(70) Bartlett, P. D.; Traylor, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2407–2410.

(71) Traylor, T. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2411–2413.

(72) Bennett, J. E.; Howard, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4008–4010.

(73) Koppenol, W. V.; Kissner, R. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 87–90.

(74) Merényi, G.; Lind, J. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1216–1220.

(75) Lymar, S. V.; Hurst, J. K. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 294–301.

(76) Lymar, S. V.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8867–8868.

(77) Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ishiropoulos, H.; Beckman, J. S. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 834–842.

(78) Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C. X.; Menezes, S. L. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 841–859.

(79) Bonini, M. G.; Augusto, O. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9749–9754.

(80) Pryor, W. A.; Lightsey, J. W. *Science* **1981**, *214*, 435–437.

(81) Koppenol, W. H. *FEBS Lett.* **1990**, *264*, 165–167.

Figure 7. Characterization of labeled O_2 ($^1\Delta_g$) produced in the reaction of $LA^{18}O^{18}OH$ and peroxynitrite, by chemical trapping with DPA. $LA^{18}O^{18}OH$ and ^{18}O -labeled DPA endoperoxide ($DPA^{18}O^{18}O$) were detected by HPLC coupled to tandem mass spectrometry: mass spectrum of (A) the unlabeled $LA^{16}O^{16}OH$ and (B) ^{18}O -labeled LAOOH ($LA^{18}O^{18}OH$); C, chromatogram of the corresponding ^{18}O -labeled DPA endoperoxide by HPLC coupled to tandem mass spectrometry in the MRM mode ($DPA^{18}O^{18}O$, m/z 367→330); and D, MS2 full scan acquired by selecting in the first analyzer the ion with m/z = 367. $LA^{18}O^{18}OH$ (100 mM) was injected (final concentration, 13 mM) in 100 mM peroxynitrite and 60 mM of DPA in D_2O :chloroform (1:1, v/v) under mixing at 37 °C, final pH 11.

Conclusions

Taken together, these novel observations serve as important evidence of O_2 ($^1\Delta_g$) production in the reaction of LAOOH and peroxynitrite. Inspired by common chemical features shared by the Russell mechanism²³ and the reaction system studied here, we envisage an O_2 ($^1\Delta_g$) formation mechanism via the intermediate tetraoxide-configuration, involving two molecules of LAOO• (eq 13 or 14). This is an additional reaction involved in the process of lipid peroxidation, providing further insights into the potential involvement of O_2 ($^1\Delta_g$) in oxidative reactions mediated by peroxynitrite in biological systems.

Acknowledgment. This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq—Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PRONEX/FINEP—Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, Pró-Reitoria de Pesquisa da USP—University of São Paulo, and the Fundo Bunka de Pesquisa Banco Sumitomo Mitsui. We are deeply indebted to Clécio F. Klitzke for his contribution to the mass spectrometry analyses. A.P.B.M. is a recipient of CNPq fellowship. S.M. and G.R.M. are recipients of FAPESP fellowships.

JA029262M

Energy Transfer between Singlet ($^1\Delta_g$) and Triplet ($^3\Sigma_g^-$) Molecular Oxygen in Aqueous SolutionGlaucia R. Martinez,[†] Jean-Luc Ravanat,[‡] Jean Cadet,[‡] Sayuri Miyamoto,[†]
Marisa H. G. Medeiros,[†] and Paolo Di Mascio^{*,†}*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, CEP 05513-970, Bloco 12 sala 1223, São Paulo, Brazil, and Laboratoire "Lésions des Acides Nucléiques", SCIB, DRFMC, CEA Grenoble, 17 Avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France*

Received October 17, 2003; E-mail: pdmascio@iq.usp.br

Singlet oxygen in its first excited state, denoted as $O_2(^1\Delta_g)$, can be produced by type II photosensitization reaction¹ and chemically in the reaction of hydrogen peroxide with hypochlorite² or peroxy-nitrite,³ in the self-reaction of peroxy radicals by the Russell mechanism,⁴ and through decomposition of dioxetanes⁵ and endoperoxides.⁶ $O_2(^1\Delta_g)$ is also generated enzymatically by peroxidases and oxidases.⁷ The presence of a pair of electrons with opposite spins in the highest occupied molecular orbital confers dienophile features to $O_2(^1\Delta_g)$ that explain its substantial reactivity toward electron-rich organic molecules, particularly with those exhibiting conjugated double bonds.⁸

We have recently synthesized the water-soluble ^{18}O -labeled endoperoxide of *N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalene dipropanamide (DHPN $^{18}O_2$).⁹ Thermal decomposition of the endoperoxide DHPN $^{18}O_2$ generates high yields of ^{18}O -labeled singlet oxygen [$^{18}O_2(^1\Delta_g)$] (Scheme 1). Oxidation products thus formed in the presence of such a generator of $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ should be labeled with at least one ^{18}O atom. Therefore, a mass spectrometry-based approach could be used to detect labeled products. Using electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS), we have shown that $O_2(^1\Delta_g)$ is able to react directly with cellular DNA to produce [^{18}O]-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine ([^{18}O]-8-oxodGuo).¹⁰ In addition, the labeled endoperoxide was successfully used to study the reaction of $O_2(^1\Delta_g)$ with 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) inserted into oligodeoxynucleotides¹¹ or as free nucleoside in aqueous solution.¹²

Jones and Bayes¹³ had demonstrated that, in the gas phase, $O_2(^1\Delta_g)$ is able to transfer energy to $^{18}O_2$ in the ground state ($^3\Sigma_g^-$) with subsequent conversion of the latter species into its singlet excited state ($^1\Delta_g$). For this purpose, $O_2(^1\Delta_g)$ was generated by gaseous discharge, and the gas in the flow system was sampled through a Pyrex pinhole into a quadrupole mass spectrometer equipped with an argon resonance lamp as the photoionization device. The argon resonance radiation (11.83, 11.62 eV) ionizes $O_2(^1\Delta_g)$ but not $O_2(^3\Sigma_g^-)$. Energy transfer to introduced $^{18}O_2(^3\Sigma_g^-)$ was found to be an extremely fast process ($\sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) that occurs at least once in every 10 hard sphere collisions. It may be added that this does not involve atomic rearrangement.

We report in the present communication that such an energy transfer reaction may also occur in aqueous solution. This is inferred from the results of incubation experiments involving DHPN $^{18}O_2$ as a chemical generator of $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ and the water soluble disodium salt of anthracene-9,10-diyldiethyl disulfate (EAS) as a chemical trap of singlet oxygen. The products of the reaction (Scheme 1) were analyzed by ESI-MS measurement at the output of an HPLC column (see Supporting Information).

Scheme 1. Chemical Structure of DHPN and EAS and Related Endoperoxides^a

^a Thermal decomposition of DHPN $^{18}O_2$ generates $^{18}O_2(^1\Delta_g)$, which is trapped by EAS to form the stable ^{18}O -labeled anthracene endoperoxide EAS $^{18}O_2$.

Interestingly, both labeled (EAS $^{18}O_2$) and unlabeled (EAS $^{16}O_2$) anthracene endoperoxides were detected when EAS was incubated in the presence of DHPN $^{18}O_2$ (Figure 1). The mass spectrum of the anthracene endoperoxide, in the negative ionization mode, exhibits two ions of similar intensity, one at $m/z = 228$ corresponding to the doubly charged unlabeled EAS $^{16}O_2$ molecule and another one at $m/z = 230$ that corresponds to the doubly charged labeled EAS $^{18}O_2$ molecule (Figure 1A). The presence of high amounts of unlabeled endoperoxide was not expected since the isotopic enrichment of DHPN $^{18}O_2$ was almost 100% (see Supporting Information). Such a result suggests that unlabeled $O_2(^1\Delta_g)$ is produced under the latter conditions. The experiments were performed in the dark, ruling out the possibility for the formation of unlabeled $O_2(^1\Delta_g)$ by a photosensitization reaction. The ratio EAS $^{18}O_2$ /EAS $^{16}O_2$ was found to be dependent on the presence of $O_2(^3\Sigma_g^-)$ into the solution. Purging the solution of EAS with N_2 prior to DHPN $^{18}O_2$ addition was found to significantly reduce the formation of unlabeled EAS $^{16}O_2$ (Figure 1B). In contrast, saturation of the EAS solution with $O_2(^3\Sigma_g^-)$ prior to addition of DHPN $^{18}O_2$ gave rise to an increase in the relative formation of unlabeled endoperoxide EAS $^{16}O_2$ (Figure 1C). The ratios between labeled and unlabeled anthracene endoperoxides EAS $^{18}O_2$ /EAS $^{16}O_2$ that were determined in the conditions described above are reported in Figure 2. Furthermore, using the efficient freezing and thawing method to remove O_2 from the solution, the amount of EAS $^{18}O_2$ reached a 95% level (see Supporting Information).

Such an observation could be interpreted by an energy transfer process from $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ to $^{16}O_2(^3\Sigma_g^-)$, generating $^{16}O_2(^1\Delta_g)$ according to eq 1.

[†] Universidade de São Paulo.[‡] CEA Grenoble.

Figure 1. ESI mass spectrometry analysis of EAS¹⁶O₂ and EAS¹⁸O₂ under various incubation conditions performed at 37 °C. (A) Reaction involving DHPN¹⁸O₂ in aqueous solution equilibrated with air. (B) Reaction involving DHPN¹⁸O₂ after bubbling N₂ for 15 min in an ice bath. (C) Reaction involving DHPN¹⁸O₂ after bubbling O₂ for 15 min in an ice bath. (D) Reaction involving DHPN¹⁶O₂ after saturating the solution with ¹⁸O₂.

Figure 2. Variations of EAS¹⁸O₂/EAS¹⁶O₂ ratios measured upon incubation of EAS with DHPN¹⁸O₂ under different oxygenation conditions. (i) Solution equilibrated with air, (ii) N₂ bubbling before incubation, and (iii) O₂ bubbling before incubation.

Another experiment was performed to confirm the occurrence of an energy transfer process. An aqueous solution of EAS was saturated with ¹⁸O₂ (³Σ_g⁻) prior to incubation with DHPN¹⁶O₂, a source of unlabeled ¹⁶O₂ (¹Δ_g). The ESI mass spectrum of the anthracene derivative obtained under these conditions is reported in Figure 1D. EAS¹⁸O₂ was clearly produced, suggesting a transient formation of ¹⁸O₂ (¹Δ_g). It may be also noted that the ratio EAS¹⁸O₂/EAS¹⁶O₂ increases when the concentration of DHPN¹⁸O₂ increases (see Supporting Information). This could be explained by the generation of high amounts of ¹⁸O₂ (¹Δ_g) due to decomposition of the labeled endoperoxide. Therefore, the solution becomes saturated with labeled oxygen and the importance of eq 1 is minimized.

The data presented herein help to explain previously reported results, where the formation of unlabeled products was detected, although the O₂ (¹Δ_g) generator was completely labeled. A relevant example¹¹ concerns the reaction of O₂ (¹Δ_g) with 8-oxoGua residue inserted into short oligodeoxynucleotides that has been shown to

lead to the almost quantitative formation of oxaluric acid. To unambiguously demonstrate the participation of O₂ (¹Δ_g) in the oxidation reaction, DHPN¹⁸O₂ has been used as a chemical generator of ¹⁸O₂ (¹Δ_g). Interestingly, the oxidation products that were analyzed by HPLC-MS/MS were found to have incorporated one oxygen-18 atom, confirming the addition of ¹⁸O₂ (¹Δ_g) to the 8-oxoGua. However, while the isotopic purity of the DHPN¹⁸O₂ used in that study was 95%, unlabeled products were significantly formed (up to 50%). The reason for the presence of unlabeled oxaluric acid was unclear, and a possible oxygen exchange between water and a reaction intermediate was proposed to explain the formation of unlabeled oligodeoxynucleotides. The latter results may now be reinterpreted in light of the present findings. Thus, the formation of the unlabeled oxaluric acid derivative is likely to be accounted for the generation of unlabeled O₂ (¹Δ_g) through an energy transfer process between ¹⁸O₂ (¹Δ_g) and ¹⁶O₂ (³Σ_g⁻) (eq 1).

Interestingly, occurrence of eq 1 was not observed in vivo conditions. Thus, incubation of cells in the presence of DHPN¹⁸O₂ was found to produce almost exclusively [¹⁸O]-8-oxoGua.^{10,14} This may be explained by the low cellular concentration of molecular oxygen that minimizes the importance of eq 1.

Acknowledgment. Supported by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”, FAPESP (Brazil) and the “Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, CNPq (Brazil). G.R.M. and S.M. are recipients of FAPESP fellowships.

Supporting Information Available: ESI mass spectrum of DHPN¹⁸O₂ and HPLC-MS conditions of the analysis of EAS¹⁸O₂ and EAS¹⁶O₂ (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- (2) Held, A. M.; Halko, D. J.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5732.
- (3) (a) Di Mascio, P.; Bechara, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Briviba, K.; Sies, H. *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 287. (b) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Martins, A. P. B.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4510.
- (4) (a) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871. (b) Howard, J. A.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1057–1058. (c) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172.
- (5) Briviba, K.; Saha-Möller, C. R.; Adam, W.; Sies, H. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 647.
- (6) Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 3.
- (7) Cilento, G. In *Chemical and Biological Generation of Excited States*; Adam, W.; Cilento, G., Eds.; Academic Press: New York, 1982.
- (8) Frimer, A. A. *Singlet O₂*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1985; Vols. I and II.
- (9) Martinez, G. R.; Ravanat, J.-L.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10212.
- (10) Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40601.
- (11) Duarte, V.; Gasparutto, D.; Yamaguchi, L. F.; Ravanat, J.-L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12622.
- (12) Martinez, G. R.; Ravanat, J.-L.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; Di Mascio, P. *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 607.
- (13) Jones, I. T. N.; Bayes, K. D. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 1003.
- (14) Ravanat, J. L.; Douki, T.; Duez, P.; Gremaud, E.; Herbert, K.; Hofer, T.; Lasserre, L.; Saint-Pierre, C.; Favier, A.; Cadet, J. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1911–1918.

JA039111Z

^{18}O -Labeled lipid hydroperoxides and HPLC coupled to mass spectrometry as valuable tools for studying the generation of singlet oxygen in biological system

Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez, Ana Paula B. Martins, Marisa H.G. Medeiros and Paolo Di Mascio*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP26077, CEP 05513-970, São Paulo, SP, Brazil

Abstract. Decomposition of lipid hydroperoxides (LOOH) is known to generate toxic products capable to induce tissue injury. We have recently confirmed that decomposition of LOOH into peroxy radicals is a potential source of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in biological system. Using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) in the presence of Ce^{4+} or Fe^{2+} , we observed the formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$) by chemical trapping of $^1\text{O}_2$ with 9,10-diphenylanthracene (DPA) and detecting the corresponding ^{18}O -labeled DPA endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) by HPLC coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). ^{18}O -Labeled alcohol and ketone were also detected providing further evidence for the generation of $^1\text{O}_2$ by the Russell mechanism. Similarly the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with peroxynitrite also generated $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$. In conclusion, these results indicate that the use of ^{18}O -labeled LOOH associated with HPLC-MS/MS can be a useful tool to clarify mechanistic features involved in the reaction of LOOH in biological media.

Keywords: Linoleic acid hydroperoxide, singlet oxygen, HPLC-MS/MS, ^{18}O -labeled hydroperoxide

1. Introduction

Lipid hydroperoxides (LOOH) are potentially toxic compounds generated as primary products of lipid peroxidation [1]. Despite their relative stability in organic solutions, LOOH are easily decomposed by metal ions, generating peroxy ($\text{LOO}^\bullet$) and/or alkoxyl radicals ($\text{LO}^\bullet$). An interesting feature of the $\text{LOO}^\bullet$ chemistry is the generation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) through the mechanism proposed by Russell [2,3]. According to this mechanism, two peroxy radicals react through the formation of a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate that decomposes to give an alcohol, ketone and molecular oxygen.

With the aim to clarify the mechanism of $^1\text{O}_2$ generation from LOOH we used ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) and HPLC tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) as mechanistic tools. We report here, the synthesis of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and characterization of labeled products by HPLC-MS/MS. In addition, we demonstrated the generation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$) in the

*Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3815 (ext. 224); Fax: +55 11 38155579; E-mail: pdmascio@iq.usp.br.

Fig. 1. Scheme illustrating the generation of $^{18}[\text{O}_2]$ in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with Ce^{4+} , Fe^{2+} or ONOO^- , following the mechanism proposed by Russell. A. ESI-MS of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. B. Chemical trapping of $^{18}[\text{O}_2]$ by DPA yielding $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$. C. Near-infrared spectrum of $^1\text{O}_2$.

reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with metal ions or peroxyxynitrite by using 9,10-diphenylanthracene (DPA) as the chemical trap for $^1\text{O}_2$ and analysis of the corresponding DPA endoperoxide containing labeled oxygen ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) by HPLC-MS/MS. Moreover, the generation of $^1\text{O}_2$ was unequivocally demonstrated by the direct spectral characterization of the near-infrared light emission. A summary of this work is illustrated in Fig. 1.

2. Material and methods

2.1. Materials

$\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ was synthesized by photooxidation of LA under an $^{18}\text{O}_2$ -saturated atmosphere [4,5]. Peroxyxynitrite was synthesized from NaNO_2 and H_2O_2 in a quenched-flow reactor, and MnO_2 was used to eliminate excess H_2O_2 [6].

2.2. Incubations of LAOOH or $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ in the presence of DPA

LAOOH (50 mM) was incubated with Ce^{4+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} or Fe^{3+} /ascorbate (AsA) (50 mM) and DPA (60 mM) in D_2O :chloroform (1:1, v/v), under vigorous mixing at 37°C , as described previously [4].

2.3. HPLC-MS/MS

$\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, LA^{18}OH and LA^{18}O were analyzed by HPLC-MS/MS in the negative electrospray ionization mode (ESI-) and $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ were quantified using DBA, as an internal standard, by atmospheric pressure chemical ionization in the positive ion mode [4].

2.4. Singlet oxygen light emission in the infrared region

The $^1\text{O}_2$ monomol light emission kinetics and spectrum were measured with a special photocounting apparatus developed in our laboratory [4,5].

3. Results and discussion

3.1. ESI-MS of LAOOH and $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$

Mass spectra of both LAOOH and $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ showed two intense peaks, one corresponding to the molecular ion ($[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 311 and 315 for LAOOH and $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, respectively) and the other corresponding to the dehydrated product ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ and $[\text{M}-\text{H}_2^{18}\text{O}-\text{H}]^-$, m/z 293 and 295 for LAOOH and $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, respectively). The increase by four atomic mass units (amu) for the molecular ion and two amu for the dehydrated product in the mass spectrum of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ compared to LAOOH indicated that two ^{18}O atoms were successfully incorporated into LA. The detection of only trace amounts of the ion peak at m/z 311 demonstrated that $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ was almost 100% pure (Fig. 1(A)).

The photooxidation of LA is known to generate 4 positional isomers of LAOOH [7]. Further structural information was obtained by analyzing the daughter ions of m/z 315 and m/z 311 (Fig. 2). Collision-induced dissociation of the parent ion ($[\text{M}-\text{H}]^-$) displayed fragments that were indicative of the position of the hydroperoxide. The major daughter ions observed included, the dehydrated product (described above), and the fragments derived from the loss of water followed by cleavage of the double bond allylic to the hydroperoxide. The daughter ions derived from $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ at m/z 115, 155, 185 and 225 were assigned to be from $13\text{-}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, $10\text{-}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, $9\text{-}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and $12\text{-}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, respectively (Fig. 2(A)). Similar daughter ions were observed for LAOOH at m/z 113, 153, 183 and 223 (Fig. 2(B)).

3.2. Generation of $^1\text{O}_2$ in the reaction of LAOOH with Ce^{4+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} or peroxynitrite

Figure 3(A) shows a typical chromatogram for DPAO_2 detection in the reaction of LAOOH with metal ions. The formation of DPAO_2 is clearly observed in the incubation of LAOOH with Fe^{2+} or Ce^{4+} after 1 hour. Figure 3(B) shows the time-course of DPAO_2 formation in the incubation of LAOOH with Ce^{4+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} or $\text{Fe}^{3+}/\text{AsA}$. The reaction of Fe^{3+} with LAOOH was not able to generate DPAO_2 , while the mixture of $\text{Fe}^{3+}/\text{AsA}$ resulted in a time-dependent increase in DPAO_2 , similar to that observed for Fe^{2+} . This is probably due to the fact that Fe^{3+} is not an effective oxidant of hydroperoxides and by the faster rate at which Fe^{2+} decomposes LOOH than Fe^{3+} [8].

Considering that any oxidant capable to generate peroxy radical from LOOH can generate $^1\text{O}_2$ by the Russell mechanism, we have also tested the ability of peroxynitrite to generate $^1\text{O}_2$ from LAOOH. The protonated forms of peroxynitrite, as well as the radicals derived from its decomposition (nitrogen dioxide radical and hydroxyl radical, Eq. (1) are known to be powerful oxidants, capable to react with LAOOH generating $\text{LAOO}^\bullet$. As recently reported, the incubation of LAOOH with peroxynitrite also yielded $^1\text{O}_2$ at amounts close to that observed for Ce^{4+} [5].

Fig. 2. ESI-MS/MS of LA- ^{18}O - ^{18}OH (A) and LAOOH (B). The cone voltage was set to 20 V and collision energy 30 eV. The schemes of major fragments observed are presented for each positional isomer.

3.3. Chemical trapping of $^{18}[^1\text{O}_2]$ by DPA

The $^{18}[^1\text{O}_2]$ generated in the reaction of LA- ^{18}O - ^{18}OH with Ce^{4+} , Fe^{2+} or peroxynitrite was chemically trapped with DPA. Analysis of the products revealed that besides the DPA- ^{18}O - ^{18}O (Fig. 1(B)), two other

Fig. 3. Quantification of DPAO₂ generated in the reaction of LAOOH with cerium or iron. A, Typical chromatogram of DPAO₂ quantification in the incubation of LAOOH with Ce⁴⁺ or Fe²⁺ at 37°C for 1 hour. (a) Control; (b) 50 mM LAOOH; (c) 50 mM LAOOH, 50 mM Fe²⁺; (d) 50 mM LAOOH, 50 mM Ce⁴⁺. B, Time-course of DPAO₂ formation in the reaction of 50 mM LAOOH and 50 mM Ce⁴⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ or Fe³⁺/AsA (1:10). All incubations contained 60 mM DPA.

DPA adduct species were also detected: the unlabeled endoperoxide (DPA ¹⁶O¹⁶O), and endoperoxide with one labeled oxygen (DPA ¹⁸O¹⁶O). The quantification of each endoperoxide showed that 70% of the endoperoxide was DPA ¹⁶O¹⁶O, 13% was DPA ¹⁸O¹⁶O and 18% was DPA ¹⁸O¹⁸O. This result showed many interesting features involved in LOO[•] and ¹O₂ chemistry, which may explain the formation of DPA ¹⁶O¹⁶O and DPA ¹⁸O¹⁶O. Some are listed below:

- Exchange of ¹⁸O-labeled oxygen of LA¹⁸O¹⁸O[•] with the ¹⁶O₂, yielding LA¹⁶O¹⁶O[•] [9].
- Energy transfer from ¹⁸[¹O₂] to ¹⁶O₂ yielding ¹⁶[¹O₂] (Eq. (2)) [10,11].

- Exchange of LA¹⁸O¹⁸OH with water, yielding LA¹⁸O¹⁶OH.

Besides the $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ production, we were also able to characterize ^{18}O -labeled alcohol (LA^{18}OH) and ketone (LA^{18}O) that gave further support for the involvement of Russell mechanism in the generation of $^1\text{O}_2$.

3.4. Light emission of $^1\text{O}_2$ at near-infrared region

Further evidence for $^1\text{O}_2$ generation was obtained by measuring its monomol light emission. An intense emission signal was observed upon injection of the metal ion or peroxyxynitrite into LAOOH solution, indicating that $^1\text{O}_2$ was generated [4,5]. The acquired spectrum showed a maximum intensity at 1270 nm, which confirmed the generation of $^1\text{O}_2$ (Fig. 1(C)).

4. Conclusion

In summary, the detection of $\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ and Ce^{4+} , Fe^{2+} or peroxyxynitrite provides clear evidence for the generation of $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ from $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. Further, the use of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ coupled to the high-resolution HPLC-MS/MS technique, allowed detecting other products containing one or more atoms of ^{18}O in the structure (including alcohols and ketone). These results serve as a strong evidence for the generation of $^1\text{O}_2$ during decomposition of LOOH catalyzed by metal ions or peroxyxynitrite involving the bimolecular interaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ via Russell mechanism.

Acknowledgements

This work was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP), Brazil, “Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), Brazil, “Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência” (PRONEX/FINEP), Brazil, “John Simon Guggenheim Memorial Foundation” (P.D.M. Fellowship), Universidade de São Paulo/Pró-Reitoria de Pesquisa and Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo Mitsui. S. Miyamoto and G.R. Martinez are recipients of FAPESP fellowships.

References

- [1] A.W. Girotti, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.* **39** (1998), 1529–1542.
- [2] G.A. Russell, Deuterium-isotope effects in the autoxidation of alkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.* **79** (1957), 3871–3877.
- [3] J.A. Howard and K.U. Ingold, The self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968), 1057–1058.
- [4] S. Miyamoto, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros and P. Di Mascio, 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** (2003), 6172–6179.
- [5] S. Miyamoto, G.R. Martinez, A.P.B. Martins, M.H.G. Medeiros and P. Di Mascio, Direct evidence of singlet molecular oxygen [$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxyxynitrite, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003), 4510–4517.
- [6] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall and B. Freeman, Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990), 1620–1624.

- [7] J. Terao and S. Matsushita, Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54** (1977), 234–238.
- [8] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease, *Methods Enzymol.* **186** (1990), 1–85.
- [9] H.W.-S. Chan, G. Levett and J.A. Matthew, The mechanism of rearrangement of linoleate hydroperoxides, *Chem. Phys. Lipids* **24** (1979), 245–256.
- [10] I.T.N. Jones and K.D. Bayes, Eletronic energy transfer from O-32 (2) (A delta-1(G) to O-36 (2) chi sigma-3(g), *J. Chem. Phys.* **2** (1972), 1003–1004.
- [11] G.R. Martinez, J.L. Ravanat, J. Cadet, S. Miyamoto, M.H.G. Medeiros and P. Di Mascio, Energy transfer between singlet ((1)delta(g)) and triplet ((3)sigma(g)(-)) molecular oxygen in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004), 3056–3057.

Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxy radical intermediates and singlet molecular oxygen

Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez*, Daniel Rettori, Ohara Augusto, Marisa H. G. Medeiros, and Paolo Di Mascio†

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP26077, CEP 05513-970, São Paulo, Brazil

Edited by E. R. Stadtman, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved November 11, 2005 (received for review September 21, 2005)

The reaction of hypochlorous acid (HOCl) with hydrogen peroxide is known to generate stoichiometric amounts of singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$]. This study shows that HOCl can also react with linoleic acid hydroperoxide (LAOOH), generating $O_2(^1\Delta_g)$ with a yield of $13 \pm 2\%$ at physiological pH. Characteristic light emission at 1,270 nm, corresponding to $O_2(^1\Delta_g)$ monomolecular decay, was observed when HOCl was reacted with LAOOH or with liposomes containing phosphatidylcholine hydroperoxides, but not with cumene hydroperoxide or *tert*-butyl hydroperoxide. The generation of $O_2(^1\Delta_g)$ was confirmed by the acquisition of the spectrum of the light emitted in the near-infrared region showing a band with maximum intensity at 1,270 nm and by the observation of the enhancing effect of deuterium oxide and the quenching effect of sodium azide. Mechanistic studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($LA^{18}O^{18}OH$) showed that its reaction with HOCl yields ^{18}O -labeled $O_2(^1\Delta_g)$ [$^{18}O_2(^1\Delta_g)$], demonstrating that the oxygen atoms in $O_2(^1\Delta_g)$ are derived from the hydroperoxide group. Direct analysis of radical intermediates in the reaction of LAOOH with HOCl by continuous-flow electron paramagnetic resonance spectroscopy showed a doublet signal with a *g*-value of 2.014 and a hyperfine coupling constant from the α -hydrogen of $a_H = 4.3$ G, indicating the formation of peroxy radicals. Taken together, our results clearly demonstrate that HOCl reacts with biologically relevant lipid hydroperoxides, generating $O_2(^1\Delta_g)$. In addition, the detection of $^{18}O_2(^1\Delta_g)$ and peroxy radicals strongly supports the involvement of a Russell mechanism in the generation of $O_2(^1\Delta_g)$.

lipid hydroperoxides | mass spectrometry | myeloperoxidase | near-infrared emission | ^{18}O -labeled oxygen

Hypochlorous acid (HOCl) is a potent oxidant generated in neutrophils by the reaction of chloride ion with hydrogen peroxide (Eq. 1) catalyzed by myeloperoxidase (MPO) (1–4). This heme enzyme is stored at high concentrations in the granules of phagocytic cells (neutrophils and monocytes), and, upon stimulation, it is secreted into both the extracellular milieu and the phagocytic vacuole (3). It is believed that the generation of HOCl by this system constitutes an important defense mechanism against microorganisms (3, 4). However, excessive production of HOCl can also lead to host tissue injury (5), contributing to the development of several diseases, such as atherosclerosis (6, 7) and cancer (8).

At physiological pH, HOCl is in equilibrium with its conjugate base, hypochlorite (OCl^- , pK_a 7.4 at 25°C) (9), (Eq. 2), and both forms appear to be responsible for the oxidation and/or halogenation reactions. It has also been demonstrated that, at acidic conditions, HOCl can be in equilibrium with molecular chlorine (Cl_2 , pK_a 3.3) (10) through a reaction that requires Cl^- and H^+ (Eq. 3) (11). *In vitro* studies suggest that Cl_2 might be the chlorinating

agent that mediates the formation of chlorinated products during phagocytosis (11–13).

HOCl is a highly reactive species capable of modifying a variety of biomolecules (5). Free amino and thiol groups of amino acids and peptides constitute important targets for HOCl, yielding unstable chloramines and sulfenyl chloride intermediates, respectively (14–16). Chloramine intermediates are also detected in the reaction of HOCl with exocyclic (RNH_2) and heterocyclic ($RNHR$) amine functions in DNA bases (14, 17). HOCl reacts with aromatic rings, such as in tyrosine, yielding 3-chlorotyrosine and 3,5-dichlorotyrosine (5, 18, 19). These products have been detected in proteins exposed to MPO or stimulated neutrophils (20) and in low-density lipoprotein isolated from atherosclerotic lesions (19).

Another important target for HOCl is lipids. It is known that HOCl adds across the carbon–carbon double bonds in fatty acids and cholesterol, yielding chlorohydrins (6, 21, 22). HOCl has been shown to induce lipid peroxidation (23). Several groups have detected accumulation of lipid-peroxidation products in liposomes and lipoproteins after incubation with HOCl or MPO- H_2O_2 - Cl^- system (24–26). However, the mechanism by which HOCl induces lipid peroxidation remains unclear. The Panasenkov group (23, 26, 27) postulated that the presence of lipid hydroperoxides is critical for the initiation of lipid peroxidation in these systems. They have proposed that the reaction of HOCl with lipid hydroperoxides yields free radicals able to cause further oxidation of lipid molecules (27).

It is well known that HOCl reacts with hydrogen peroxide, yielding stoichiometric amounts of singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] (Eq. 4) (28–30). However, little is known about the reaction of HOCl with other biologically relevant hydroperoxides, such as lipid hydroperoxides, which are the primary products of lipid peroxidation and are also generated in lipoxygenase- and cyclooxygenase-catalyzed reactions (31).

The aim of this study was to investigate whether $O_2(^1\Delta_g)$ can be generated during the reaction of HOCl with lipid hydroperoxides. We have used hydroperoxides derived from linoleic acid

Conflict of interest statement: No conflicts declared.

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: EAS, anthracene-9,10-diyl-diethyl sulfate; EPR, electron paramagnetic resonance spectroscopy; HOCl, hypochlorous acid; LA, linoleic acid; LAOOH, LA hydroperoxide; $O_2(^1\Delta_g)$, singlet molecular oxygen; PCOOH, phosphatidylcholine hydroperoxide; MPO, myeloperoxidase; *t*-BuOOH, *tert*-butylhydroperoxide.

*Present address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: pdmascio@iq.usp.br.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

Fig. 1. Monomol light emission of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of HOCl with different hydroperoxides. Light emission observed upon injection of 0.17 ml of 10 mM HOCl (final concentration, 1 mM) into 1.5 ml of 1 mM H_2O_2 (A), 1 mM LAOOH (B), 1 mM *t*-BuOOH (C), and 1 mM CuOOH (D).

(LAOOH), one of the major fatty acids present in biological systems, and liposomes enriched with phosphatidylcholine hydroperoxides (PCOOH). The generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ was studied by direct spectroscopic detection and characterization of $O_2 (^1\Delta_g)$ monomol emission at the near-infrared region. The reaction mechanism was investigated by measuring the formation of ^{18}O -labeled $O_2 (^1\Delta_g)$ [$^{18}O_2 (^1\Delta_g)$] in the reaction of ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($LA^{18}O^{18}OH$) with HOCl by chemical trapping and mass-spectrometry analysis and of radical intermediates by rapid-mixing continuous-flow electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR).

Results

Singlet Oxygen Generation in the Reaction of HOCl with LAOOH. The generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of HOCl with LAOOH was investigated by monitoring the light emission at 1,270 nm corresponding to $O_2 (^1\Delta_g)$ monomolecular decay ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) (Eq. 5). For comparison, the light emission for the reaction of HOCl with other hydroperoxides, such as H_2O_2 , cumene hydroperoxide (CuOOH), and *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) were also studied (Fig. 1). As expected, an intense light emission was observed upon injection of HOCl (final concentration, 1 mM) into a solution of H_2O_2 (1 mM prepared in D_2O), consistent with the stoichiometric generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in this reaction (Fig. 1A) (28–30). Similarly, the injection of HOCl (final concentration, 1 mM) into a solution of LAOOH (1 mM solubilized in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, in D_2O) also produced a rapid increase in light emission whose intensity was ≈ 30 times lower compared with the reaction with H_2O_2 (Fig. 1B). In contrast, the injection of HOCl into a solution containing *t*-BuOOH showed a very small light emission (Fig. 1C), and the injection of HOCl into a solution of CuOOH did not yield any light emission (Fig. 1D). These results indicate that the reaction of HOCl with secondary hydroperoxides, such as LAOOH, generates $O_2 (^1\Delta_g)$, whereas the reaction with tertiary hydroperoxides does not yield $O_2 (^1\Delta_g)$. The small emission signal observed upon reaction of HOCl with *t*-BuOOH is probably due to contaminant H_2O_2 normally present in commercial *t*-BuOOH.

The amount of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of HOCl with LAOOH was estimated by the integration of the light-emission signal at 1,270 nm by using DHPNO₂, a water-soluble $O_2 (^1\Delta_g)$

Fig. 2. Monomol light-emission spectrum of $O_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of HOCl with LAOOH (A) and H_2O_2 (B).

generator, as a reference (see Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site). When 1 mM of LAOOH was reacted with various concentrations of HOCl, a concentration-dependent increase in the amount of $O_2 (^1\Delta_g)$ was observed from 0.2 to 2.0 mM HOCl, reaching a plateau >2.0 mM (see Fig. 9, which is published as supporting information on the PNAS web site). The maximum concentration of $O_2 (^1\Delta_g)$ at the plateau was $133 \pm 16 \mu M$, which corresponds to a yield of $13 \pm 2\%$ of $O_2 (^1\Delta_g)$.

Singlet-Oxygen Spectrum in the Near-Infrared Region. The generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with LAOOH was also confirmed by recording the spectrum of the light emitted in the near-infrared region (Fig. 2A). For comparative purposes, the spectrum of the $O_2 (^1\Delta_g)$ generated by H_2O_2 with HOCl was also acquired (Fig. 2B). Both spectra showed an emission band with maximum intensity at 1,270 nm, characteristic of $O_2 (^1\Delta_g)$ monomolecular decay. Further evidences that the light emitted in the reaction corresponds to $O_2 (^1\Delta_g)$ were obtained by testing the effect of nondeuterated vs. deuterated solvent and the effect of NaN_3 , a known $O_2 (^1\Delta_g)$ quencher (32) (see Fig. 10, which is published as supporting information on the PNAS web site). The intensity of the light emitted in the reaction in 100% D_2O was about eight times higher than in the reaction in 12% D_2O , consistent with the longer lifetime of $O_2 (^1\Delta_g)$ in D_2O than in H_2O (33, 34) (Fig. 10A). The quenching effect of 1 mM of NaN_3 (75% inhibition) on the chemiluminescent reaction of HOCl with LAOOH was also observed (Fig. 10B).

Light-Emission Measurements in the Reaction of HOCl with Linoleic Acid (LA) or Hydroxy Linoleate (LAOH). To assess whether the hydroperoxyl group of LA is essential for the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$, we have performed experiments with LA and LAOH (see Fig. 11, which is published as supporting information on the PNAS web site). No emission was observed when HOCl was injected into a solution containing LA, whereas a small emission was observed in the reaction of HOCl with LAOH. Analysis by mass spectrometry showed that this emission is due to the presence of 10% residual LAOOH in the solution of LAOH (see Fig. 12, which is published as supporting information on the PNAS web site).

Effect of pH on Singlet-Oxygen Generation in the Reaction of HOCl with LAOOH. The generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of H_2O_2 with HOCl is known to vary with pH, showing higher yields at alkaline pH (29). To check whether a similar pH profile is also observed in the reaction of LAOOH with HOCl, we have measured the light emission during the injection of HOCl into a solution containing LAOOH dispersed in phosphate buffer at various pHs (Fig. 3). The light emission was very intense at pH 7.4 and pH 8.0, decreasing at

Fig. 3. Effect of pH on O_2 ($^1\Delta_g$) generation in the reaction of LAOOH with HOCl. Reaction was initiated by injection of 0.17 ml of 10 mM HOCl (final concentration, 1 mM) into 1.5 ml of 1 mM LAOOH solution in 0.1 M phosphate buffer prepared in D_2O at the following pHs 6.0, 7.0, 7.4, 8.0, and 9.0.

Singlet-Oxygen Generation upon Reaction of HOCl with Phospholipid Hydroperoxides in Liposomes. To investigate whether HOCl can also interact with lipid hydroperoxides present in membranes, we have done experiments with unilamellar liposomes containing different concentrations of PCOOH. The presence of increasing amounts of PCOOH in the membrane led to an almost linear increase in the intensity of the light emitted upon injection of HOCl (Fig. 4). Interestingly, the estimated yield of $O_2 (^1\Delta_g)$ was augmented at higher concentrations of PCOOH in the membrane. This result shows that the HOCl can also react with phospholipid hydroperoxides present in membranes to generate $O_2 (^1\Delta_g)$.

Fig. 4. Monomer light emission of $O_2(^1\Delta_g)$ observed during injection of HOCl into PC liposomes containing different concentrations of PCOOH. (A) Light emission monitored during injection of 0.17 ml of 100 mM HOCl (final concentration 10 mM) into 1.5 ml of 1 mM PC vesicles containing 0, 10, 20, or 50% PCOOH. (B) The amount of $O_2(^1\Delta_g)$ calculated by integration of the area under emission signal. The percentages indicate the yield of $O_2(^1\Delta_g)$.

Fig. 5. Analysis of EAS endoperoxides formed in the reaction of LA¹⁸O¹⁸OH (5 mM) with HOCl (10 mM) in the presence of EAS (8 mM) by HPLC-MS/MS. (A) HPLC chromatogram monitored at UV 215 nm. Mass chromatograms obtained by selecting the ions at *m/z* 228 (B), *m/z* 229 (C), and 230 (D).

Detection of ^{18}O -Labeled Singlet Oxygen in the Reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with HOCl . To characterize the mechanism involved in the generation of O_2 ($^1\Delta_g$) by the reaction of HOCl with LAOOH , we used $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ as a mechanistic tool. Singlet oxygen generated by the reaction of HOCl with LAOOH or $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ was chemically

trapped with the anthracene derivative, anthracene-9,10-diyl-diethyl sulfate (EAS) (Eq. 6) and the corresponding endoperoxides (EAS^xO^xO, $x = 16$ or 18), were detected by HPLC coupled to tandem MS (HPLC–MS/MS), as reported in ref. 35.

The reaction of HOCl with LA¹⁸O¹⁸OH showed the generation of a mixture of three endoperoxides, namely, the completely labeled endoperoxide (EAS¹⁸O¹⁸O), an endoperoxide containing ¹⁸O and ¹⁶O atoms (EAS¹⁶O¹⁸O), and an unlabeled endoperoxide (EAS¹⁶O¹⁶O). Fig. 5 shows the typical chromatograms for EAS¹⁸O¹⁸O analysis by UV and mass detection. Analysis of the products by UV at 215 nm showed a peak corresponding to the endoperoxide at 14.5 min and a peak corresponding to EAS at 19 min. The mass chromatograms obtained by selecting ions with *m/z* 228, 229, and 230 shows the presence of EAS¹⁶O¹⁶O, EAS¹⁶O¹⁸O, and EAS¹⁸O¹⁸O, respectively. The identity of the ions was confirmed by analyzing the mass spectra of the daughter ions derived from each endoperoxide (see Fig. 13, which is published as supporting information on the PNAS web site).

In other studies, we have observed that oxygen affects the detection of $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) generated in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with metal ions (36) or during thermolysis of an ^{18}O -labeled naphthalene endoperoxide (35). To determine whether oxygen interferes in the detection of $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) in this reaction, we have conducted experiments in the presence and absence of oxygen. Fig. 6 shows the relative intensities of the endoperoxides formed in the

Fig. 6. Electrospray ionization (ESI)-MS spectrum of the EAS endoperoxides formed by the reaction of $\text{LA}^x\text{O}^x\text{OH}$ ($x = 16$ or 18) with HOCl. (A) $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ (5 mM) was reacted with 10 mM HOCl in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. (B) $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (5 mM) was reacted with 10 mM HOCl in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 in 85% D_2O , 10% H_2O , and 5% MeOH. (C) Reaction described in B without oxygen.

reaction of HOCl with unlabeled hydroperoxide ($\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$) or with $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$. As expected, the reaction of HOCl with $\text{LA}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$ yielded a prominent ion at m/z 228, corresponding to $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ (Fig. 6A). In contrast, the reaction of HOCl with $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ conducted in the presence of oxygen showed the formation all three endoperoxides, as observed by the presence of ions at m/z 228, 229, and 230 in the proportion of 40:28:32 (Fig. 6B). Removal of the oxygen from the reaction of HOCl with $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ by a repetitive procedure of freezing and thawing under vacuum led to an expressive increase in the amount of $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ and decrease in the amount of $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ and $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ (Fig. 6C). The proportion of $\text{EAS}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, and $\text{EAS}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ detected after removal of oxygen was 21:17:62.

Detection of Peroxyl Radical by Continuous-Flow EPR. As recently confirmed by our group, $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ can be generated by the combination of peroxyl radical, by following the mechanism described by Russell (37). To determine whether a similar type of reaction is involved in the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with LAOOH, we studied whether peroxyl radicals are formed in this reaction. Fig. 7 shows the experimental and simulated EPR spectra acquired for the reaction of HOCl with LAOOH. Continuous infusion of concentrated solutions of LAOOH (final concentration, 14 mM) and HOCl (final concentration, 14 mM) in phosphate buffer, pH 7.4, containing 25% acetonitrile at room temperature produced a broad doublet signal with a distinctive g -value of 2.014 that is characteristic of peroxyl radicals (Fig. 7A) (38–41). The simulated spectrum showed a hyperfine coupling constant of 4.3 G (Fig. 7B), probably due to the interaction of the radical with the allylic hydrogen. A similar coupling constant was observed by Chamulitrat and Mason (41) during the oxidation of arachidonic acid by lipoxygenase. Thus, this result proves that the reaction of HOCl with LAOOH generates peroxyl radicals.

Discussion

It is well established that HOCl reacts with hydrogen peroxide to yield stoichiometric amounts of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ (28–30). Our results show that HOCl can also react with lipid hydroperoxides, such as fatty acid hydroperoxides or phosphatidylcholine hydroperoxides contained in liposomes, to yield $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ at physiological pH. The formation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of HOCl with LAOOH was

Fig. 7. EPR spectrum of linoleate peroxyl radicals. (A) Experimental spectrum obtained during the reaction of HOCl with LAOOH. Spectrometer settings were microwave frequency, 9.650 GHz; microwave power, 10 mW; field-modulation frequency, 100 kHz; field-modulation amplitude, 3 G; receiver gain, 1×10^6 ; time constant, 164 ms; scan rate, 1.2 G s $^{-1}$; number of scans, 1. (B) Computer simulation of spectrum A using the following values: $a\text{H} = 4.3$ G; line width, 2.8 G; center of the spectrum, 3,423 G.

clearly demonstrated by the direct detection and characterization of the $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ monomol emission at 1,270 nm.

The generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ was also tested with tertiary hydroperoxides, $t\text{-BuOOH}$ or Cu-OOH . The reaction of HOCl with these hydroperoxides did not yield $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, suggesting that the presence of a hydrogen- α at the carbon to which the hydroperoxide is attached is essential for the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. The presence of hydrogen- α is known to be critical for the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ by the Russell mechanism (Eq. 7) (37). In this mechanism, primary or secondary peroxyl radicals ($\text{ROO}^\bullet$) react by a cyclic mechanism involving a linear tetraoxide intermediate (ROOOOR) that decomposes to generate a ketone (RO), an alcohol (ROH), and oxygen (36, 37, 42). It has been postulated that this reaction may generate either an electronically excited oxygen molecule (Eq. 7a) or an electronically excited ketone (Eq. 7b). Niu and Mendenhall (43) reported that the yields of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, in the case of simple alkylhydroperoxides, ranged from 3.9% to 14.0%. In contrast, the yields of excited carbonyls were 10^3 to 10^4 lower, suggesting that the self-reaction of peroxyl radical generates predominantly $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$.

The mechanism involved in the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with LAOOH was studied by using ^{18}O -labeled hydroperoxide. The reaction of $LA^{18}O^{18}OH$ with HOCl in the presence of EAS yielded a mixture of endoperoxides containing ^{18}O and/or ^{16}O atoms ($EAS^{16}O^{16}O$, $EAS^{16}O^{18}O$, and $EAS^{18}O^{18}O$). Comparison of the relative amounts of $EAS^{16}O^{16}O/EAS^{16}O^{18}O/EAS^{18}O^{18}O$ detected before and after removal of oxygen showed an expressive increase in the amount of $EAS^{18}O^{18}O$ and decrease in the amount of both $EAS^{16}O^{16}O$ and $EAS^{18}O^{16}O$. These results indicate that oxygen affects the detection of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$. It can be also concluded that the reaction of HOCl with $LA^{18}O^{18}OH$ yields mainly $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ and that the oxygen atoms in the $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ molecule are derived from the hydroperoxide moiety.

The influence of oxygen in the detection of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ may be explained by two mechanisms. One is an energy-transfer mechanism between $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ and $^{16}O_2 (^3\Sigma_g^-)$, yielding $^{16}O_2 (^1\Delta_g)$ and $^{18}O_2 (^3\Sigma_g^-)$, as recently demonstrated for aqueous systems by Martinez *et al.* (35). Another mechanism takes into account the generation of ^{18}O -labeled peroxy radicals ($LA^{18}O^{18}O^{\bullet}$) in the reaction of HOCl with $LA^{18}O^{18}OH$ as precursors of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$. As proposed by Chan (44), the labeled oxygen atoms in $LA^{18}O^{18}O^{\bullet}$ can exchange with the surrounding $^{16}O_2$ yielding unlabeled peroxy radicals ($LA^{16}O^{16}O^{\bullet}$). Accordingly, the formation of $LA^{16}O^{16}O^{\bullet}$ may explain the formation of $^{16}O_2 (^1\Delta_g)$ and the formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ containing a mixture of ^{16}O and ^{18}O atoms, in the presence of oxygen.

On the basis of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ detection in the reaction of HOCl with $LA^{18}O^{18}OH$, we have studied the possible mechanisms involved in its generation. The generation of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ could occur through a mechanism similar to the reaction of HOCl with H_2O_2 . Cahil and Taube (45), using ^{18}O -labeled hydroperoxide ($H^{18}O^{18}OH$), demonstrated that the oxygen atoms in the oxygen molecule generated by the reaction of HOCl with H_2O_2 were completely labeled. The mechanism proposed for this reaction involves a nucleophilic attack of HO_2^- on the chlorine atom of HOCl to form a $[HOO-Cl-OH]^-$ intermediate, which then generates $O_2 (^1\Delta_g)$ by a two-electron transfer (Eq. 8) (29). In analogy, we could suggest the possibility of a nucleophilic attack of $LA^{18}O^{18}O^-$ on HOCl to yield a $[LA^{18}O^{18}O-Cl-OH]$ intermediate that decomposes, generating $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ (Eq. 9). However this mechanism does not explain the requirement of a hydrogen- α in the hydroperoxide structure for the formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ and the detection of $O_2 (^1\Delta_g)$, containing a mixture of ^{16}O and ^{18}O atoms.

An alternative mechanism by which the formation of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of HOCl with $LA^{18}O^{18}OH$ could be explained is the Russell mechanism (Eq. 7) (37). This mechanism requires the generation of ^{18}O -labeled LA peroxy radicals ($LA^{18}O^{18}O^{\bullet}$). Indeed, peroxy-radical intermediates were directly detected in the reaction of HOCl with LAOOH by continuous-flow EPR.

The detection of peroxy radicals, the requirement of a hydrogen- α in the hydroperoxide structure and the $O_2 (^1\Delta_g)$ yield of $13 \pm 2\%$, which is very close to the estimated yield of a Russell mechanism, strongly points to the involvement of the Russell mechanism in the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with LAOOH. However, the formation of peroxy radical by direct one-electron oxidation of LAOOH by HOCl is thermodynamically unfavorable. HOCl is a relatively poor one-electron oxidant, having an estimated one-electron reduction potential at pH 7 (E°) in the range of 0.17–0.25 V (46) and, therefore, not able to promote the

one-electron oxidation of LAOOH to $LAOO^{\bullet}$, which has a reduction potential of 1.0 V (47, 48).

Alternatively, peroxy radicals could be generated by a mechanism involving chlorine-atom transfer between HOCl and LAOOH. This type of reaction is reported to occur in the reaction of HOCl with NO_2^- , yielding a NO_2Cl intermediate (49) that decomposes, generating $Cl^{\bullet}$ and $^{\bullet}NO_2$ (50). Similar reactions also occur during interaction of HOCl with thiols (RSH) and amines (RNH_2), yielding the corresponding chlorinated products $RSCl$ and $RNHCl$. These intermediates are relatively unstable and are suggested to decompose thermally or in the presence of metal ions to generate the radical intermediates $RS^{\bullet}$ and $Cl^{\bullet}$ (51) or $RNH^{\bullet}$ and $Cl^{\bullet}$ (52, 53).

Analogous to the reactions described above, a chlorine-atom transfer from HOCl to LAOOH could yield unstable chlorinated peroxide intermediates ($LAOOCi$) (Eq. 10) that may undergo homolytic cleavage to generate $LAO^{\bullet}$ and $^{\bullet}OCl$ (Eq. 11) or $LAOO^{\bullet}$ and $Cl^{\bullet}$ (Eq. 12). The $Cl^{\bullet}$ radical is a strong oxidant ($E^\circ Cl^{\bullet}/Cl = 2.2\text{--}2.6$ V) (54) capable of promoting the direct oxidation of LAOOH to $LAOO^{\bullet}$. In the same way, the alkoxy radical $LAO^{\bullet}$, which has a reduction potential of 1.6 V (47, 48), could also oxidize LAOOH to $LAOO^{\bullet}$.

Another mechanism by which HOCl could promote the formation of peroxy radicals is the reaction with $O_2^{\bullet-}$ or Fe^{2+} , generating $^{\bullet}OH$ (55–57). The hydroxyl radical is considered to be one of the most powerful oxidants, with $E^\circ ^{\bullet}OH, H/H_2O = 2.31$ V (58) and, therefore, capable of oxidizing LAOOH to $LAOO^{\bullet}$. However, the involvement of contaminant metal ions or $^{\bullet}OH$ in our system can be discarded, because experiments done with Chelex-treated buffer and manitol (1–10 mM) did not affect the formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with LAOOH (data not shown).

Overall, our results clearly demonstrated that HOCl reacts with both fatty acid hydroperoxides and phospholipid hydroperoxides present in membranes to generate $O_2 (^1\Delta_g)$. Moreover, our study also provided direct evidence for the generation of lipid peroxy-radical intermediates in the reaction of HOCl with LAOOH. The physiological relevance of these findings remains to be clarified. Nonetheless, the generation of both lipid peroxy radicals and $O_2 (^1\Delta_g)$ in this reaction may be an additional important mechanism that contributes to the microbicidal activity of HOCl during phagocytosis as well as for the propagation of lipid peroxidation in pathological conditions involving inflammatory processes, such as atherosclerosis and cancer. As recently reviewed, $O_2 (^1\Delta_g)$ is a highly reactive species that can oxidize a variety of biomolecules (59) and can modulate cell-signaling cascades and gene expression (60).

The importance of our study is strengthened by a number of evidences indicating a link between inflammatory disorders to lipid peroxidation and the formation of biologically active oxidized lipids (24, 61, 62). It has been demonstrated that MPO functions as a major catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation (61, 62). Our findings add a pathway that can contribute to the promotion of lipid peroxidation, providing further insights into the potential involvement of $O_2 (^1\Delta_g)$ in oxidative reactions mediated by HOCl/lipid hydroperoxides in biological systems.

Conclusions

In summary, the results presented in this article clearly show that the reaction of HOCl with LAOOH or PCOOH generates $O_2 (^1\Delta_g)$. The requirement of a hydrogen- α for the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$, the formation of $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of HOCl with $LA^{18}O^{18}OH$,

and the direct detection of peroxy radicals by EPR, strongly suggest the involvement of a Russell mechanism. The generation of $O_2(^1\Delta_g)$ by the reaction of HOCl with lipid hydroperoxides may be another important reaction that occurs at sites of inflammation.

Materials and Methods

Materials. LA, egg-yolk phosphatidylcholine (PC), and sodium azide were obtained from Sigma. Deuterium oxide (D_2O , 99.9%) was from Aldrich (Steinheim, Germany). H_2O_2 was purchased from Peróxidos do Brasil (Paraná, Brazil). HOCl stock solution (≈ 0.2 – 0.4 M) was prepared by vacuum distillation at $40^\circ C$ of commercial hypochlorite solution acidified to pH 6 with phosphoric acid. The HOCl concentration was determined spectrophotometrically ($\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at pH 12) (63). $LA^{18}O^{18}OH$ and $PCOOH$ were synthesized as described in refs. 36 and 64. The disodium salt of anthracene, EAS, and the endoperoxide of N,N' -di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropionamide (DHPNO₂) were synthesized as described by Di Mascio and Sies (65) and Martinez *et al.* (66), respectively. All of the other solvents were of HPLC grade and were acquired from Merck.

Singlet-Oxygen Monomol Light-Emission Measurements. Monomolecular photoemission of $O_2(^1\Delta_g)$ at 1270 nm was monitored by a photocounting apparatus described in refs. 36 and 67. For details, see *Supporting Materials and Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

Singlet-Oxygen Spectrum in the Infrared Region. The spectrum of the light emitted in the near-infrared region was recorded with the photomultiplier described above. For details, see *Supporting Materials and Methods*.

Calculation of Singlet-Oxygen Yield. The yield of $O_2(^1\Delta_g)$ was calculated by using DHPNO₂, a water-soluble endoperoxide, as a clean source of $O_2(^1\Delta_g)$ (see *Supporting Materials and Methods* and Fig. 8).

Preparation of Liposomes Containing Phospholipid Hydroperoxides. Liposomes of defined size (100 nm) were prepared by an extrusion technique (64). For details, see *Supporting Materials and Methods*.

^{18}O -Labeled Singlet-Oxygen Detection by Chemical Trapping. Singlet oxygen generated in the reaction of $LA^{18}O^{18}OH$ with HOCl was chemically trapped with EAS. EASO₂ was analyzed by HPLC-MS/MS. Details of the method are described in *Supporting Materials and Methods*.

EPR. EPR spectra of transient species formed at room temperature ($25 \pm 2^\circ C$) were obtained with an EMX spectrometer equipped with a ER 4117 D-MVT dielectric-mixing resonator (Bruker, Billerica, MA) (68). The magnetic field was calibrated with 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) which has a *g*-value of 2.0056 (69). Computer simulations of spectra were performed by using the program WINSIM (EPR calculations for MS-Windows NT 95, version 0.96 from Public EPR Software Tools (P.E.S.T.) written by Duling (70). For details, see *Supporting Materials and Methods*.

This work was supported by the Brazilian research funding institutions Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Pesquisa, Instituto do Milênio: Redoxoma, and The John Simon Memorial Guggenheim Foundation (P.D.M., Fellow).

- Allen, R. C. (1994) *Environ. Health Perspect.* **102**, 201–208.
- Harrison, J., Watson, B., & Schultz, J. (1978) *FEBS Lett.* **92**, 327–332.
- Klebanoff, S. J. (1999) in *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, eds. Gallin, J. I. & Snyderman, R. (Lippincott, Philadelphia), pp. 721–768.
- Hampton, M., Kettle, A., & Winterbourn, C. (1998) *Blood* **92**, 3007–3017.
- Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. (2000) *Free Radical Biol. Med.* **29**, 403–409.
- Heinecke, J. W. (1994) *Coronary Artery Dis.* **5**, 205–210.
- Daugherty, A., Dunn, J. L., Rateri, D. L., & Heinecke, J. W. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 437–444.
- Weitzman, S. & Gordon, L. (1990) *Blood* **76**, 655–663.
- Adam, L., Fabian, I., Suzuki, K., & Gordon, G. (1992) *Inorg. Chem.* **31**, 3534–3541.
- White, G. C. (1972) in *Handbook of Chlorination* (Van Nostrand Reinhold, New York), pp. 182–227.
- Hazen, S. L., Hsu, F. F., Mueller, D. M., Crowley, J. R., & Heinecke, J. W. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 1283–1289.
- Hazen, S. L., Hsu, F. F., Duffin, K., & Heinecke, J. W. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23080–23088.
- Henderson, J. P., Byun, J., & Heinecke, J. W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 33440–33448.
- Prutz, W. A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 110–120.
- Drozdz, R., Naskalski, J. W., & Sznajd, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **957**, 47–52.
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2003) *Amino Acids* **25**, 259–274.
- Masuda, M., Suzuki, T., Friesen, M. D., Ravanat, J.-L., Cadet, J., Pignatelli, B., Nishino, H., & Ohshima, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40486–40496.
- Domingan, N. M., Charlton, T. S., Duncan, M. W., Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16542–16548.
- Hazen, S. L. & Heinecke, J. W. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 2075–2081.
- Kettle, A. J. (1996) *FEBS Lett.* **379**, 103–106.
- Winterbourn, C. C., van den Berg, J. J., Roitman, E., & Kuypers, F. A. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 547–555.
- Carr, A. C., van den Berg, J. J. M., & Winterbourn, C. C. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 63–69.
- Panasenko, O. M. (1997) *Biofactors* **6**, 181–190.
- Spickett, C. M., Jerlich, A., Panasenkov, O. M., Arnhold, J., Pitt, A. R., Stelmazynska, T., & Schaur, R. J. (2000) *Acta Biochim. Pol.* **47**, 889–899.
- Panasenko, O. M., Evgina, S. A., Aidryaliev, R. K., Sergienko, V. I., & Vladimirov, Y. A. (1994) *Free Radical Biol. Med.* **16**, 143–148.
- Panasenko, O. M., Arnhold, J., Vladimirov, Y. A., Arnhold, K., & Sergienko, V. I. (1997) *Free Radical Res.* **27**, 1–12.
- Panasenko, O. M. & Arnhold, J. (1999) *Free Radical Res.* **30**, 479–487.
- Khan, A. U. & Kasha, M. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 3293–3300.
- Held, A. M., Halko, D. J., & Hurst, J. K. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 5732–5740.
- Murray, R. W. (1979) in *Singlet Oxygen*, eds. Wasserman, H. H. & Murray, R. W. (Academic, New York), pp. 59–114.
- Girotti, A. W. (1998) *J. Lipid Res.* **39**, 1529–1542.
- Hasty, N., Merkel, P. B., Radlick, P., & Kearns, D. R. (1972) *Tetrahedron Lett.* 49–52.
- Merkel, P. & Kearns, D. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1029–1030.
- Kajiura, T. & Kearns, D. R. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5886–5890.
- Martinez, G. R., Ravanat, J. L., Cadet, J., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. & Di Mascio, P. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3056–3057.
- Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. & Di Mascio, P. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6172–6179.
- Russell, G. A. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3871–3877.
- Bersohn, M. & Thomas, J. R. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 959.
- Ingold, K. U. (1969) *Accs. Chem. Res.* **2**, 1–9.
- Kalyanaram, B., Mottley, C., & Mason, R. P. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 3855–3858.
- Chamulitrat, W., & Mason, R. P. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20968–20973.
- Howard, J. A. & Ingold, K. U. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 1056–1058.
- Niu, Q. & Mendenhall, G. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 165–172.
- Chan, H. W.-S., Levett, G., & Matthew, J. A. (1979) *Chem. Phys. Lipids* **24**, 245–256.
- Cahill, A. E. & Taube, H. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2312–2318.
- Koppenol, W. H. (1994) *FEBS Lett.* **347**, 5–8.
- Koppenol, W. H. (1990) *FEBS Lett.* **264**, 165–167.
- Buettner, G. R. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 535–543.
- Johnson, D. W. & Margerum, D. W. (1991) *Inorg. Chem.* **30**, 4845–4851.
- Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B., & van der Vliet, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19199–19208.
- Davies, M. J. & Hawkins, C. L. (2000) *Free Radical Res.* **33**, 719–729.
- Hawkins, C. L. & Davies, M. J. (1998) *Biochem. J.* **332**, 617–625.
- Hawkins, C. L. & Davies, M. J. (1998) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1937–1945.
- Wardman, P. (1989) *J. Phys. Chem. Ref. Data* **18**, 1637–1755.
- Long, C. A. & Bielski, B. H. J. (1988) *J. Phys. Chem.* **84**, 555–557.
- Folkes, L. K., Candeias, L. P., & Wardman, P. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **323**, 120–126.
- Candeias, L. P., Patel, K. B., Stratford, M. R. L., & Wardman, P. (1993) *FEBS Lett.* **333**, 151–153.
- Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H., & Beckman, J. S. (1992) *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834–842.
- Cadet, J. & Di Mascio, P. (2006) in *The Chemistry of Peroxides*, ed. Rappaport, Z. (Wiley, Chichester, U.K.), Vol. 2.
- Klotz, L. O., Kroncke, K. D., & Sies, H. (2003) *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, 88–94.
- Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M., & Hazen, S. L. (2000) *Free Radical Biol. Med.* **28**, 1717–1725.
- Zhang, R., Brennan, M.-L., Shen, Z., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Molenda, C. E., & Hazen, S. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 46116–46122.
- Morris, J. C. (1966) *J. Phys. Chem.* **70**, 3798–3805.
- Miyamoto, S., Dupas, C., Murota, K., & Terao, J. (2003) *Lipids* **38**, 641–649.
- Di Mascio, P. & Sies, H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2909–2914.
- Martinez, G. R., Di Mascio, P., Bonini, M. G., Augusto, O., Briviba, K., Sies, H., Maurer, P., Rothlisberger, U., Herold, S., & Koppenol, W. H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10307–10312.
- Miyamoto, S., Martinez, G. R., Martins, A. P., Medeiros, M. H. & Di Mascio, P. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4510–4517.
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. D. C. & Augusto, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10802–10806.
- Mehlhorn, R. J. & Keith, D. A. (1972) in *Membrane Molecular Biology*, eds. Fox, C. F. & Keith, D. A. (Sinauer, Stanford, CT), pp. 192–227.
- Duling, D. R. (1994) *J. Magn. Reson.* **104**, 105–110.

*Artigos Publicados Relacionados
com a Tese*

Direct evidence of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] production in the reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline solutions

Eduardo A. Almeida, Sayuri Miyamoto, Glaucia R. Martinez,
Marisa H.G. Medeiros, Paolo Di Mascio*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

Received 11 November 2002; received in revised form 23 December 2002; accepted 28 January 2003

Abstract

In this work, we report direct evidence of the formation of singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$] in the reaction of hydrogen peroxide (H_2O_2) with acetonitrile in alkaline solutions. The formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ was characterized by: (i) the dimol light emission in the red spectral region (>610 nm) using a red-sensitive photomultiplier tube (PMT); (ii) the monomol light emission in the near-infrared region (1270 nm) with a newly available tube coupled to a monochromator; and (iii) the quenching effect of sodium azide. Direct spectral characterization of the near-infrared emission that attributes the emission to the transition of $O_2 (^1\Delta_g)$ to the triplet ground state ($O_2 (^3\Sigma_g^-)$) was done to unequivocally demonstrate the presence of $O_2 (^1\Delta_g)$. For comparison, $O_2 (^1\Delta_g)$ derived from the thermolysis of the endoperoxide of 1,4-dimethylnaphthalene or from the H_2O_2 /hypochlorite system were also monitored. The product of the reaction (acetamide) was also detected by mass spectrometry (MS). This evidence clearly demonstrates that the reaction of H_2O_2 with acetonitrile in alkaline solutions generates $O_2 (^1\Delta_g)$, confirming the mechanism proposed by McKeown and Waters.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Singlet oxygen; Hydrogen peroxide; Acetonitrile; Red light emission; Near-infrared emission

1. Introduction

According to the mechanism proposed by McKeown and Waters [1], singlet molecular oxygen ($O_2 (^1\Delta_g)$) could be generated by the reaction of alkaline hydrogen peroxide (H_2O_2) with nitriles. They could measure a low-level chemiluminescence (CL) with a small red component using a photomultiplier tube (PMT) and a red filter. Recently, Lu et al. [2] described in this journal a method for the determination of melatonin by the weak CL emitted when mixed with alkaline aqueous H_2O_2 and acetonitrile. According to their proposal, $O_2 (^1\Delta_g)$ could be generated by the reaction of the nitrile with alkaline H_2O_2 , which in turn reacted with melatonin causing CL emission. In an earlier paper, Lu's group [3] also postulated the generation of $O_2 (^1\Delta_g)$ from the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile, despite in both works there was no spectroscopic evidence to support the proposal.

The involvement of $O_2 (^1\Delta_g)$ with the red luminescence was elucidated by spectroscopic investigations using the reaction between H_2O_2 and hypochlorite by Khan and Kasha [4,5]. They observed the presence of

* Corresponding author. Fax: +55-11-38155579.
E-mail address: pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

two bands at 634 and 703 nm that were attributed to the simultaneous transitions of two molecules of oxygen in the $^1\Delta_g$ state by Arnold et al. [6]. This reaction was studied in detail by Cahill and Taube [7], which showed that the atoms forming $O_2 (^1\Delta_g)$ came from H_2O_2 , and it was demonstrated that in alkaline solutions the yield of $O_2 (^1\Delta_g)$ of this reaction is essentially 100% [8]. The transition of a single molecule of $O_2 (^1\Delta_g)$ to the ground state occurs in the infrared region of the spectra at 1270 nm, and was investigated by Browne and Ogrysló [9] using the H_2O_2 /hypochlorite system. The lifetime of $O_2 (^1\Delta_g)$ in solution is dependent of the nature of the solvent and is longer in a deuterated medium which is reflected directly in the intensity of luminescence [10,11]. Also, some substances are able to reduce the lifetime and CL of $O_2 (^1\Delta_g)$, such as sodium azide [12] and histidine [13]. These effects together are commonly used to demonstrate the participation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in different systems [14].

We studied here the reaction of H_2O_2 with acetonitrile, using: (i) CL measurement of the dimol light emission in the red spectral region ($\lambda > 610$ nm) using a red-sensitive photomultiplier tube (reaction 1); (ii) CL measurement of the monomol light emission in the near-infrared region (1270 nm) with a new photomultiplier tube coupled to a monochromator (reaction 2); and (iii) the quenching effect of sodium azide. Also, the detection of the reaction product acetamide by mass spectrometry was performed to provide additional evidence of the mechanism for the formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in this system.

2. Experimental

2.1. Dimol light emission of singlet oxygen

Low-level CL was measured with a single-photon counting system as described elsewhere [15,16], equipped with a red-sensitive photomultiplier tube cooled to -20°C by a thermoelectric cooler. The potential applied to the photomultiplier tube was

-1.2 kV. The phototube output was connected to an amplifier discriminator (Model 1121, Princeton Instruments, NJ) and to the computer for data acquisition. Selective light emission at wavelengths >610 nm was obtained using a cut-off filter (Melles Griot visible filters 03FCG101) placed between the cuvette and the PMT. Sample solutions were poured into a thermostat-equipped glass cuvette ($35 \text{ mm} \times 6 \text{ mm} \times 55 \text{ mm}$) with mirrored walls, with temperature adjusted to 40°C . Typically, 2 ml of 4 or 10 M H_2O_2 was injected into the solution contained in the cuvette (2 ml of pure acetonitrile, 1.8 ml of MilliQ water, and 0.2 ml of 1 M sodium carbonate) using a syringe injection pump (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, MA) at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} .

2.2. Monomol light emission and spectral measurements of singlet oxygen in the near-infrared region

The $O_2 (^1\Delta_g)$ monomol light emission spectrum was measured with a special photocounting apparatus developed in our laboratory, equipped with a monochromator capable of selecting emissions in the near-infrared region (800–1400 nm). The apparatus consists of a photomultiplier tube (RSS09 PMT, Hamamatsu Photonics KK, Shizuoka, Japan) cooled to -80°C with liquid nitrogen (S600 PHOTOCOOLTM, PC176TSCE005 cooler, Products for Research Inc., MA) to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage dc power supply (Model C3360, Hamamatsu) and the applied potential was set to -1.5 kV. The light emitted from the sample was processed through a monochromator (M300, Edinburgh Analytical Instruments, Livingston) equipped with a diffraction grating capable of selecting wavelengths in the infrared region. A silicon filter was used (Spectrogon UK Ltd., Glenrothes, UK). The PMT output was connected to the computer and the signal acquired. The monochromator was controlled and the data acquired using the F-900 ver. 6.22 software program (Edinburgh Analytical Instruments). Typically, 3–5 scans in the range 1200–1350 nm were recorded and averaged to yield the spectrum. The assay was conducted in a thermostated quartz cuvette ($10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 30 \text{ mm}$) with continuous stirring (CUV-O-STIR[®], model 333, Hellma).

Monomol light emissions were also measured using the monochromator fixed at 1270 nm, using the equipment described. The experiments were typically carried out by adding 1 ml of acetonitrile, 0.9 ml of water and 0.1 ml of 1 M NaCO_3 or NaOH into a cuvette, and injecting 1 ml of 4 M H_2O_2 (1.33 M final concentration) after 50 s recording light out, put by means of a syringe injection pump at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} .

2.3. LC/electrospray ionization mass spectrometry analysis of the acetamide product

Acetamide was determined by liquid chromatography (LC) electrospray ionization (ESI) mass spectrometry (MS) in the positive ion mode using a Platform II mass spectrometer (Micromass, Altrincham, UK). The source temperature of the mass spectrometer was kept at 100°C , and the flow rates of drying and nebulizing gas were optimized at 300 and 151 h^{-1} , respectively. The cone voltage was set to 20 V. The capillary potential and high electrode potential were set to 3.0 and 0.5 kV, respectively. Full scan data were acquired over a mass range of 40–100 m/z . The data were pro-

cessed by means of the Mass Lynx NT data system, version 3.20 (Micromass).

3. Results and discussion

3.1. Light emission detection of singlet oxygen

The measurement of CL originating from radiative transition of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ to its ground state is an important method for the detection and characterization of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. Two types of CL derive from $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$: dimol emission and monomol emission. In the experiment, the mixture of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solutions produced a rapid increase in light emission in the wavelength range corresponding to monomol and dimol emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ (see reactions 1 and 2). As illustrated in Fig. 1, trace b, the injection of 2 ml of 10 M H_2O_2 into a 4 ml alkaline solution of 50% acetonitrile produced a strong emission in the red region ($\lambda > 610 \text{ nm}$). Using the special photocounting apparatus, the monomol light emission at 1270 nm was also observed in the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile, as shown in Fig. 2, trace b.

Fig. 1. Dimol light emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile: (a) control without H_2O_2 ; (b) injection of 2 ml of 10 M H_2O_2 (after 100 s) into 4 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.2 ml of 1 M Na_2CO_3 ; (c) injection of sodium azide (to give a 71 mM final concentration into the cuvette) 100 s after the injection of the H_2O_2 , at the maximum signal as in (b). Injection rate was set to 0.7 ml min^{-1} .

Fig. 2. Monomol light emission of O_2 ($^1\Delta_g$) generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile (a); control without H_2O_2 ; (b) injection of 1 ml of 4 M H_2O_2 after 50 s into 2 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.1 ml of 1 M Na_2CO_3 ; (c) injection of sodium azide (to give a 1.7 mM final concentration in the cuvette) 100 s after of the H_2O_2 injection, at the maximum signal as in (b). Injection rate was set to 0.7 ml min^{-1} .

Fig. 3. Monomol light emission spectrum of O_2 ($^1\Delta_g$) generated in the reaction of alkaline H_2O_2 and acetonitrile recorded in the near-infrared region 1200–1350 nm. (A), alkaline H_2O_2 /acetonitrile: 1 ml of 4 M H_2O_2 was injected into 2 ml of 50% acetonitrile in water containing 0.1 ml of 1 M Na_2CO_3 at a flow rate of 0.7 ml min^{-1} ; (B), thermodissociation of $DMNO_2$ (15 mM in chloroform) at 40°C ; (C), H_2O_2 /hypochlorite, 2 ml of hypochlorite (0.3 M) was injected into 1 ml of H_2O_2 (3 M) at a flow rate of 1.4 ml min^{-1} .

Fig. 4. Mass spectrum after the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solution.

To further characterize the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ in this reaction, the effect of sodium azide on CL intensity was examined using both the red PMT detector (Fig. 1, line c compared with line b) and the special monochromator coupled to a highly sensitive PMT (Fig. 2, line c compared with line b). The CL signal intensity was effectively quenched by sodium azide, which is a strong indication that $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ is the emitter. Additionally, neither acetonitrile (Fig. 1a) nor H_2O_2 elicited CL when present alone.

the infrared emission spectrum of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ produced by the reaction of alkaline H_2O_2 with acetonitrile (Fig. 3A). The emission spectra of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ generated in the thermolysis of DMNO_2 [17] (reaction 3, Fig. 3B) and the H_2O_2 /hypochlorite system [8] (reaction 4, Fig. 3C) were also recorded for comparative purposes. As expected, an emission maximum at 1270 nm, characteristic of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, was observed in all the systems tested, confirming the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solutions.

3.2. Singlet oxygen spectrum

Besides the direct kinetic detection of the monomol emission of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ at 1270 nm, we also recorded

3.3. Detection of the reaction product acetamide by mass spectrometry

The incubation of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline media resulted in the formation of acetamide. The

Scheme 1. Reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline media generating acetamide, water and singlet molecular oxygen.

reaction mixture was analyzed by electrospray ionization MS. The mass spectrum of the product acetamide recorded in the positive mode exhibits a major $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion at $m/z = 60$, corresponding to the positively charged molecular ion (Fig. 4). The spectrum also displays an intense $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion at $m/z = 82$ and $[\text{CH}_3\text{CN} + \text{Na}]^+$ ion at $m/z = 64$ (Fig. 4).

4. Conclusions

Spectroscopic and chemical evidence demonstrate singlet oxygen formation during the reaction of H_2O_2 with acetonitrile in alkaline solution. According to the mechanism proposed by Wiberg in 1953 for oxygen production, we can expect first a nucleophilic attack by the peroxide anion (OOH^-) on the carbon of the nitrile (Scheme 1A), followed by a reaction with a second molecule of H_2O_2 generating acetamide, water and $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Scheme 1B). Taken together, these novel observations serve as important evidence of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ production in the reaction of H_2O_2 and acetonitrile in alkaline solution, as initially proposed by McKeown and Waters [1].

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq, Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico,

PRONEX/FINEP, Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP, University of São Paulo. We are deeply indebted to Clécio F. Klitzke for his contribution to the mass spectrometric analyses. E.A.A., S.M. and G.R.M. are recipients of FAPESP fellowships.

References

- [1] E. McKeown, W.A. Waters, *Nature* 4949 (1964) 1063.
- [2] J. Lu, C. Lau, M.K. Lee, M. Kai, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 193.
- [3] J. Lu, C. Lau, M. Morizono, K. Ohta, M. Kai, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5979.
- [4] A.U. Khan, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 39 (1963) 2105.
- [5] A.U. Khan, M. Kasha, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 605.
- [6] S.J. Arnold, E.A. Ogrysló, H. Witzke, *J. Chem. Phys.* 40 (1964) 1769.
- [7] A.E. Cahill, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 2312.
- [8] A.M. Held, D.J. Halko, J. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5732.
- [9] R.J. Browne, E.A. Ogrysló, *P. Chem. Soc. London, APR* (1964) 117.
- [10] T. Kajiwar, D.R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5886.
- [11] J.R. Kanofsky, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 5991.
- [12] R.D. Hall, C.F. Chignell, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 459.
- [13] J.R. Kanofsky, *J. Photochem.* 25 (1985) 105.
- [14] C. Pierlot, J.-M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P. Di Mascio, in: L. Packer, H. Sies (Eds.), *Singlet Oxygen, UV-A & Ozone; Methods Enzymol.* 319 (2000) 3–20.
- [15] E. Cadenas, H. Sies, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 221.
- [16] P. Di Mascio, H. Sies, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 2909.
- [17] P. Di Mascio, E.J.H. Bechara, Rubim, J.C. *Appl. Spectrosc.* 46 (1992) 236.

Technical note

Thin-layer chromatography blotting for the fluorescence detection of phospholipid hydroperoxides and cholesteryl ester hydroperoxides

Junji Terao*, Mariko Miyoshi, Sayuri Miyamoto

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Kuramoto-Cho 3, Tokushima 770-8503 Japan

Received 1 July 2001; received in revised form 7 September 2001; accepted 17 September 2001

Abstract

A blotting technique was developed to specifically detect lipid hydroperoxides in thin-layer chromatography. Phosphatidylcholine hydroperoxides and cholesteryl linoleate hydroperoxides ranging from 0.1 to 0.5 nmol, which were prepared by reaction with soybean lipoxygenase, were visualized as fluorescent spots on the blotted membrane by immersing the plate into a blotting solvent containing 0.01% (w/v) diphenyl-1-pyrenylphosphine. This technique was applied successfully to monitor lipid peroxidation in human low-density lipoprotein in vitro. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Phospholipid hydroperoxides; Cholesteryl ester hydroperoxides

1. Introduction

Lipid peroxidation attracts much attention because of its possible role in a variety of pathophysiological events. Lipid hydroperoxides are the primary products of lipid peroxidation and their detection has been frequently used as an effective tool for monitoring lipid peroxidation in biological systems in vivo and in vitro. Several high-performance liquid chromatography (HPLC) methods for the separation and quantification of lipid hydroperoxides have been reported in the literature [1–5]. Akasaka et al. [6,7] determined lipid hydroperoxides using HPLC with fluorescence detection. However, the HPLC technique is time-consuming and requires special instrumentation, although fluorescence detection is sensi-

tive and reproducible. On the other hand, Taki et al. [8,9] have developed thin-layer chromatography (TLC) blotting as a simple isolation method for glycolipids from biological tissues. We therefore developed this TLC blotting technique for detecting lipid hydroperoxides and succeeded in the specific detection of lipid hydroperoxides on the blotting membranes.

2. Experimental

2.1. Materials

Egg yolk phosphatidylcholine (PC) and cholesteryl linoleate were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Phosphatidylcholine hydroperoxides (PC-OOH) were prepared from egg yolk PC by reaction with soybean lipoxygenase and were isolated using reversed-phase column chromatography

*Corresponding author. Tel.: +81-88-633-7087; fax: +81-88-633-7089.

E-mail address: terao@nutr.med.tokushima-u.ac.jp (J. Terao).

according to the method described previously [10]. Cholesteryl ester hydroperoxides (CE-OOH) were also prepared with soybean lipoxygenase and isolated by silica gel column chromatography [11]. Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) was purchased from Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan). Polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes, polytrifluoroethylene (PTFE) membranes and glass fiber filters were obtained from ATTO (Tokyo, Japan). 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was purchased from Wako (Tokyo, Japan).

2.2. Analysis of lipid hydroperoxides by TLC blotting

An aliquot of lipid solution was charged onto a TLC plate (Silica gel 60 F254, 0.25 mm thickness, 5×5 cm) and developed with the solvent chloroform–methanol–0.2% aqueous CaCl_2 (65:35:5, v/v) for PC-OOH and with hexane–diethyl ether–acetic acid (70:30:1, v/v) for CE-OOH. PC-OOH or CE-OOH was blotted onto the PVDF membrane as follows. The TLC plate was dried thoroughly with a hair dryer and then dipped in 0.01% (w/v) DPPP-containing blotting solvent (isopropanol–0.2% aqueous CaCl_2 –methanol, 40:20:7, v/v) for 30 s, after which it was placed on a glass fiber filter. Then the plate was covered with a PVDF membrane, a PTFE membrane and finally a glass fiber filter in layers. This TLC-blotting sandwich was pressed evenly for 60 s at 180°C using a TLC thermal blotter AC-5970 (ATTO) at a press level of 8. After blotting, the PVDF membrane was illuminated with a 150 W projection lamp for 20 min at room temperature. Then the PC-OOH or CE-OOH spot was visualized by fluorescence under UV irradiation using a fluorescence reader, Epi-light UV FA 500 (AISIN-COSMOS Institute, Tokyo, Japan).

2.3. Application of TLC blotting for monitoring lipid peroxidation in human LDL

Human LDL was prepared from healthy volunteers and an LDL suspension in PBS buffer (pH 7.4; 0.6 mg protein/2.7 ml) was added to 0.3 ml AAPH solution (final concentration 10 mM) and incubated at 37°C for 4 h. At given time intervals, LDL

solution (600 μl) was taken out and extracted with chloroform–methanol (2:1, v/v). The resultant lipid extract was charged onto a TLC plate after concentration and then subjected to TLC blotting after development with a solution of hexane–diethyl ether–acetic acid (70:30:1, v/v).

3. Results and discussion

We selected the fluorescent derivative DPPP for visualizing lipid hydroperoxides on PVDF membranes. Akasaka et al. [6] originally developed this compound for the specific detection of lipid hydroperoxides in HPLC post-column assays. Its principle is the production of a fluorescent compound, diphenyl-1-pyrenylphosphine oxide, from DPPP by the reduction of lipid hydroperoxides [6,7]. This fluorescent reaction is simple and sensitive for the detection of lipid hydroperoxides [12]. Recently, DPPP was successfully applied as a fluorescent probe for lipid peroxidation of cultured cells [13]. Fig. 1A shows a typical result for the fluorescence detection of PC-OOH on the blotting membrane in the range 0.1 to 0.5 nmol. The PC-OOH spot in this range was clearly visualized on the membranes. Fluorescence detection of CE-OOH on TLC blotting shows that CE-OOH is visualized in the range 0.1 to 0.5 nmol, similar to PC-OOH (Fig. 1B). An advantage of the combination of DPPP and TLC blotting is that the fluorescent compound is formed during the thermal blotting by using a DPPP-containing blotting solvent. This indicates that an additional visualizing reaction on the membrane is not required. In TLC analysis, lipid hydroperoxides can be detected by spraying the reagents potassium iodide–starch, ammonium thiocyanate–ferrous sulfate, dimethylaminoaniline or dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride [14,15]. However, the spraying procedure seems to reduce the sensitivity and reproducibility. For either PC-OOH or CE-OOH, the detection limit on the membrane is nearly 0.1 nmol. Although we tried colorimetric detection on TLC blotting, which was based on iodometry using potassium iodide and methylene blue [16], the detection limits for PC-OOH and CE-OOH by this colorimetric reaction were larger than 1.0 nmol.

Fig. 1. TLC blotting of standard PC-OOH (A) and CE-OOH (B) at different levels. The arrow shows the PC-OOH (A) and CE-OOH (B) spots.

Fig. 2. TLC blotting of the lipid extracts from oxidized human LDL. The arrow shows the CE-OOH spots.

Next, we applied DPPP-TLC blotting to the detection of lipid hydroperoxides from oxidized human LDL to assess whether this technique is useful for monitoring lipid peroxidation in biological samples. Human LDL was prepared from healthy volunteers and oxidized with a water-soluble azo compound, AAPH, by the method described previously [17]. Fig. 2 shows the results for lipid extracts from LDL before and after 1, 2 and 4 h oxidation. The CE-OOH spot appeared in the lanes after 2 and 4 h oxidation. Among the lipid hydroperoxides, CE-OOH has frequently been used in HPLC analyses for monitoring the degree of lipid peroxidation of plasma lipoproteins [18]. It is therefore likely that this technique is an efficient tool for monitoring lipid peroxidation of LDL in vitro.

In conclusion, the combination of fluorescence detection using DPPP and TLC blotting serves as a simple and sensitive technique for the detection of lipid hydroperoxides from biological samples. In addition, this technique may be useful for isolating lipid hydroperoxides from biological samples after TLC separation.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. T. Taki of the Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceuticals, and K. Kato of the School of Environmental Policy and Technology, Himeji Institute of Technology, for helpful discussions. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

References

- [1] Y. Yamamoto, M.H. Brodsky, J.C. Baker, B.N. Ames, *Anal. Biochem.* 160 (1987) 150.
- [2] T. Miyazawa, K. Yasuda, K. Fujimoto, T. Kaneda, *Anal. Lett.* 20 (1987) 915.
- [3] J. Terao, S.S. Shibata, S. Matsushita, *Anal. Biochem.* 169 (1988) 415.
- [4] J.M. Gebicki, J. Guille, *Anal. Biochem.* 176 (1989) 360.
- [5] A. Müllertz, A. Schmedes, G. Hølmer, *Lipids* 25 (1990) 415.
- [6] K. Akasaka, H. Ohrai, H. Meguro, *Anal. Lett.* 21 (1988) 965.

- [7] K. Akasaka, A. Ohata, H. Ohrai, H. Meguro, *J. Chromatogr. B* 665 (1995) 37.
- [8] T. Taki, K. Handa, D. Ishikawa, *Anal. Biochem.* 221 (1994) 312.
- [9] T. Taki, D. Ishikawa, *Anal. Biochem.* 251 (1997) 135.
- [10] H. Arai, S. Mohri, T. Suzuki, K. Takama, J. Terao, *Biosci. Biotech. Biochem.* 61 (1997) 191.
- [11] H. Arai, J. Terao, D.S.P. Abdalla, T. Suzuki, K. Takama, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 365.
- [12] K. Akasaka, H. Ohrai, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 159.
- [13] M. Takahashi, M. Shibata, E. Niki, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 164.
- [14] A. Rieche, M. Schulz, *Angew. Chem.* 70 (1958) 694.
- [15] G. Zweig, in: G. Zweig, J. Sherma (Eds.), *Handbook Series in Chromatography*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FL, 1972, p. 154.
- [16] J.O. Meditsch, *Anal. Chim. Acta* 31 (1964) 286.
- [17] N. Yamamoto, J.-H. Moon, T. Tsushida, A. Nagao, J. Terao, *Arch. Biochem. Biophys.* 372 (1999) 347.
- [18] N. Noguchi, N. Goto, E. Niki, *Biochim. Biophys. Acta* 1168 (1993) 348.

Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals

Eduardo Alves de Almeida ^a, Sayuri Miyamoto ^a, Afonso Celso Dias Bainy ^b,
Marisa Helena Gennari de Medeiros ^a, Paolo Di Mascio ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26.077, 05513-970 São Paulo, SP, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

Levels of antioxidant defenses and lipid peroxidation were evaluated in mussels exposed to lead (200 mg/l), iron (500 µg/l), cadmium (200 µg/l) and copper (40 µg/l), for 12, 24, 72 and 120 h. Glutathione *S*-transferase (GST) activity was unchanged with all treatments. Catalase (CAT) increased after 120 h of exposure to all metals. Mussels exposed to Cd for 12 h, and to Cu and Fe for 120 h had increased lipid peroxidation, which might be associated to decreased levels of reduced glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) activity. Pb exposure caused GSH depletion after 12 h and increased GPx activity after 120 h. Negative correlations were observed between the enzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and malonaldehyde (MDA) levels after Fe and Cu exposure, indicating a protective role of PHGPx against lipid peroxidation, and suggesting the use of this enzyme as a new potential biomarker of toxicity associated with contaminant exposure in mussels.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Pollution monitoring; Mussel *Perna perna*; Oxidative stress; Antioxidant; Heavy metal; Biomarkers

1. Introduction

Mussels are widely used as sentinel organisms in marine pollution monitoring programs, due to their sessile and filtering habits, and ability to bioaccumulate organic pollutants and metals in their tissues (Goldberg, 1975). The exposure of marine mollusks to metals has been shown to induce oxidative stress through the formation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) and lipid peroxidation (Viarengo et al., 1990). To protect against oxidative stress, organisms possess antioxidant defenses. For example, catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), detoxifies hydrogen peroxide (H₂O₂), and glutathione *S*-transferase (GST)

conjugates xenobiotics with reduced glutathione (GSH) for excretion.

Although GPx can reduce H₂O₂ and some organic hydroperoxides, it is not able to reduce phospholipid hydroperoxides (PLOOH) without previous action of phospholipase A₂ (PLA₂) leading to the formation of fatty acid hydroperoxides (FAOOH) that can be reduced into the correspondent fatty acid alcohol (FAOH) by GPx (Sevanian et al., 1983; van Kujik et al., 1985). Nevertheless, the enzyme phospholipid hydroperoxide GPx (PHGPx) has been reported to be highly reactive towards peroxidized phospholipids in many mammal tissues (Ursini et al., 1985; Zhang et al., 1989; Yagi et al., 1996). Although PHGPx has been detected in tissues of different mammals, there are no reports of its presence in marine organisms. In this work, we have investigated the presence of this enzyme in the digestive gland of mussels, and evaluated the effects of metal exposure on the antioxidant defenses of the mussel *Perna perna* with regard to its susceptibility to lipid peroxidation.

* Corresponding author. Fax: +55-11-38155579.

E-mail address: pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Lead acetate, iron sulfate, cadmium acetate, copper sulfate, potassium chloride (KCl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiothreitol (DTT), sucrose, oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, *t*-butylhydroperoxide, egg yolk phosphatidylcholine, soybean lipoxygenase, bovine albumin, butylated hydroxytoluene (BHT), lauryl sulfate (SDS), NADPH, 2-thiobarbituric acid (TBA) and potassium phosphate were purchased from Sigma-Aldrich CO (St. Louis, MO). Tris was obtained from Pharmacia-Biotech (Uppsala, Sweden). HCl, *n*-butanol, methanol, formic acid and perchloric acid were purchased from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Hydrogen peroxide was purchased from Peróxidos do Brasil (Paraná, Brazil). PCOOH was prepared from egg yolk phosphatidylcholine using soybean lipoxygenase according to Miyamoto et al. (2003) and Terao et al. (1992).

2.2. Exposure of mussels to metals

Mussels *P. perna* of similar length (8–12 cm) were purchased from a mussel aquaculture facility located on Florianópolis City (SC, Brazil) and divided in five groups of 40 specimens, which were placed into five aerated tanks, containing 0.5 l of seawater per mussel. After one day of acclimatization, four groups were respectively exposed to sub-lethal doses of lead acetate (200 mg/l), iron II sulfate (500 µg/l), cadmium acetate (200 µg/l) and copper sulfate (40 µg/l). These concentrations were chosen based on the LC₅₀ values commonly reported for mussels (Prakash and Rao, 1995; Viarengo et al., 1997; Viarengo et al., 1999). One group was kept at similar water conditions but without metals, as the control group. Daily, the water from the control and treated groups were renewed. After 12, 24, 72 and 120 h of exposure, 10 mussels from each group were killed and their digestive glands dissected and immediately immersed in liquid nitrogen. Five of these mussels were individually processed for enzymatic analyses and the five remaining mussels were individually analyzed for GSH and MDA levels. Water temperatures varied from 19 to 21 °C.

2.3. Sample processing

The tissues were weighed and homogenized with 1:5 vol of buffer (Tris HCl 50 mM, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.5 M sucrose, 0.15 M KCl, pH 7.4), and centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 40,000g for additional 60 min at 4 °C, and the supernatant fraction was collected and used for

the measurement of CAT, GPx, GST and PHGPx activities.

2.4. Enzymatic assays and protein quantification

CAT activity was quantified at 240 nm by the H₂O₂ decomposition according to the method of Beutler (1975). GPx activity was assayed by the oxidation of NADPH (linked to GSSG reduction by excess glutathione reductase) at 340 nm, as described by Sies et al. (1979). GST activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm, incubating reduced glutathione (GSH) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrates, according to Keen et al. (1976). PHGPx was measured following the method described by Maiorino et al. (1990) and Yamamoto and Takahashi (1993), using phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) as substrate. Total protein content in samples was determined by the modified method of Lowry, using bovine serum albumin as standard (Peterson, 1977).

2.5. Lipid peroxidation and glutathione measurement

For the evaluation of lipid peroxidation levels, 200 mg of the digestive glands were homogenized in 1.5 ml of 0.25 M of sucrose, containing 0.05% butylated hydroxytoluene (BHT), in order to prevent autoxidation. Then, 200 µl of 10% SDS and 500 µl of 0.4% TBA diluted in 0.2 M of HCl were added to the solution. The reaction mixture was then heated in a boiling water bath for 60 min. The colored derivative was extracted with 2 ml of *n*-butanol and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) at 532 nm, in terms of a malonaldehyde (MDA) standard calibration curve previously prepared using the same procedure as used for the samples. The HPLC system (Shimadzu) consisted of two LC-10ADVP pumps, a SPD-M10ADVP photodiodearray detector, and a SCL-10AVP controller. The column used was a Supelcosil LC-18 (150×4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was 0.05 M KH₂PO₄, pH 7.0, with 40% methanol, and was pumped at an isocratic flow of 1 ml/min.

Levels of reduced glutathione in sample (GSH) were also evaluated by HPLC coupled to an amperometric electrochemical detector (DECADE, Antec, The Netherlands) set at 0.7 V. The HPLC apparatus consisted of two LC-10A pumps and a CBM-10A controller (Shimadzu). The column used was a Supelcosil LC-18 (150×4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was 0.025 KH₂PO₄ with 0.1% formic acid (pH 2.9), pumped at a flow rate of 1 ml/min. Samples were homogenized in five volumes of 1 M perchloric acid containing 0.002 M EDTA, and centrifuged at 10,000g for 10 min. The supernatant fraction was then filtered and directly injected (20 µl) into the HPLC system. Peaks for GSH were identified and quantified based on a calibration

curve previously constructed by injecting authentic GSH standards into the HPLC system.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Micrococal Origin 6.0 software (Northampton, MA, USA). Results are presented as mean $\pm$ standard deviation. Significant differences between groups were studied using *t*-test and one-way analysis of variance, and only $p < 0.05$ was accepted as significant. Correlation coefficients between PHGPx and MDA levels were performed using the median values observed for each parameter.

3. Results and discussion

3.1. Cadmium

Exposure of marine organisms to Cd can increase the susceptibility to lipid peroxidation. Indeed, Prakash and Rao (1995) observed increased levels of lipid peroxidation in the bivalve *Perna viridis* exposed to Cd for 1 and 7 days, and Geret et al. (2002) observed that, despite Cd no longer affected antioxidant enzymes, this metal caused an increase in the cellular MDA levels after 14 days of exposure.

In our experiment, only mussels exposed to Cd for 12 h showed an increased MDA level, as well as a decrease in both GPx activity and GSH level, however, the apparent difference in GSH level may be related to increased level of GSH control (Fig. 1). GPx and GSH are important cellular antioxidants, being involved in protection against ROS/RNS-mediated damage to cell components. Thus, inhibition or depletion of such antioxidant defenses by Cd exposure could increase the susceptibility to lipid peroxidation. We also observed a significant decrease in the GPx activity after 24 and 72 h of Cd exposure, with a corresponding enhanced MDA level. There was no change in GST activity with Cd exposure at 200 $\mu\text{g/l}$ for the duration of the experiment.

PHGPx activity in Cd exposure was variable: at 12 and 72 h, there was no PHGPx differences between controls and exposed animals, while at 24 and 120 h, there were significant differences.

PHGPx has a specific activity toward phospholipid hydroperoxides, which are products of lipid peroxidation that can be decomposed to other reactive products such as aldehydes. Thus, the augmented PHGPx activity observed after 24 and 120 h of Cd exposure could be related to the lack of differences observed on MDA levels at these exposure period intervals. The fact that no differences were observed in MDA levels at same periods where PHGPx was stimulated could indicate a possible

Fig. 1. Levels of CAT, GPx, GST, PHGPx, GSH and MDA in the digestive glands of mussels exposed to Cd (200 $\mu\text{g/l}$) for 12, 24, 72 and 120 h. * indicates statistical differences ($p < 0.05$). $N = 5$ (CAT, GST, GSH and MDA) and 4 (GPx and PHGPx).

protective role for PHGPx against lipid peroxidation in mussels. However no such correlation between PHGPx and MDA levels was observed for Cd exposure, as indicated by the calculated correlation coefficient value ($r = 0.101$).

After 120 h of Cd exposure, the elevated CAT activity could also be accounted for the protection against lipid peroxidation. Accordingly, Viarengo et al. (1999) observed increased levels of CAT in *Mytilus edulis* exposed to Cd for 7 days, despite no differences in MDA levels were observed.

3.2. Copper

A similar profile was also observed for mussels exposed to Cu, where the levels of MDA were significantly increased after 120 h of exposure, corresponding to the lowest levels of PHGPx (Fig. 2). In this case, a significant negative correlation ($r = -0.952$) was observed between the PHGPx activity and MDA levels (Fig. 3), which would be related to a protective effect of PHGPx against lipid peroxidation due to Cu exposure.

Exposure of mussels to Cu caused GSH depletion after 24 ($p = 0.053$) and 72 ($p < 0.05$) h of exposure, respectively. Although GPx and PHGPx were not decreased after these periods, its effectiveness would be

Fig. 3. Correlation curves between PHGPx activity and MDA levels, for mussels exposed to iron (Fe) and copper (Cu).

decreased, since these enzymes use electrons from GSH for reducing peroxides. This fact would contribute to the increased levels of MDA after 120 h of Cu exposure. In turn, depletion in GSH levels would also be due to high

Fig. 2. Levels of CAT, GPx, GST, PHGPx, GSH and MDA in the digestive glands of mussels exposed to Cu (40 µg/l) for 12, 24, 72 and 120 h. * indicates statistical differences ($p < 0.05$). # indicates statistical difference considering $p = 0.053$. $N = 5$ (CAT, GST, GSH and MDA) and 4 (GPx and PHGPx).

Fig. 4. Levels of CAT, GPx, GST, PHGPx, GSH and MDA in the digestive glands of mussels exposed to Fe (500 µg/l) for 12, 24, 72 and 120 h. * indicates statistical differences ($p < 0.05$). $N = 5$ (CAT, GST, GSH and MDA) and 4 (GPx and PHGPx).

PHGPx activity, which uses GSH as electron donor, or to Cu detoxification, since strong evidence exist that GSH is one of the intracellular chelators of Cu (Freedman et al., 1989). Similarly, Doyotte et al. (1997) observed that exposure of freshwater bivalve *Unio tumidus* to 30 µg of Cu/l for 72 h caused GSH depletion. Moreover, Canesi et al. (1998) also observed decreased GSH levels in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to 40 µg Cu/l after 72 h.

No differences were observed on GPx and GST activities during Cu exposure (Fig. 2). These results suggest that Cu, at concentrations used in our experiments, caused no effect on GPx and GST activity. Doyotte et al. (1997) observed that freshwater mussels *U. tumidus* exposed for 3 days to 30 µg Cu/l showed no differences on GPx levels.

Also, mussels showed increased CAT activity after 120 h of exposure to all treatments, which would be an indication of enhanced H_2O_2 production to be detoxified. Nevertheless, these differences would also be related to a decreased CAT activity in the control group after 120 h caused by another uncontrolled environmental factor such as the water temperature.

3.3. Iron

Mussels exposed to Fe for 12, 24 and 72 h presented increased PHGPx activity and no differences in MDA

levels (Fig. 4). When mussels were exposed to Fe for 120 h, both MDA and PHGPx were significantly higher than control. Such increased MDA levels agree with previous findings by Viarengo et al. (1999). Similarly to the Cu exposure, a negative correlation ($r = -0.822$) was observed between PHGPx activity and MDA levels (Fig. 3) after Fe exposure, which supports an interpretation that PHGPx protects tissues from lipid peroxidation. In fact, transition metals such as Fe and Cu are known to be involved in Fenton reaction, which is capable of generating hydroxyl radicals, the most deleterious of the ROS (Sutton and Winterbourn, 1989; Halliwell and Gutteridge, 1992). Thus, the exposure of mussels to Fe and Cu along with a concomitant increase in hydroxyl radical formation would be involved in the modulation of PHGPx enzyme, however the precise mechanism remains unclear.

Also, as observed for Cu exposure, exposure of mussels to 500 µg/l of Fe caused no changes in GST and GPx enzymes.

3.4. Lead

Exposure of mussels to 200 mg of Pb/l caused GSH depletion after 12 h, increased GPx activity after 120 h, and no changes in GST activity (Fig. 5). As in the case of Cd exposure, the difference in GSH levels would be related to increased levels in the control group.

Fig. 5. Levels of CAT, GPx, GST, PHGPx, GSH and MDA in the digestive glands of mussels exposed to Pb (200 mg/l) for 12, 24, 72 and 120 h. * indicates statistical differences ($p < 0.05$). $N = 5$ (CAT, GST, GSH and MDA) and 4 (GPx and PHGPx).

According to Alcutt and Pinto (1994), GSH may protect cells from accumulating Pb by forming insoluble sulfide adducts with Pb and excreting these complexes. Such response would be responsible for the observed GSH depletion after 12 h of Pb exposure, decreasing antioxidant potential and thus increasing susceptibility to oxidative stress. The enhancement of GPx activity after 120 h would be consistent to an augmented H_2O_2 production, despite no increases in lipid peroxidation were observed. This would be due to the high PHGPx activity after 12, 24 and 120 h, despite the fact that no significant negative correlation was observed between PHGPx and MDA levels after Pb exposure ($r = -0.339$).

4. Conclusions

In this work, we report the detection of the enzyme PHGPx for the first time in a marine organism and its possible modulation by metals. Numerous works have been carried out where the susceptibility of different tissues of marine organisms to lipid peroxidation caused by pollutants is assessed as an indication of environmental quality. In such studies, the highest concentrations of lipid peroxidation products are correlated with the activity of classical antioxidant systems such as the enzymes CAT, GPx, GST and superoxide dismutase, as well as non-enzymatic antioxidants. However, different responses are obtained in similar experiments making

difficult the interpretation of such results. In general, organisms with lowered antioxidant status could be more susceptible to lipid peroxidation, and therefore presenting higher levels of lipid peroxidation (Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 2000). On the other hand, increases in antioxidant defenses would be due to enhanced ROS/RNS production, and elevated (Torres et al., 2002) or decreased (Rodríguez-Ariza et al., 1993) levels of MDA can be observed.

In the present work, we observed that the levels of MDA were strongly correlated with the activity of the PHGPx enzyme after exposure to the transition metals Cu and Fe. In general, at high PHGPx activities, no differences were observed in MDA levels, although increased PHGPx and MDA levels were observed after 120 h of Fe exposure. This indicates that PHGPx have an important role in the susceptibility of digestive glands of mussels against lipid peroxidation, and that exposure to transition metals such as Fe and Cu could lead mussels to stimulate PHGPx in order to prevent lipid peroxidation.

Thus, we suggest that the evaluation of MDA levels in parallel with antioxidant defenses, especially the activity of the enzyme PHGPx, could be considered as a potential new biomarker of toxicity associated with contaminant exposure in marine organisms. Also, data presented here contributed to better understanding of the differences observed in lipid peroxidation levels in digestive glands of mussels, caused by metal exposure.

Acknowledgements

This work was supported by the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo”, FAPESP, (Brazil), the “Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico”, CNPq (Brazil), the “Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência”, PRONEX/FINEP (Brazil), and Pró-Reitoria de pesquisa da Universidade de São Paulo. E.A.A. and S.M. are recipients of the FAPESP fellowships.

References

- Alcunt, F., Pinto, J.T., 1994. Glutathione concentrations in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following laboratory exposure to lead (a potential model system for evaluating exposure to carcinogens and toxins). *Comp. Biochem. Physiol.* 107C, 347–352.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Straton, New York.
- Canesi, L., Ciacci, C., Piccoli, G., Stocchi, V., Viarengo, A., Gallo, G., 1998. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol.* 120C, 261–268.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 45, 106–121.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquat. Toxicol.* 39, 93–110.
- Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J., 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598–5605.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2002. Effect of cadmium on antioxidant activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Biomarkers* 7 (3), 242–256.
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch: a first step in global marine monitoring. *Mar. Poll. Bull.* 6, 111–132.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1992. Biologically relevant metal ion-dependent OH[•] generation. An update. *FEBS Lett.* 307, 108–112.
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for several activities of the glutathione *S*-transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- Maiorino, M., Gregolin, C., Ursini, F., 1990. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 186, 448–457.
- Miyamoto, S., Dupas, C., Murota, K., Terao, J., 2003. Phospholipid hydroperoxides are detoxified by phospholipase A2 and GSH peroxidase in rat gastric mucosa. *Lipids* 38, 641–649.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356.
- Prakash, N.T., Rao, K.S.J., 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. *Mol. Cell Biochem.* 146, 107–113.
- Rodríguez-Ariza, A., Martínez-Lara, E., Pascual, P., Pedrajas, J.R., Abril, N., Dorado, G., Toribio, F., Bárcena, J.A., Peinado, J., Pueyo, C., López-Barea, J., 1993. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Sci. Tot. Environ. Suppl. Pt 1*, 109–116.
- Sies, H., Koch, O.R., Martino, E., Boveris, A., 1979. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–290.
- Sevanian, A., Muakassah-Kelly, S.F., Montestruque, S., 1983. The influence of phospholipase A2 and glutathione peroxidase on the elimination of membrane lipid peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 441–452.
- Sutton, H.C., Winterbourn, C.C., 1989. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 6, 53–60.
- Terao, J., Nagao, A., Park, D.-K., Boey, P.L., 1992. Lipid hydroperoxide assay for antioxidative activity of carotenoids. *Methods Enzymol.* 213, 192–205.
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gáspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., Almeida, E.A., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* 44, 923–932.
- Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C., 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 839, 62–70.
- van Kujik, F.J.G.M., Handelman, G.J., Dratz, E.A., 1985. Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1, 421–427.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. Physiol. Soc.* 277, 1612–1619.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C, 32–42.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Yagi, K., Komura, S., Kojima, H., Sun, Q., Nagata, N., Ohishi, N., Nashikimi, M., 1996. Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxide-mediated injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 486–491.
- Yamamoto, Y., Takahashi, K., 1993. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 541–545.
- Zhang, L., Maiorino, M., Roveri, A., Ursini, F., 1989. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1006, 140–143.

Hydroperoxy Fatty Acid Cycling Mediated by Mitochondrial Uncoupling Protein UCP2*

Received for publication, May 13, 2004, and in revised form, September 20, 2004
Published, JBC Papers in Press, October 8, 2004, DOI 10.1074/jbc.M405339200

Martin Jabůrek‡, Sayuri Miyamoto§, Paolo Di Mascio§, Keith D. Garlid||, and Petr Ježek‡**

From the ‡Department of Membrane Transport Biophysics, No.75, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, CZ 14220 Czech Republic, the §Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, São Paulo University, CP26077, CEP05513-970 Brazil, and the ||Department of Biology, Portland State University, Portland, Oregon 97207-0751

Functional activation of mitochondrial uncoupling protein-2 (UCP2) is proposed to decrease reactive oxygen species production. Skulachev and Goglia (Skulachev, V. P., and Goglia, F. (2003) *FASEB J.* 17, 1585–1591) hypothesized that hydroperoxy fatty acid anions are translocated by UCPs but cannot flip-flop across the membrane. We found that the second aspect is otherwise; the addition of synthesized linoleic acid hydroperoxides (LAOOH, a mix of four isomers) caused a fast flip-flop-dependent acidification of liposomes, comparable with the linoleic acid (LA)-dependent acidification. Using *Escherichia coli*-expressed UCP2 reconstituted into liposomes we found that LAOOH induced purine nucleotide-sensitive H^+ uniport in UCP2-proteoliposomes with higher affinity than LA (K_m values 97 μM for LAOOH and 275 μM for LA). In UCP2-proteoliposomes LAOOH also induced purine nucleotide-sensitive K^+ influx balanced by anionic charge transfer, indicating that LAOOH was also transported as an anion with higher affinity than linoleate anion, the K_m values being 90 and 350 μM , respectively. These data suggest that hydroperoxy fatty acids are transported via UCP2 by a fatty acid cycling mechanism. This may alternatively explain the observed activation of UCP2 by the externally generated superoxide. The ability of LAOOH to induce UCP2-mediated H^+ uniport points to the essential role of superoxide reaction products, such as hydroperoxyl radical, hydroxyl radical, or peroxyxynitrite, initiating lipoperoxidation, the released products of which support the UCP2-mediated uncoupling and promote the feedback down-regulation of mitochondrial reactive oxygen species production.

Mitochondria produce a substantial amount of superoxide anion (O_2^-) (1–11) at Complex I (by a yet unresolved mechanism, O_2^- is

released to the matrix) (2) and via autooxidation of the ubisemiquinone anion radical at Complex III (1–11), where O_2^- could be released into both sides of the membrane (2). A spectrum of radical and non-radical compounds is produced from O_2^- , which are commonly called reactive oxygen species (ROS).¹ These include radicals (O_2^- , hydroperoxyl ($HO_2^\cdot$), hydroxyl ($^\cdot OH$), peroxy ($RO_2^\cdot$), alkoxy ($RO^\cdot$)) and nonradical species such as H_2O_2 and singlet oxygen (3, 4). The list is extended by peroxyxynitrite, which is formed by the reaction of O_2^- with nitric oxide, $^\cdot NO$ (12, 13). Most of the O_2^- is converted to H_2O_2 by matrix manganese-superoxide dismutase (14) and by cytosolic CuZn-superoxide dismutase, which exists also in the mitochondrial intramembrane space (2). H_2O_2 , which has been recognized as an important signaling molecule (15–17), is then degraded by several redox systems, including glutathione peroxidases, which reduce H_2O_2 to water (3–7). At pH 6.8, $\sim 1\%$ of O_2^- is protonated to highly reactive species, hydroperoxyl radical $HO_2^\cdot$ (pK_a 4.8) (4). H_2O_2 may be converted into highly reactive $^\cdot OH$ by a reaction with transition metals, namely with Fe^{2+} (Fenton reaction) (3, 4).

The $^\cdot OH$ is an extremely reactive oxidizing radical that will react to most biomolecules at diffusion-controlled rates. The hydroxyl radical can also oxidize nitrite to nitrogen dioxide ($^\cdot NO_2$) and react with bicarbonate yielding the very reactive carbonate radical anion under physiological conditions (4). All of these highly reactive radicals ($HO_2^\cdot$, $^\cdot OH$, and $CO_3^{\cdot -}$) attack proteins and DNA, but, in addition, a substantial lipoperoxidation must occur *in vivo*, because polyunsaturated hydrocarbon chains are very susceptible to allelic hydrogen abstraction (3, 4, 18–20). Once carbon-centered lipid radicals ($RC^\cdot R$) are generated, they react with O_2 giving peroxy radicals ($ROO^\cdot$), which react for example with the neighbor polyunsaturated hydrocarbon side chain yielding hydroperoxides ($ROOH$) and other $RC^\cdot R$. The reaction is thus propagated by many cycles (18). Fatty acid hydroperoxides (FAOOH) can be cleaved off from the phospholipids by phospholipase A_2 (PLA_2) (20), e.g. by its mitochondrial Ca^{2+} -dependent isoform induced by superoxide (21) or by the Ca^{2+} -independent isoform. FAOOH are transient, non-radical but reactive species, which are eventually degraded by glutathione peroxidase or phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase to the corresponding hydroxy fatty acids (FAOH). FAOOH may also decompose to toxic epoxy acids and $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -unsaturated aldehydes (18).

It has been found that even a slight increase of H^+ backflow into the matrix may substantially suppress mitochondrial ROS formation (7–11). The physiological H^+ backflow during ATP

* This work was supported by grants from the Internal Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (A5011106), the Czech Ministry of Education (1K03002), the Grant Agency of the Czech Republic (204/04/0495), the Institute of Physiology (AVOZ5011922), the Fogarty International National Institutes of Health Grant TW01487, the National Institutes of Health Grant DK 56273, and grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CHPq), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX/FINEP) as well as the John Simon Guggenheim Memorial Foundation (to P. D. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Recipient of FAPESP fellowships.

** To whom correspondence should be addressed: Dept. No.75, Membrane Transport Biophysics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic. Tel.: 011-420-296442760; Fax: 011-420-296442488; E-mail: jezek@biomed.cas.cz.

¹ The abbreviations used are: ROS, reactive oxygen species; FA(s), fatty acid(s); FAOH, hydroxy-fatty acid; FAOOH or FAOOH-COOH, fatty acid hydroperoxides; HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; LA, linoleic acid; LAOOH, linoleic acid hydroperoxides; PLA_2 , phospholipase A_2 ; PUFAs, polyunsaturated FAs; SPQ, 6-methoxy-*N*-(3-sulfopropyl)quinolinium; TES, *N*-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid; UCP2, “ubiquitous” uncoupling protein; UCP, uncoupling protein.

synthesis also suppresses ROS formation (7–9); therefore most ROS are produced in the non-phosphorylating state. This effect of uncoupling or ATP synthesis is due to increased respiration and hence concomitantly shortened lifetime of UQ^+ and the lowered oxygen tension in the microenvironment which results in reduced rate of O_2^- formation (7–11). These considerations led to the proposal that a physiological role of uncoupling protein-2 (UCP2), which is present in very low amounts in most tissues (22–32), is to down-regulate mitochondrial ROS production (25, 26). The ability to reduce ROS and/or lipoperoxidation not only locally in the mitochondria but within the cell or even in the extracellular space has also been ascribed to these novel UCPs (28, 29).

Brand and co-workers (33, 34) stated initially that superoxide itself “activates” UCP2 by an unspecified mechanism from the matrix side. This is an attractive proposal, because it provides a feedback mechanism for the control of mitochondrial ROS production. Recently, however, that group has abandoned the direct interaction of O_2^- with UCP2 and instead ascribes this ability to end-products of the lipoperoxidation cascade, such as 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) (35–37). They found that mitochondrially targeted α -phenyl-*N*-tert-butyl nitrone prevented UCP2 activation by externally produced O_2^- but did not prevent activation by HNE, indicating that the HNE effect occurs downstream (36). Brand and co-workers (36) therefore predict a direct (covalent) interaction of ROS-derived activators with UCP2.

We suggest an alternative mechanism in which the FAOOH produced by elevated ROS behave as cycling substrates of the UCPs. In this mechanism, UCP acts as a flipase to transport the fatty acid (FA) anionic head group across the membrane. The FA is protonated and rapidly flip-flops back across the membrane, delivering protons electroneutrally across the membrane (38–46). Thus, FAs are not viewed as allosteric activators but rather as the transported substrates of any UCP. Skulachev and Goglia (47) have speculated that FAOOH-COO[−] may be the anionic transport substrates of the UCPs, but they predicted that the protonated FAOOH-COOH cannot diffuse through the membrane, which would prevent uncoupling. If that speculation were correct, FAOOH would behave like long-chain alkylsulfonates (38, 43) or so-called inactive FAs (48, 49). The strong acidic character of the former (38, 43) and a “U-shape” of the latter compounds in the membrane (48) prevent their flip-flop with protons across the bilayer.

We examined interactions of linoleic acid hydroperoxides (LAOOH) (50, 51) with liposomal membranes and with reconstituted UCP2. We found that LAOOH does rapidly flip-flop across the membrane, resulting in the delivery of protons to the interior. Moreover, LAOOH supports uncoupling in liposomes containing UCP2, and it does so with a higher affinity than was observed for linoleic acid itself. We concluded that LAOOH is an efficient cycling substrate of UCP2. The finding that FAOOH supports UCP-mediated uncoupling suggests an alternative explanation for the reported activation of UCP2 by externally generated superoxide observed exclusively in the presence of FAs (33). Our suggested mechanism may serve physiologically as a feedback regulation accelerating the suppression of mitochondrial ROS production.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Most of the chemicals were purchased from Sigma. LAOOH (Fig. 1) was synthesized in the São Paulo laboratory as described previously (50, 51). Hydroxylapatite, Bio-Gel HTP, and Bio-Beads SM2 were from Bio-Rad. Octylpentaoxyethylene was from Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland. Other materials for reconstitution were from the same sources as described elsewhere (32, 38–39, 43, 45, 46). All other chemicals were of a reagent grade.

FIG. 1. **Schema of four isomers of LAOOH and their dissociated forms.** Linoleic acid hydroperoxides exist in the neutral forms with undissociated carboxyls or in anionic forms after H^+ dissociation from carboxyls.

Escherichia coli Expression of UCP2—Bacterial strains BL21 (Novagen) containing plasmids pET21a with inserted cDNA, coding for human UCP2, were donated by Dr. R. E. Gimeno and Louis A. Tartaglia (Millennium Pharmaceuticals, Inc., Cambridge, MA). Cell cultures were grown, and the expression of UCP2, induced by isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside and including the inclusion bodies preparation, was performed as previously described (45). Protein content was assayed by the Amido Black method (52).

Extraction of UCP2 from Inclusion Bodies—A pelleted aliquot of inclusion bodies (~2 mg of protein) was washed and solubilized with Sarkosyl as described previously (46). The resulting supernatant was diluted rapidly in 6 ml of 10% glycerol, 1% Triton X-114, and 1 mM ATP. This mixture was supplemented with 0.8 g of Dowex 11A8 and incubated for 2 h at 4 °C with constant mixing. The extract was passed through an additional Dowex 11A8 column (2.5 ml). The collected protein was supplemented with 0.1 mM ATP and 20 mg of soybean asolectin/mg of starting protein. The resulted extract was incubated overnight at 4 °C and concentrated using the Ultrafree-15 centrifugal filter device (Millipore). Aliquots of ~0.6 mg of protein were stored at −80 °C.

Purification and Reconstitution of E. coli-expressed UCP2—The extracted protein was dialyzed twice for 3 h and once overnight at a 1:100 dilution against the internal medium (tetraethylammonium salts of 30 mM TES, 80 mM SO_4 , 2 mM EDTA, pH 7.2). The dialyzed protein was centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min to remove any precipitate, and the supernatant was passed through a hydroxylapatite (Bio-Gel HTP) column (46). The recombinant UCP2 was reconstituted into liposomes as described recently (46). Reconstitution involved supplementing the extract by additional lipids (solubilized in octylpentaoxyethylene and adjusted to total 40 mg of egg yolk lecithin, type XI-E, supplemented with 5% cardiolipin), detergent removal on Bio-Beads SM2, and external probe removal on Sephadex G50–300. The protein content of proteoliposomes was estimated by the Amido Black method (52). Usually, a lipid-to-protein ratio of about 200 or higher was obtained.

Fluorescent Monitoring of K^+ and H^+ Fluxes in Proteoliposomes—Ion fluxes in proteoliposomes were measured using a RF5301 PC fluorometer (Shimadzu, Japan), equipped with polarization filters (Polaroid) in cross-orientation, to decrease interference by scattered light. Proton fluxes, i.e. changes of intraliposomal H^+ concentration, were monitored by SPQ fluorescence changes (2 mM SPQ) because of quenching by the TES anion (38, 39, 43, 45, 46). Potassium influx was monitored by 0.2 mM potassium-binding benzofuran isophthalate (38, 39, 43, 45, 46). Proteoliposomes (1 mg of phospholipids) were assayed in 2 ml of medium containing 80 mM K_2SO_4 , 30 mM K-TES, 2 mM K-EGTA, pH 7.2, at 25 °C. Ethanol solutions of FAs were added, and the transport, driven by a K^+ gradient, was initiated by the addition of 100 nM valinomycin. Each preparation was individually calibrated for fluorescence probe responses, and the internal volume of vesicles was estimated from the volume of distribution of the fluorescent probe.

RESULTS

Flip-Flop Acidification of Liposome Interior upon Addition of LAOOH—To determine whether protonated fatty acid hydroperoxides are capable of crossing the lipid bilayer, we studied the interior acidification of liposomes caused by the addition of LAOOH. The addition of 100 μ M linoleic acid causes a

reduced quenching of SPQ fluorescence, demonstrating acidification of liposomes by FA (Fig. 2A, trace a). The addition of 100 μM LAOOH caused an identical reduction in SPQ quenching (Fig. 2A, trace b), demonstrating the ability of LAOOH to cross the lipid bilayer in the protonated form. Fig. 2B shows that the extent of total H^+ release depends on the amount of FA added for both linoleic acid (squares) and LAOOH (circles). Previous results showed that FAs yield $\sim 2.5\%$ of their protons to the intraliposomal compartment (48). For LAOOH and linoleic acid the observed yield was 2.2–2.5% at pH 7.2 (Fig. 2B), which is in good agreement with the previous results. We concluded that the ability of LAOOH to flip-flop across the lipid bilayer is similar to the flip-flop of linoleic acid and other natural FAs.

LAOOH Cycling Mediated by UCP2 Reconstituted in Liposomes—Electrophoretic H^+ flux in proteoliposomes was initiated by adding valinomycin in the presence of an inward K^+ gradient. LAOOH induced an H^+ efflux (Fig. 3, trace a) that was inhibited up to 50% by 2.5 mM GDP added to the assay medium (Fig. 3, trace b). Similar inhibition was observed when 2.5 mM ATP was used (not shown). The results with LAOOH were similar to those obtained using the parent FA, linoleic acid (Fig. 3, trace c). In protein-free liposomes neither LAOOH nor linoleic acid induced substantial H^+ efflux (Fig. 3, traces d and e). Moreover, this background H^+ efflux in liposomes was similar to fluxes obtained when 2.5 mM ATP was present inside and outside of the UCP2-containing proteoliposomes (not shown). The lack of H^+ efflux in the absence of UCP2 and the observed inhibition by purine nucleotides indicate the participation of UCP2. Although the extent of flip-flop acidification was equal for 100 μM LAOOH and 100 μM linoleic acid, LAOOH induced faster H^+ efflux of a higher extent in UCP2-proteoliposomes (Fig. 3, trace a versus c).

Kinetics of LAOOH-COO⁻/LAOOH-COOH Cycling as Compared with Linoleate/Linoleic Acid Cycling—To examine the ability of LAOOH to cause faster UCP2-catalyzed H^+ fluxes than linoleic acid, we varied the total concentration of added FA and evaluated kinetics of valinomycin-induced H^+ efflux. The obtained rates were corrected for fluxes in the absence of UCP2, and the net fluxes were normalized to the protein content (Fig. 4). We found that the apparent affinity of UCP2 for LAOOH and LA, taken as the reciprocal K_m from an Eadie-Hofstee plot (Fig. 4), is higher for the hydroperoxide mixture

(LAOOH) than for LA. The apparent K_m was 97 μM for LAOOH and 275 μM for linoleic acid, whereas the V_{max} values were quite similar, 18.8 or 17.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg of protein})^{-1}$, respectively (Fig. 4). In a series of four experiments, the mean value ($\pm$ S.D.) of K_m for the LAOOH-induced H^+ fluxes was $97 \pm 18 \mu\text{M}$, and the V_{max} was $\sim 20 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot(\text{mg of protein})^{-1}$, whereas the K_m for linoleic acid was $290 \pm 40 \mu\text{M}$. If we assume that the kinetics of FA-dependent UCP2-catalyzed H^+ fluxes consist of the flip-flop of protonated FA and UCP-catalyzed uniport of FA anion, we conclude that because the flip-flop activities of LAOOH and linoleic acid are similar, the differences between K_m values must originate in the interactions between UCP2 and FA.

Uniport of LAOOH-COO⁻ Anions and Linoleate Mediated by the Reconstituted UCP2—To demonstrate that mitochondrial

Uniport of LAOOH-COO⁻ Anions and Linoleate Mediated by the Reconstituted UCP2—To demonstrate that mitochondrial

FIG. 4. Kinetics of LAOOH cycling mediated by UCP2 reconstituted in liposomes as compared with linoleic acid cycling. Concentration dependence of linoleic acid-dependent (squares) or LAOOH-dependent (circles) proton fluxes mediated by reconstituted recombinant UCP2, expressed in *E. coli*. Eadie-Hofstee plots were constructed for the net H^+ fluxes corrected for leak values estimated in protein-free liposomes. The derived K_m was $97 \mu M$ for LAOOH and $275 \mu M$ for linoleic acid, whereas the V_{max} values were 18.8 and $17.7 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ of protein})^{-1}$, respectively.

uncoupling protein UCP2 is able to mediate uniport of anionic hydroperoxy derivatives of linoleic acid, we measured the charge transfer in proteoliposomes containing UCP2 by measuring the concomitant K^+ influx detected by the fluorescent probe potassium-binding benzofuran isophthalate. A rapid K^+ influx ensues upon addition of valinomycin for both LAOOH (Fig. 5, trace a) and LA (trace c). The K^+ influx associated with LAOOH- COO^- transport was inhibited by 2.5 mM ATP added to the assay medium (Fig. 5, trace b). In protein-free liposomes, no such charge transfer occurs with either LAOOH or LA (Fig. 5, traces d and e). The background K^+ fluxes in the absence of UCP2 were similar to K^+ fluxes obtained when 2.5 mM ATP was present inside and outside of the proteoliposomes containing UCP2 (not shown). These data indicate that the influx of hydroperoxy linoleic acid anions, detected as K^+ -influx-compensating anion charge influx, is faster than the influx of the linoleic acid anions. The sensitivity of these fluxes to ATP and their absence in liposomes indicates participation of UCP2.

Kinetics of UCP2-catalyzed LAOOH- COO^- Uniport as Compared with Linoleate Uniport—By varying the total LAOOH concentration we evaluated the kinetics of hydroperoxylinoleate anion and linoleate uniport, as estimated from potassium-binding benzofuran isophthalate fluorescence in proteoliposomes containing UCP2 (Fig. 6). The obtained rates were corrected for fluxes in the absence of UCP2 and the net fluxes were normalized to protein content. The apparent K_m was $90 \mu M$ for LAOOH- COO^- and $350 \mu M$ for linoleate. The V_{max} values were again similar, 18.6 and $17.0 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ of protein})^{-1}$, respectively. In a series of three experiments, the calculated mean K_m for the LAOOH-induced H^+ fluxes was $90 \pm 19 \mu M$ (S.D.) and the V_{max} was $\sim 20 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ protein})^{-1}$. The K_m for linoleic acid was $364 \pm 35 \mu M$. These values are in good agreement with those obtained by measuring H^+ fluxes.

DISCUSSION

We demonstrated that hydroperoxy derivatives of linoleic acid, like linoleic acid itself, are able to transport protons across

FIG. 5. Uniport of LAOOH- COO^- and linoleate anions mediated by the reconstituted UCP2. Shown are traces of potassium-binding benzofuran isophthalate fluorescence in liposomes containing (traces a–c) or lacking (traces d and e) UCP2 and in the presence of $100 \mu M$ FA, either with LAOOH (traces a, b, and e) or linoleic acid (traces c and d). Addition of 100 nM valinomycin (val) led to a fast K^+ influx with LAOOH (trace a), which was inhibited by external 2.5 mM ATP (trace b), or to a moderate K^+ influx with linoleic acid (trace c). Only a negligible K^+ influx was observed in UCP2-free liposomes either with LAOOH (trace e) or linoleic acid (trace d).

FIG. 6. Kinetics of UCP2-mediated LAOOH- COO^- anion uniport as compared with linoleate uniport. Concentration dependence of linoleic acid-dependent (squares) or LAOOH-dependent (circles) K^+ influx compensating the respective FA anion influx mediated by UCP2. Eadie-Hofstee plots were constructed for the net fluxes corrected for the values of background K^+ influx estimated in protein-free liposomes. The derived K_m was $90 \mu M$ for LAOOH and $350 \mu M$ for linoleic acid, whereas the V_{max} values were 18.6 and $17.0 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot (mg \text{ of protein})^{-1}$, respectively.

the lipid bilayer by a flip-flop mechanism. LAOOH also supports uncoupling via UCP2, presumably by UCP-mediated transport of its anionic form LAOOH- COO^- (38–46). In these respects, LAOOH behaves like other FAs, including its parent compound, linoleic acid. The finding that LAOOH is a substrate for UCP2 has several consequences. First, it suggests a feedback control mechanism by the lipoperoxidation products of increased ROS production, which stimulates UCP2-mediated uncoupling, which in turn might lead to the suppression of ROS production (7–11) (Fig. 7). Such stimulation may persist longer than the FA hydroperoxides because of their reduction by glutathione peroxidases to hydroxy-FAs (53), which likely also activate UCP2 to be its transport substrates. A second consequence of our results is that the proposed activation of UCP2 by

FIG. 7. Model for feedback down-regulation of mitochondrial ROS production by lipoperoxidation products that activate UCP2. In mitochondria, superoxide, released to both sides of the inner membrane (2), is either hydrated to $\text{HO}_2^\cdot$ or is processed by matrix manganese superoxide dismutase or intermembrane space CuZn-superoxide dismutase to H_2O_2 , which can be further converted to hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$, namely by Fenton chemistry catalyzed by Fe^{2+}). Both highly reactive radicals, $\text{HO}_2^\cdot$ and $\cdot\text{OH}$, initiate lipoperoxidation during which carbon-centered radicals ($\text{RC}^\cdot$) are formed first. They react with O_2 giving peroxy radicals ($\text{ROO}^\cdot$), which react for example with the neighbor polyunsaturated hydrocarbon side chain yielding hydroperoxides (ROOH) and other $\text{RC}^\cdot$. The reaction is thus propagated by many cycles (18). FAOOH can be cleaved off from the phospholipids by PLA_2 (20, 21). Hydroperoxide-FA can cycle, being expelled from the matrix side via UCP2, in its anionic form and carries H^+ and provides mild uncoupling while returning back in its protonated form. Such uncoupling can attenuate mitochondrial superoxide production. Consequently, a feedback down-regulation is achieved.

superoxide (33, 34) may in fact be because of a superoxide-induced increase in substrate for UCP2-mediated uncoupling.

Echtay *et al.* (33, 34) originally proposed the direct interaction of superoxide with UCP2, but, as this was unlikely, they reformulated the sequence as a direct interaction of downstream products of lipid peroxidation, such as HNE (36). Note that the reported activation proceeded in the presence of FAs (33), hence modification of the added or endogenous FAs to FA hydroperoxides cannot be excluded. Echtay *et al.* (33, 34) have not specified any molecular mechanism for the increased H^+ flux mediated by such interaction. Moreover, Echtay *et al.* (33) used isolated mitochondria under highly oxidative conditions² and with exogenously produced superoxide. It is unlikely that $\text{O}_2^\cdot$ or $\text{HO}_2^\cdot$ and $\cdot\text{OH}$ can cross the membrane as assumed (36). O_2 could cross only if translocated by a carrier; $\text{HO}_2^\cdot$ and $\cdot\text{OH}$ cannot diffuse through a membrane without reacting with the membrane components. Under these conditions, the complexity of mitochondria makes it difficult to identify the specific site of action of superoxide. Questions may also be raised about the rather high concentrations of HNE required to modify mitochondria and/or UCP2 (35). Indeed, we showed that the lipoperoxidation products formed upstream of aldehydes are true cycling substrates of UCP2 and support uncoupling prior to being converted to end-products such as HNE. Moreover, they are predominantly degraded to hydroxy-FAs, which are likely cycling substrates of UCP2 as well.

It should be noted that unsaturated FA content is significant in cells (55). For example, docosahexaenoic acid ($\text{C}_{22:6}(\omega-3)$) comprises ~30% of brain tissue lipid side-chains (56). If only a fraction is peroxidized and cleaved off, a significant amount of FA substrate will be available to support uncoupling by UCP. The significance is enhanced by the fact that mitochondrial PLA_2 is activated by superoxide (21, 57), thus liberating free FAs or FAOOH or FAOH . Moreover, polyunsaturated (PU) FAs

are themselves efficient substrates of UCP2 (32), so under conditions of elevated PUFAs, UCP2-mediated suppression of ROS production takes place as well. Note that like PUFAs (32), LAOOH possesses a higher apparent affinity for the reconstituted UCP2 than major natural saturated or mono- or diunsaturated FAs.

The role of UCP2 in feedback down-regulation of ROS production by mitochondria may be important physiologically. UCP2 has been implicated in reducing the size of atherosclerotic plaques (29) and in influencing the lipoperoxidation state of low density lipoproteins when co-incubated with endothelial cells in which UCP2-induced uncoupling has taken place (28). UCP2 has also been implicated in improving brain recovery after stroke and preventing neurodegeneration (30) and playing a role in $\cdot\text{NO}$ production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages (27). These results support the importance of processes that regulate mitochondrial ROS production. Lipid peroxidation is a component of physiological and pathophysiological processes such as proliferation, inflammation, and aging (18). Enzymatic lipoperoxidation, in which PUFAs liberated by PLA_2 are oxidized by lipoxygenases, is an important component of cell signaling (15). An excess of PUFAs leads to the release of free iron ions from lipoxygenase and initiates further lipoperoxidation chain reactions that may induce apoptosis (18, 58, 59).

Despite the importance of feedback down-regulation of mitochondrial ROS production, the mechanism remains poorly understood. We suggest that the UCP2-mediated cycling of fatty acid hydroperoxides described here provides a plausible mechanism that is consistent with what is known about the UCP subfamily. In conclusion, two mechanisms were suggested so far for a feedback regulation by which ROS themselves suppress mitochondrial ROS production, (i) the mechanism Brand and co-workers (36) of direct but unexplained activation of UCP2 by certain ROS-derived activators and (ii) the cycling of fatty acid hydroperoxides (and products of their detoxification like hydroxy-fatty acids) mediated by UCP2 (Fig. 7). The UCP2 provides an efflux of their anions, which after protonation spontaneously flip-flop back across the membrane. This mechanism is more plausible, because FAOOH are liberated under lipid peroxidation and are degraded to FAOH , which are UCP2 cycling substrates as well.

² Experiments on isolated mitochondria are traditionally conducted at normal atmospheric pressure with isolated mitochondria contaminated by iron (in reagents or released from proteins) *i.e.* under highly oxidative conditions. By contrast, *in situ* mitochondria sense O_2 levels as low as 0.3 kilopascals (2 torr, 3 μM) (54), iron traffic is limited and highly controlled, and cytosolic antioxidant mechanisms are present. The artificially established *in vitro* conditions when superoxide is externally developed (33) are thus far from the realistic *in vivo* conditions.

Acknowledgments—We thank Ian C. West and Lydie Hlavatá for a critical reading of the manuscript and Jana Brucknerová and Jitka Smíková for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Loschen, G., Flohe, L., and Chance, B. (1971) *FEBS Lett.* **18**, 261–264
- Muller, F. L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (August 17, 2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10.1074/jbc.M407715200
- Droge, W. (2002) *Physiol. Rev.* **82**, 47–95
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2002) *Free Radicals in Biology and Medicine*, pp. 936, Oxford University Press
- Cadenas, E., and Davies, K. J. A. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230
- Raha, S., and Robinson, B. H. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 502–507
- Skulachev, V. P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 100–124
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) *FEBS Lett.* **416**, 15–18
- Korshunov, S. S., Korkina, O. V., Ruuge, E. K., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1998) *FEBS Lett.* **435**, 215–218
- Kowaltowski, A. J., Costa, A. D. T., and Vercesi, A. E. (1998) *FEBS Lett.* **425**, 213–216
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002) *J. Neurochem.* **80**, 780–787
- Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–C1437
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26066–26075
- Melov, S. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 219–225
- Sen, C. K., and Packer, L. (1996) *FASEB J.* **10**, 709–720
- Xie, Z., Kometiani, P., Liu, J., Li, J., Shapiro, J. I., and Askari, A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19323–19328
- Garlid, K. D., Dos Santos, P., Xie, Z. J., Costa, A. D. T., and Paucek, P. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1606**, 1–21
- Spiteller, G. (2002) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 30–44
- Aikens, J., and Dix, T. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15091–15098
- Miyamoto, S., Dupas, C., Murota, K., and Terao, J. (2003) *Lipids* **38**, 641–649
- Guidarelli, A., and Cantoni, O. (2002) *Biochem. J.* **366**, 307–314
- Ježek, P. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1190–1206
- Gimeno, R. E., Dembski, M., Weng, X., Shyjan, A. W., Gimeno, C. J., Iris, F., Ellis, S. J., Deng, N., Woolf, E. A., and Tartaglia, L. A. (1997) *Diabetes* **46**, 900–906
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Lévi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D., and Warden, C. H. (1997) *Nat. Genet.* **15**, 269–272
- Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Caestecla, L. A. (1997) *FASEB J.* **11**, 809–815
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., and Ricquier, D. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 435–439
- Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Taniguchi, N., Saigon, D., Watanabe, K., Onoe, K., Day, N. K., Good, R. A., and Ohno, H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9392–9397
- Duval, C., Nègre-Salvayre, A., Doglio, A., Salvayre, R., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2002) *Biochem. Cell Biol.* **80**, 757–764
- Blanc, J., Alves-Guerra, M. C., Esposito, B., Rousset, S., Gourdy, P., Ricquier, D., Tedgui, A., Miroux, B., and Mallat, Z. (2003) *Circulation* **107**, 388–390
- Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., Warden, C. H., Castilho, R. F., Melcher, T., Gonzalez-Zulueta, M., Nikolich, K., and Wieloch, T. (2003) *Nat. Med.* **9**, 1062–1068
- Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.-C., Gelly, C., Lévi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., and Miroux, B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8705–8712
- Žáková, M., Škobisová, E., Urbánková, E., and Ježek, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20761–20769
- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabson, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C., and Brand, M. D. (2002) *Nature* **415**, 96–99
- Echtay, K. S., Murphy, M. P., Smith, R. A. J., Talbot, D. A., and Brand, M. D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47129–47135
- Echtay, K. S., Esteves, T. C., Pakay, J. L., Jekabson, M. B., Lambert, A. J., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Vidal-Puig, A. J., Wang, S., Roebuck, S. J., and Brand, M. D. (2003) *EMBO J.* **22**, 4103–4110
- Murphy, M. P., Echtay, K. S., Blaikie, F. H., Asin-Cayuela, J., Cochemé, H. M., Green, K., Buckingham, J., Taylor, E. R., Hurrell, F., Hughes, G., Miwa, S., Cooper, C. E., Svistunenko, D. A., Smith, R. A. J., and Brand, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 48534–48545
- Talbot, D. A., Lambert, A. J., and Brand, M. D. (2004) *FEBS Lett.* **556**, 111–115
- Garlid, K. D., Orosz, D. E., Modrianský, M., Vassanelli, S., and Ježek, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2615–2620
- Ježek, P., Modrianský, M., and Garlid, K. D. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 166–170
- Garlid, K. D., Jabůrek, M., and Ježek, P. (1998) *FEBS Lett.* **438**, 10–14
- Garlid, K. D., Jabůrek, M., Ježek, P., and Vařecha, M. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 383–389
- Garlid, K. D., Jabůrek, M., and Ježek, P. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 803–806
- Jabůrek, M., Vařecha, M., Ježek, P., and Garlid, K. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 31897–31905
- Urbánková, E., Voltchenko, A., Pohl, P., Ježek, P., and Pohl, E. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32497–32500
- Jabůrek, M., Vařecha, M., Gimeno, R. E., Dembski, M., Ježek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L. A., and Garlid, K. D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26003–26007
- Jabůrek, M., and Garlid, K. D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25825–25831
- Skulachev, V. P., and Goglia, F. (2003) *FASEB J.* **17**, 1585–1591
- Ježek, P., Modrianský, M., and Garlid, K. D. (1997) *FEBS Lett.* **408**, 161–165
- Bernardi, P., Penzo, D., and Wojtczak, L. (2003) in *Vitamins and Hormones* (Litwack, G., ed), Vol. 65, pp. 97–126, Academic Press, Boston
- Lima, E. S., Di Mascio, P., Rubbo, H., and Abdalla, D. S. (2002) *Biochemistry* **41**, 10717–10722
- Miyamoto, S., Martínez, G. R., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6172–6179
- Kaplan, R. S., and Pedersen, P. L. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 97–104
- Girotti, A. W. (1998) *J. Lipid Res.* **39**, 1529–1542
- Gnaiger, E. (2003) in *Hypoxia: Through the Lifecycle* (Roach, R. C., Wagner, P. D., and Hackett, P. H., eds) pp. 1–16, Kluwer Academics / Plenum Publishers, New York
- Deiana, M., Aruoma, O. I., Rosa, A., Crobuz, V., Casu, V., Piga, R., and Dessi, M. A. (2001) *Toxicol. Lett.* **123**, 125–133
- Connor, W. E. (2000) *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, (suppl.) 171–175
- Madesh, M., and Balasubramanian, K. A., (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 187–192
- Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 323–333
- Kim, J.-S., He, L., and Lemasters, J. J. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 463–470

Production of the Carbonate Radical Anion during Xanthine Oxidase Turnover in the Presence of Bicarbonate*

Received for publication, June 22, 2004, and in revised form, September 20, 2004
Published, JBC Papers in Press, September 22, 2004, DOI 10.1074/jbc.M406929200

Marcelo G. Bonini‡, Sayuri Miyamoto‡, Paolo Di Mascio, and Ohara Augusto§

From the Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, São Paulo CEP 05513-970, Brazil

Xanthine oxidase is generally recognized as a key enzyme in purine catabolism, but its structural complexity, low substrate specificity, and specialized tissue distribution suggest other functions that remain to be fully identified. The potential of xanthine oxidase to generate superoxide radical anion, hydrogen peroxide, and peroxynitrite has been extensively explored in pathophysiological contexts. Here we demonstrate that xanthine oxidase turnover at physiological pH produces a strong one-electron oxidant, the carbonate radical anion. The radical was shown to be produced from acetaldehyde oxidation by xanthine oxidase in the presence of catalase and bicarbonate on the basis of several lines of evidence such as oxidation of both dihydrorhodamine 123 and 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide and chemiluminescence and isotope labeling/mass spectrometry studies. In the case of xanthine oxidase acting upon xanthine and hypoxanthine as substrates, carbonate radical anion production was also evidenced by the oxidation of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide and of dihydrorhodamine 123 in the presence of uricase. The results indicated that Fenton chemistry occurring in the bulk solution is not necessary for carbonate radical anion production. Under the conditions employed, the radical was likely to be produced at the enzyme active site by reduction of a peroxymonocarbonate intermediate whose formation and reduction is facilitated by the many xanthine oxidase redox centers. In addition to indicating that the carbonate radical anion may be an important mediator of the pathophysiological effects of xanthine oxidase, the results emphasize the potential of the bicarbonate-carbon dioxide pair as a source of biological oxidants.

Xanthine oxidoreductase is a complex enzyme comprising two identical subunits of M_r 145,000 each containing one molybdenum, one FAD, and two nonidentical iron sulfur centers (reviewed in Refs. 1–3). Largely because of its easy isolation from cow milk, xanthine oxidoreductase has been used as a model protein for structural and mechanistic studies of redox enzymes for over 60 years. Although xanthine oxidoreductase

has broad specificity for both oxidizing and reducing substrates, its conventionally accepted role is in purine metabolism, where it sequentially catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and of xanthine to uric acid. In mammals, the enzyme exists in two interconvertible forms: xanthine dehydrogenase (EC 1.1.1.204), which predominates *in vivo*, and xanthine oxidase (XO¹; EC 1.1.3.22), which is the form usually isolated from biological sources. The enzyme is widely distributed throughout different mammalian tissues, but particularly high activities have been found in the liver and intestine (reviewed in Refs. 1–3).

Both xanthine dehydrogenase and XO can reduce molecular oxygen with production of superoxide radical anion and hydrogen peroxide at proportions that depend on the substrate and oxidation conditions (Reactions 1–3) (4–8).

REACTIONS 1–3

Thus, the enzyme has been extensively used as a source of the so-called reactive oxygen species, particularly as a source of the superoxide radical anion. The potential of the enzyme to generate superoxide radical anion and hydrogen peroxide has led to widespread interest in its roles in numerous pathological states, including ischemia-reperfusion, hypoxia-reoxygenation, multiple organ dysfunction, preservation-transplantation, and vascular disease (3, 9, 10). Possible roles of XO in pathological processes have been reinforced by the recent demonstration that it may also generate reactive nitrogen species such as peroxynitrite, which is a potent biological oxidant. Indeed, XO has been shown to be able to use both NADH and xanthine to reduce nitrite to nitric oxide (11–15), and the concomitant production of the superoxide radical anion, which reacts with nitric oxide in a diffusion-controlled process, results in peroxynitrite formation (16).

Relevantly, XO has been proposed by Hodgson and Fridovich

* This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Financiadora de Estudos e Projetos, and the John Simon Guggenheim Memorial Foundation (P. D. Mascio Fellowship). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Recipient of an FAPESP fellowship.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-11-30913873; Fax: 55-11-30912186 or 55-11-38155579; E-mail: oaugusto@iq.usp.br.

¹ The abbreviations used are: XO, xanthine oxidase; bicarbonate, the sum of bicarbonate (HCO_3^-) and carbon dioxide (CO_2) unless specified; DHR, dihydrorhodamine 123; DMPO, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide; DTPA, diethylenetriaminepentaacetic acid; peroxynitrite, the sum of peroxynitrite anion (ONOO^- , oxoperoxonitrate (–1)) and peroxynitrous acid (ONOOH , hydrogen oxoperoxonitrate) unless specified; MS, mass spectrometry.

FIG. 1. Schematic representation of a route proposed for carbonate radical anion production during XO turnover in biological environments. This model is modified from Ref. 21 to account for the data presented in Refs. 28 and 29 and here. *S* and *S*_{ox}, a general substrate and its two-electron oxidation product, respectively.

(17) to be able to generate yet another strong one-electron oxidant, the carbonate radical anion. Formation of this radical through Fenton chemistry was proposed to explain the low level chemiluminescence detected in incubations of acetaldehyde, XO, and bicarbonate at pH 10.2 (Reactions 1–9) (17, 18).

REACTIONS 4–9

There has been a renewed interest in the pathophysiological roles of the carbonate radical anion since its direct EPR detection from flow mixtures of peroxynitrite with the bicarbonate-carbon dioxide pair in aqueous solutions at physiological pH (19). In addition to being considered an important mediator of peroxynitrite effects *in vivo* (reviewed in Refs. 20 and 21), the carbonate radical anion has been proposed as the diffusible oxidant produced during the peroxidase activity of the enzyme Cu,Zn-superoxide dismutase (22–27), whose relationship to the familial amyotrophic lateral sclerosis disease remains under scrutiny.

Recently, we proposed that XO turnover at neutral pH could be another route for the biological formation of the carbonate radical anion (Fig. 1) (21). This proposition was based on the fact that the electrons coming from the oxidizing substrate flow through the many redox centers of XO, opening the possibility for production/escape of intermediates that are partially reduced/protonated such as the superoxide radical anion and the deprotonated peroxide (8). The latter could react with surrounding carbon dioxide to produce peroxymonocarbonate that either leaves the active site and acts as a two-electron oxidant (26, 28, 29) or is reduced at the active site to the carbonate radical anion (Fig. 1) (21). Here, we tested this proposal by using several methodologies to examine XO-mediated oxidation of acetaldehyde, hypoxanthine, and xanthine in the absence and presence of bicarbonate and catalase at neutral pH.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals—XO (from bovine milk, grade III) was purchased from Sigma or Calbiochem. Both samples produced similar results, and XO from Sigma was used in most of the reported experiments. DHR was purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Isotope-labeled water (H₂¹⁸O; 96.9%) was purchased from Isotec (Miamisburg, OH). All other reagents were purchased from Sigma, Merck, or Fluka and were analytical grade or better. Peroxynitrite was synthesized and quantified as previously described (19). All solutions and buffers were prepared with distilled water purified with a Millipore Milli-Q system. All buffers were treated with Chellex-100 to remove trace amounts of metal ion contaminants prior to use. Concentrations of carbon dioxide were calculated from the added bicarbonate concentrations by using *pK*_a 6.4 (19).

XO Activity—XO activity was monitored spectrophotometrically at 295 nm immediately before each set of experiments through its ability to oxidize xanthine to uric acid ($\epsilon = 9,600 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (30). In some experiments, XO activity was also monitored by superoxide radical anion production that was followed by cytochrome *c* Fe(III) (50 μM) reduction at 550 nm ($\Delta\epsilon = 21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (31).

DHR Oxidation—DHR was dissolved in acetonitrile to a 10 mM final concentration and stored under argon protected from light. DHR (80–100 μM) was incubated with the various systems, and its oxidation was monitored either spectrophotometrically at 500 nm ($\epsilon = 78,800 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) or fluorimetrically (32). In the latter case, a TECAN Spectrafluor Plus fluorimeter was employed, and the wavelengths were selected through the use of optical filters as 492 and 535 nm for excitation and emission, respectively.

Chemiluminescence Studies—Light emission was measured with a photocounting device consisting of a red-sensitive photomultiplier tube (9203BM Thor EMI Electron Tubes) cooled to -20°C with a thermoelectric cooler (FACT 50 MKIII; EMI Gencom, Plainview, NY) as described elsewhere (33, 34). The potential applied to the photomultiplier was $-1,200 \text{ V}$. The phototube output was connected to an amplifier discriminator (model 1121; Princeton Instruments, NJ), which transmitted the signal to a computer. Light emissions at specified wavelength intervals were obtained with cut-off filters (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA) placed between the cuvette and the photomultiplier. All sample components were mixed and poured into a mirrored walls glass cuvette (35 $\times$ 7 $\times$ 55 mm) maintained at 25°C . Concentrated peroxynitrite or acetaldehyde stock solutions were then injected into the cuvette until they reached the concentrations specified in the legend of Fig. 9. The infusion was made with a Harvard apparatus pump 22, and the mixture was kept under continuous stirring. The chemiluminescence signal was monitored during the injection and after mixing of the reagents.

EPR Spin Trapping Studies—EPR spectra were recorded at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) on a Bruker EMX spectrometer equipped with an ER4122 SHQ 9807 high sensitivity cavity. The incubation mixtures were transferred to flat cells, and the spectra were typically recorded 1 min after the substrate addition.

HPLC/Mass Spectrometry Studies—The enzymatic incubations were maintained for 4 h at room temperature, transferred to a refrigerator, and analyzed within 24 h. For analysis, they were injected into a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) connected to a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK). The HPLC system was composed of two LC-10AD VP pumps connected to an SPD-10AV VP UV-visible detector controlled by a communication bus module SLC-10AD VP A. HPLC separations were performed with a Phenomenex C-18 reverse phase column (50 $\times$ 1.0 mm; 3- μm particle size) (Phenomenex, Torrance, CA) equipped with a C-18 reverse phase guard column (20 $\times$ 2.1 mm; 5- μm particle size) (Supelco, Bellefonte, PA). The columns were eluted with a gradient (0–20 min/0–40% B) of solvent A (water containing 0.1% acetic acid) and solvent B (acetonitrile/tetrahydrofuran (9:1 (v/v) containing 0.1% acetic acid) at a flow rate of 0.25 ml/min. The eluent was monitored at 254 nm and analyzed by electrospray ionization mass spectrometry in the positive ion mode. The source temperature of the mass spectrometer was maintained at 110°C , and the cone voltage was set to 25 V. The capillary potential and the high electrode potential were set to 3.0 and 0.5 kV, respectively. Full scan data were acquired in the range of 70–270 *m/z* by means of the Mass Lynx NT software (Micromass, Manchester, UK).

RESULTS

Production of Radicals Monitored by DHR Oxidation—DHR oxidation to rhodamine occurs by a radical mechanism, and the process has been used to detect the production of radicals and

FIG. 2. Initial rate of DHR oxidation in incubations of acetaldehyde/XO in the absence and presence of bicarbonate and radical scavengers. The reaction mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (10 milliunits/ml), and DHR (80 μM) in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, and were incubated at room temperature (25 ± 2 °C). When added, bicarbonate (100 mM), catalase (200 units/ml), iron-superoxide dismutase (30 units/ml), and DTPA (0.1 mM) had the specified final concentrations. The values shown are the mean ± S.D. of three independent determinations.

ferryl intermediates (32). Here we show that DHR (80 μM) is oxidized in incubations containing acetaldehyde (5 mM) and XO (10 milliunits/ml) in phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C in the absence and presence of bicarbonate (100 mM) (Fig. 2). The small accelerating effect of bicarbonate on the initial rate of DHR oxidation (1.3 times) was reproducible but difficult to discriminate under these conditions where, most likely, Fenton chemistry in the bulk solution predominates (Reactions 1–8). Indeed, DHR is oxidized by the hydroxyl radical but not by superoxide radical anion or hydrogen peroxide (32) that are produced during XO turnover (Reactions 1–3) (4–8). However, the latter species can produce the hydroxyl radical (Reaction 4), because XO carries tightly bound iron ions (35, 36). Accordingly, the addition of catalase (200 units/ml) greatly inhibited DHR oxidation, and the accelerating effect of 100 mM bicarbonate became more pronounced (3.5 times) (Fig. 2). The further addition of iron-superoxide dismutase (30 units/ml) and DTPA (0.1 mM) marginally affected the DHR oxidation rate in the presence of bicarbonate (Fig. 2), suggesting that catalase addition was enough to minimize Fenton chemistry during acetaldehyde oxidation by XO. The iron-superoxide dismutase enzyme was used in these experiments, because it has not been reported to display the peroxidase activity that oxidizes the bicarbonate/carbon dioxide pair in contrast with the Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme (22–27).

Thus, the possibility of XO turnover producing the carbonate radical anion by mechanisms other than Fenton chemistry (Fig. 1) (21) was further examined in the presence of catalase (200 units/ml). In most experiments, DTPA (0.1 mM) was also present. Under these conditions, the presence of bicarbonate (50–200 mM) accelerated DHR oxidation to an extent that was roughly dependent on the anion concentration (Fig. 3). The possibility of a higher rate of DHR oxidation being the result of a modulating effect of bicarbonate on enzyme activity (37) was excluded by experiments showing that bicarbonate (100–200 mM) had marginal effects on cytochrome *c*-Fe(III) reduction by acetaldehyde/XO (data not shown). Relevantly, the rate of cytochrome *c*-Fe(III) reduction increased with the pH, whereas the rate of DHR oxidation decreased (Fig. 4). This behavior further excludes the possibility that DHR oxidation is being mediated by carbonate radical anions produced through Fenton chemistry in the bulky solution. In this case, a higher oxidation

FIG. 3. Oxidation of DHR in incubations of acetaldehyde/XO/catalase in the absence and presence of bicarbonate. The reaction mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (20 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), DHR (80 μM), DTPA (0.1 mM), and bicarbonate at the specified concentrations in 250 mM phosphate buffer, pH 7.2, and were incubated at room temperature (25 ± 2 °C). The inset shows the inhibitory effect of uric acid (80 μM) upon DHR oxidation mediated by acetaldehyde/XO/catalase in the presence of 100 mM bicarbonate.

FIG. 4. Initial rates of DHR oxidation and cytochrome *c*-Fe(III) reduction by acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate as a function of the pH. The reaction mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (10 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), bicarbonate (100 mM), and DHR (80 μM) or cytochrome *c*-Fe(III) (50 μM) in phosphate buffer (250 mM) of the specified pH values and were incubated at room temperature (25 ± 2 °C). The values shown are the mean ± S.D. of three independent determinations.

rate would be expected at alkaline pH, because the hydroxyl radical reacts much faster with the carbonate (Reaction 8) than with bicarbonate anion (Reaction 7) (17, 18).

Replacement of acetaldehyde (1–5 mM) with hypoxanthine or xanthine (80–200 μM) as the oxidizing XO substrate, abolished the accelerating effects of bicarbonate on DHR oxidation (see, for instance, Fig. 5, inset). This was not surprising, because purines and their oxidation product uric acid, in particular, react very rapidly with the carbonate radical anion (21, 38). In agreement, the addition of uric acid (80 μM) to the incubations containing acetaldehyde/bicarbonate/catalase/XO strongly inhibited DHR oxidation (Fig. 3, inset). Although uric acid has been described as an XO inhibitor (39), its inhibitory efficiency is not enough to explain the lack of DHR oxidation under the experimental conditions of Fig. 3. In order to circumvent the fast reaction between the carbonate radical anion and uric acid, the experiments using xanthine and hypoxanthine as substrates were performed in the presence of uricase. In addition, DHR oxidation was monitored by fluorescence due to its greater sensitivity as compared with UV-visible spectroscopy. Under these conditions, a clear effect of bicarbonate in accelerating DHR oxidation promoted by xanthine/XO/catalase and hypoxanthine/XO/catalase was observed (Fig. 5). Bicarbonate

FIG. 5. Oxidation of DHR in incubations of hypoxanthine (A) and xanthine (B) with XO/catalase/uricase in the absence and in the presence of bicarbonate. The reaction mixtures contained hypoxanthine (80 μ M) or xanthine (160 μ M), XO (20 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), uricase (1 unit/ml), DHR (80 μ M), DTPA (0.1 mM), and bicarbonate at the specified concentrations in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, and were incubated at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). The inset in A shows total DHR oxidation at 8 min by hypoxanthine/XO/catalase in the absence of uricase in the absence and presence of 100 mM bicarbonate. DHR oxidation was monitored by fluorescence as described under "Materials and Methods."

effects were undetectable in the absence of uricase (Fig. 5, inset). These results further indicate that uric acid, the final oxidation product of XO-mediated oxidation of hypoxanthine and xanthine, precludes carbonate radical anion detection through DHR oxidation. Indeed, due to solubility constraints, DHR should be used at low concentration ($\leq 100 \mu\text{M}$), and such concentrations are probably not enough to compete with uric acid for the carbonate radical anion (also see below).

The above results suggest that oxidation of acetaldehyde, hypoxanthine, or xanthine by XO in the presence of bicarbonate and catalase at neutral pH produces a strong one-electron oxidant, most likely the carbonate radical anion.

Production of Radicals Monitored by Spin Trapping—The carbonate radical anion does not produce stable radical adducts with the currently available spin traps, but it oxidizes DMPO, possibly to the corresponding cation radical that, upon water addition, produces the EPR-detectable DMPO/OH radical adduct (Fig. 6, inset) (22, 25). Thus, we examined the effect of bicarbonate addition (50–200 mM) on the yields of DMPO/OH produced from acetaldehyde/XOD/catalase (Fig. 6). In the absence of bicarbonate, the resulting EPR spectrum was dominated by that of the DMPO/COCH₃ radical adduct (labeled as $\circ$ in Fig. 6) (40, 41) with some contribution of those of the DMPO/OOH and DMPO/OH radical adduct, particularly the first. Upon the addition of increasing concentrations of bicarbonate, the resulting EPR spectra presented increasing levels of the DMPO/OH radical adduct (labeled as $\times$) (Fig. 6, B–D).

FIG. 6. EPR spectra of DMPO radical adducts obtained in incubations of acetaldehyde/XO/catalase/DMPO in the absence and presence of bicarbonate. The reaction mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (20 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), DTPA (0.1 mM), and DMPO (80 mM) in phosphate buffer (200 mM), pH 7.2, and the spectra were run at room temperature 1 min after acetaldehyde addition. A, no bicarbonate added; B, 50 mM bicarbonate added; C, 100 mM bicarbonate added; D, 200 mM bicarbonate added. The positions of the DMPO/COCH₃ ($\circ$) and DMPO/OH ($\times$) peaks are labeled as specified; the peaks of DMPO/OOH radical adduct are also evident but were not labeled for simplicity. Instrumental conditions were as follows: microwave power, 20 milliwatts; modulation amplitude, 1 G; time constant, 164 ms; scan rate, 0.6 G/s; gain, 2×10^5 . The inset shows a schematic representation of the mechanism by which the carbonate radical anion produces the DMPO/OH radical adduct.

The results shown in Fig. 6 are indicative of carbonate radical production but are not unambiguous, because the DMPO/OH radical adduct is also produced from DMPO attack by the hydroxyl radical. To exclude a main role for the hydroxyl radical in the formation of the DMPO/OH radical adduct detected under our experimental conditions (Fig. 6), we repeated the experiments in the presence of Me₂SO (2 M) (Fig. 7, A and B). The latter does not react with the carbonate radical anion but does react with the hydroxyl radical to produce the methyl radical, which, in turn, reacts with DMPO to produce the DMPO/CH₃ radical adduct (22, 25). The addition of Me₂SO to the acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate system, however, did not produce the DMPO/CH₃ radical adduct or changed the yield of the DMPO/OH radical adduct (Fig. 7, A and B). In contrast, under our experimental conditions, tryptophan and a tyrosine analogue (4-hydroxyphenylacetic acid) that react fast with the carbonate radical anion (21) strongly inhibited the production of the DMPO/OH radical adduct (Fig. 7, C and D). Certainly, both targets were oxidized by the carbonate radical anion to the corresponding tryptophanyl and phenoxyl radical (21), but these species were not efficiently trapped by DMPO (Fig. 7, C and D).

The above results strongly supported carbonate radical anion production during acetaldehyde oxidation by XO/bicarbon-

FIG. 7. EPR spectra of DMPO radical adducts obtained in incubations of acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate/DMPO in the absence and presence of radical scavengers. The reaction mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (20 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), DTPA (0.1 mM), bicarbonate (200 mM), and DMPO (80 mM) in phosphate buffer (200 mM), pH 7.2, and the spectra were run at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 1 min after acetaldehyde addition. A, no additions; B, 2 M Me₂SO (DMSO) added; C, 25 mM 4-hydroxyphenylacetic acid added; D, 25 mM tryptophan added. Instrumental conditions were as follows: microwave power, 20 milliwatts; modulation amplitude, 1 G; time constant, 164 ms; scan rate, 0.6 G/s; gain, 2×10^5 .

ate, and next, we used DMPO to examine XO-mediated oxidation of xanthine and hypoxanthine. In contrast to DHR oxidation in which, due to solubility constraints, the carbonate radical anion probe (DHR) was used at low concentration ($\leq 100 \mu\text{M}$) (Figs. 2–5), DMPO as a probe can be employed at high concentration (80 mM) (Figs. 6 and 7). This high concentration was likely to outcompete the purines and their oxidation product, uric acid, for the carbonate radical anion eventually produced, and, thus, uricase was not added in the incubations. In the absence of bicarbonate, incubations of xanthine/XO/catalase/DMPO produced an EPR spectrum that matched that of the DMPO/•OOH radical adduct (Fig. 8A) (42–44). Upon the addition of increasing concentrations of bicarbonate, the resulting EPR spectrum became dominated by that of the DMPO/•OH radical adduct as expected from DMPO oxidation by the carbonate radical anion (Fig. 8, B and C). Moreover, as was the case of acetaldehyde-containing incubations (Fig. 7), the addition of Me₂SO did not alter the EPR spectrum obtained in the presence of bicarbonate (Fig. 8D). The spectra shown in Fig. 8 were obtained during the oxidation of hypoxanthine (80 μM), but practically the same spectra were obtained during XO-mediated oxidation of xanthine (160 μM) (data not shown). Taken together, these results strongly support carbonate radical anion formation during oxidation of both xanthine and hypoxanthine by XO/bicarbonate. In these systems, surprising at first, was the inhibitory effect of bicarbonate addition on the yields of the DMPO/•OOH radical adduct (Fig. 8). However, the superoxide radical anion reacts slowly with DMPO ($k = 10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (45) but reacts fast with both carbon dioxide ($k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in aprotic solvents) (46) and carbonate radical anion ($k \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (47). Thus, in the presence of bicarbonate, the latter species probably inhibits the yields of the DMPO/•OOH radical adduct by competing with DMPO for the superoxide radical anion (Fig. 8).

Taken together, the above results demonstrate that XO turnover in the presence of bicarbonate produces a strong one-

FIG. 8. EPR spectra of DMPO radical adducts obtained in incubations of hypoxanthine/XO/catalase/DMPO in the absence and in the presence of bicarbonate. The reaction mixtures contained hypoxanthine (80 μM), XO (20 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), DTPA (0.1 mM), and DMPO (80 mM) in phosphate buffer (200 mM), pH 7.2, and the spectra were run at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) 1 min after hypoxanthine addition. A, no bicarbonate added; B, 50 mM bicarbonate added; C, 100 mM bicarbonate added; D, 100 mM bicarbonate plus 2 M Me₂SO (DMSO) added. The spectrum shown in A matches that of the DMPO/•OOH radical adduct. The spectra shown in B–D are a composite of those of the DMPO/•OOH and DMPO/•OH radical adduct, but only the peaks of latter were labeled as ×. Instrumental conditions were as follows: microwave power, 20 milliwatts; modulation amplitude, 1 G; time constant, 164 ms; scan rate, 0.6 G/s; gain, 2×10^5 .

electron oxidant independently of the substrate being acetaldehyde, hypoxanthine or xanthine (Figs. 3–8). Thus, acetaldehyde was selected for further experiments aiming to a more unambiguous characterization of the produced radical.

Production of Radicals Monitored by Chemiluminescence—As mentioned above, Hodgson and Fridovich attributed the light emission observed in incubations of acetaldehyde/XO at pH 10.2 to chemiluminescent products arising from carbonate radical anion dismutation (Reaction 9) (17). By then, it was difficult to compare the observed light emission with a known source of the carbonate radical anion, but at present, mixtures of peroxynitrite with the bicarbonate/carbon dioxide pair provide such a source (19). Thus, we compared the light emission profile of peroxynitrite/bicarbonate with that of acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate at pH 7.4 (Fig. 9). In both cases, most of the light was emitted in the region between 500 and 600 nm as reported before (Fig. 9, B and D) (17, 48). Light emission from the peroxynitrite/bicarbonate system was detectable only under flow conditions as expected from the fast decay of the oxidant in the presence of bicarbonate at neutral pH (Fig. 9A) (19–21, 48). In contrast, light emission from the XO incubation increased stepwise after the addition of acetaldehyde and reached a plateau that was sustained for some minutes as expected from an enzymatic reaction (Fig. 9C). These results further support that the strong oxidant produced during XO turnover in the presence of catalase and bicarbonate at physiological pH is the carbonate radical anion.

Production of Carbonate Radical Anion Monitored by Spin Trapping Coupled to HPLC/MS—To further prove that the carbonate radical anion was produced in incubations of acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate and was able to oxidize DMPO to the corresponding radical cation to produce the DMPO/•OH radical adduct (Fig. 6, inset), we performed incubations in the presence of unlabeled and labeled water (H₂¹⁸O) and analyzed the samples by HPLC/mass spectrometry. Both incubations

FIG. 9. Comparison of light emission by mixtures of peroxynitrite/bicarbonate and of acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate. Peroxynitrite was infused at 0.4 mM/s in a solution of bicarbonate (100 mM) in phosphate buffer (250 mM), pH 7.4, at 25 °C. Acetaldehyde was injected to a final concentration of 15 mM in the cuvette containing XO (50 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), bicarbonate (100 mM) in phosphate buffer (250 mM), pH 7.4, at 25 °C. A and C show total light emission as a function of time; B and D show light emission as a function of the wavelength for peroxynitrite- and XO-containing incubations, respectively. Light emission values represent the percentage of total light (without filters) that passed through each specified cut-off filter. The values shown are the mean $\pm$ S.D. of three independent determinations.

presented peaks eluting at 8 and 15 min. The peak eluting at 8 min in both incubations showed a mass spectrum with a major ion at m/z 114 corresponding to the molecular ion of DMPO ($[M + H]^+ = 114$) (data not shown). The peak eluting at 15 min showed a major ion at m/z 130 for the incubation in normal water (H₂¹⁶O) (Fig. 10A) and at m/z 130 and 132 for the incubation in labeled water (H₂¹⁸O) (Fig. 10B). The ion at m/z 130 corresponds to the protonated nitron of the DMPO/OH radical adduct ($[M + H]^+ = 130$), whereas the ion at m/z 132 corresponds to the ¹⁸O-labeled DMPO/¹⁸OH protonated nitron ($[M + H]^+ = 132$). The incorporation of ¹⁸O atom into the DMPO/OH nitron obtained in incubations in H₂¹⁸O indicates the addition of water and thus, carbonate radical anion production (Fig. 6, inset). The fact that the nitrones and not the corresponding nitroxides or hydroxylamines were detected emphasizes the oxidizing power of the XO incubations (49, 50).

The relative percentage of the DMPO/OH and DMPO/¹⁸OH nitron in the incubations in H₂¹⁸O was estimated to be around 60 and 30%, respectively. This result is consistent with both experimental conditions and XO turnover. Thus, labeled water employed was 96.9% H₂¹⁸O, and this was diluted to 80% H₂¹⁸O in the incubations mixtures. Also, XO turnover in the presence of catalase and bicarbonate has at least two potential sources of the DMPO/OH radical adduct, the carbonate radical anion and the superoxide radical anion (Fig. 1). The carbonate radical anion oxidizes DMPO to the corresponding cation radical that produces a labeled DMPO/¹⁸OH radical adduct in the presence of labeled water (Fig. 6, inset, and Fig. 10). The superoxide radical anion is produced from molecular oxygen (unlabeled under our experimental conditions) (Fig. 1) and is trapped by DMPO to produce the DMPO/OOH radical adduct. In agreement, the DMPO/OOH radical adduct was detected by EPR in our incubation mixtures (Figs. 6A and 8A). This radical adduct, however, rapidly decays to the DMPO/OH radical adduct (45), and this fact explains why the unlabeled nitron was also detected under our experimental conditions (Fig. 10).

DISCUSSION

Our results demonstrate that xanthine oxidase-mediated oxidation of acetaldehyde, hypoxanthine, or xanthine in the pres-

FIG. 10. Mass spectra of the DMPO/OH radical adduct obtained in incubations of acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate/DMPO in unlabeled and labeled water. The incubation mixtures contained acetaldehyde (5 mM), XO (10 milliunits/ml), catalase (200 units/ml), bicarbonate (200 mM), and DMPO (80 mM) in phosphate buffer (200 mM), pH 7.4, and were incubated at room temperature (25 $\pm$ 2 °C) for 4 h. The samples were kept in the refrigerator and analyzed within 24 h by HPLC/MS as described under "Materials and Methods." The shown mass spectra were obtained by selecting the 15-min retention time peak for the incubations performed in H₂¹⁶O (A) or H₂¹⁸O (80% final ¹⁸O abundance).

ence of both catalase and bicarbonate produces the carbonate radical anion by a mechanism that is independent of Fenton chemistry in the bulky solution (Figs. 2–10). The carbonate radical anion was first characterized by indirect methodologies such as DHR (Figs. 3–5) and DMPO oxidation (Figs. 6–8). In the case of XO acting upon xanthine and hypoxanthine as substrates, bicarbonate-dependent DHR oxidation was detected only in the presence of uricase (Fig. 5). This fact reinforces carbonate radical anion identification, because this radical reacts very rapidly with uric acid (21, 38), which, in turn, is produced from xanthine and hypoxanthine oxidation and is degraded by uricase. A more direct proof that the main strong one-electron oxidant formed during XO turnover in the presence of catalase and bicarbonate was the carbonate radical anion and not the hydroxyl radical was obtained from the similar EPR spectra produced by mixtures containing DMPO (80 mM) (Figs. 7A and 8C) and DMPO (80 mM) plus Me₂SO (2 M) (Figs. 7B and 8D). If the hydroxyl radical were the main radical produced, the Me₂SO addition should render a spectrum dominated by that of the DMPO/CH₃ radical adduct, because the hydroxyl radical reacts at similar rates with Me₂SO ($k = 5.8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (51) and DMPO ($k = 4.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (52), but Me₂SO was present at a higher concentration. The spectrum obtained in the presence and absence of Me₂SO, however, was dominated by that of the DMPO/OH radical adduct (Figs. 7 (A and B) and 8 (C and D)), a result that is consistent with carbonate radical anion production. Indeed, this radical reacts only with DMPO (22, 25), and not particularly fast ($k = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (53), to produce the DMPO/OH radical adduct (Fig. 6, inset). Accordingly, the yield of this adduct was strongly inhibited upon the addition of targets that, in contrast with Me₂SO, react fast with the carbonate radical anion such as tryptophan ($k = 1.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and a tyrosine analog ($k = 4.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for tyrosine) (54) (Fig. 7, C and D).

All tested XO substrates, acetaldehyde, xanthine, and hypoxanthine, provided qualitatively similar results in regard to the bicarbonate-dependent oxidation of DHR to rhodamine (Figs. 3–5) and of DMPO to the DMPO/OH radical adduct (Figs. 6–8). More unambiguous characterization of the carbonate radical anion was pursued with acetaldehyde as the XO substrate, because its two-electron oxidation product, acetate, is not expected to react fast with the carbonate radical anion (21). In acetaldehyde/XO/catalase/bicarbonate-containing incubations, the carbonate radical anion was characterized by the best available methodologies (Figs. 9 and 10) except for direct EPR (19). The use of the latter was precluded by the low flux of produced radicals (55). The similar emission spectra obtained with XO incubations and flow mixtures of peroxynitrite with the bicarbonate-carbon dioxide pair (Fig. 9) and the demonstration that a considerable part of the DMPO/OH radical adduct produced in the enzymatic incubations resulted from water (H₂¹⁸O) addition to DMPO (Fig. 10), however, provide strong support for carbonate radical anion characterization. The fact that acetaldehyde can also react with deprotonated peroxide to eventually produce radical intermediates (40, 41) does not challenge the conclusion that the carbonate radical anion is produced during XO turnover. The acetaldehyde-derived radicals produced by XO under different experimental conditions have been previously characterized as the acetyl and the methyl radical (40, 41). These species may oxidize DHR, but they do not oxidize DMPO to the DMPO/OH radical adduct. Rather, they add to DMPO to produce the DMPO/COCH₃ and the DMPO/CH₃ radical adduct. Under the experimental conditions employed here, only the DMPO/COCH₃ radical adduct was detected (Fig. 6).

Our studies were performed in the presence of catalase to inhibit Fenton chemistry in the bulk solution that would make it difficult to prove the formation of the carbonate radical anion during XO turnover. The experimental conditions employed, however, are closer to physiological ones. *In vivo*, the presence of superoxide dismutases, peroxiredoxins, and catalase and the low availability of redox-active transition metal ions tend to minimize the occurrence of classical Fenton chemistry (Reactions 4–8) except in localized environments (56, 57).

The mechanism for carbonate radical anion formation that can be proposed from our studies relies on an intermediate that is likely to be produced during XO turnover and may react with the biologically ubiquitous carbon dioxide. Accordingly, the pH dependence for radical production under our conditions did not correlate with superoxide radical anion production (Fig. 4) or with the reactivity of the hydroxyl radical toward the bicarbonate/carbonate anion (Reactions 7 and 8) (17, 18), but rather, it correlated with the equilibrating concentration of carbon dioxide (Reactions 5 and 6). This result, a faster electron than proton transfer during XO turnover (8), and the recent NMR characterization of the peroxymonocarbonate anion in aqueous mixtures of bicarbonate/hydrogen peroxide ($K = 0.33$) (28, 29) argue for the mechanism shown in Fig. 1. Thus, the carbonate radical anion is likely to be produced at the XO active site from the carbon dioxide addition to deprotonated peroxide, which, in turn, is reduced by electrons flowing from the substrate to molecular oxygen through the many redox centers of XO. The carbonate radical anion can leave the active site and react with external targets as demonstrated here for DHR and DMPO (Figs. 3–5 and 6–8, respectively).

Production and escape of radical intermediates during biological oxidations catalyzed by oxidases and oxygenases occur frequently, particularly when the electrons flow through many redox centers, as is the case for the mitochondrial electron transport chain, cytochrome P₄₅₀ microsomal system, nitric-

oxide synthases, and xanthine oxidase (3, 15, 57–60). The latter is an important example, because xanthine oxidase produces considerable yields of the superoxide radical anion (4–8), displays peroxidase/oxidase activity toward aldehydes (41), and is considered to play important roles in cytotoxic processes (3, 9–15). The latter activities and roles have been mostly attributed to hydroxyl radical production through Fenton chemistry (see above). In this context, the results reported here are particularly relevant, because they demonstrate that xanthine oxidase turnover at physiological pH can produce a strong one-electron oxidant from the biologically ubiquitous bicarbonate-carbon dioxide pair by a mechanism unrelated to classical Fenton chemistry. In addition to indicating that the carbonate radical anion may be an important mediator of the pathophysiological effects of xanthine oxidase, our results add to recent studies demonstrating the importance of the bicarbonate-carbon dioxide pair as a source of biological oxidants (21–29).

Acknowledgments—We thank Dr. Ronald P. Mason for providing access to laboratory facilities and Dr. Glauca R. Martinez and Fernanda M. Prado for helpful technical assistance.

REFERENCES

- Massey, V., and Harris, C. M. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 750–757
- Parks, D. A., Skinner, K. A., Tan, S., and Skinner, H. B. (1999) in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems* (Gilbert, D. L., and Colton, C. A., eds) pp. 397–420, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Harrison, R. (2002) *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 774–797
- Morpeth, F. F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **744**, 328–334
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 5753–5760
- Fridovich, I. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 4053–4057
- Bounds, P. L., and Winston, G. W. (1991) *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 447–453
- Hodges, G. R., Young, M. J., Paul, T., and Ingold, K. U. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 434–441
- McCord, J. M. (1985) *N. Engl. J. Med.* **312**, 159–163
- Kurose, I., and Granger, D. N. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **723**, 158–179
- Millar, T. M., Stevens, C. R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R., and Blake, D. R. (1998) *FEBS Lett.* **427**, 225–228
- Zhang, Z., Naughton, D., Winyard, P. G., Benjamin, N., Blake, D. R., and Symons, M. C. R. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 767–772
- Godber, B. L. J., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R., and Harrison, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 757–7763
- Li, H., Samouilov, A., Liu, X., and Zweier, J. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24482–24489
- Millar, T. M., Kanczler, J. M., Bodamyali, T., Blake, D. R., and Stevens, C. R. (2002) *Redox Rep.* **7**, 1–6
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1620–1624
- Hodgson, E. K., and Fridovich, I. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* **172**, 202–205
- Buxton, G. V., and Elliot, A. J. (1986) (1986) *Radiat. Phys. Chem.* **27**, 241–243
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M., and Augusto, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 10802–10806
- Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., and Rubbo, H. (2000) in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* (Ignarro, L. J., ed) pp. 57–89, Academic Press, Inc., New York
- Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. X. C., and Menezes, S. L. (2002) *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841–859
- Zhang, H., Joseph, J., Felix, C., and Kalyanaraman, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14038–14045
- Zhang, H., Joseph, J., Gurney, M., Becker, D., and Kalyanaraman, B. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1013–1020
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34674–34678
- Zhang, H., Andreopoulos, C., Joseph, J., Chandran, K., Karoui, H., Crow, J. P., and Kalyanaraman, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 24078–24089
- Bonini, M. G., Fernandes, D. C., and Augusto, O. (2004) *Biochemistry* **43**, 344–351
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 743–744
- Richardson, D. E., Yao, H., Frank, K. M., and Bennet, D. A. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1729–1739
- Yao, H., and Richardson, D. E. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6211–6221
- Avis, P. G., Bergel, F., and Bray, R. C. (1956) *J. Chem. Soc.* 1219–1226
- McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055
- Crow, J. P. (1997) *Nitric Oxide* **1**, 145–157
- Cadenas, E., and Sies, H. (1984) *Methods Enzymol.* **105**, 221–231
- Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., and Di Mascio, P. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6172–6179
- Lloyd, R. V., and Mason, R. P. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17633–17636
- Britigan, B. E., Pou, S., Rosen, G. M., Lilleg, D. M., and Buettner, G. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17533–17538
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., and Buck, J. (2000) *Science* **298**, 625–628
- Shafirovich, V., and Dourandin, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 24621–24626
- Tan, S., Radi, R., Gaudier, F., Evans, R. A., Rivera, A., Kirk, K. A., and Parks,

- D. A. (1993) *Pediatr. Res.* **34**, 303–307
40. Nakao, L. S., Ouchi, D., and Augusto, O. (1999) *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1010–1018
41. Nakao, L. S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., Grijalba, M. T., and Augusto, O. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 721–729
42. Ross, D., Cotgreave, I., and Moldeus, P. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **841**, 278–282
43. Oetli, K., Dikalov, S., Freisleben, H. J., Mlekusch, W., and Reibnegger, G. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 774–778
44. Koide, T., Noda, H., Liu, W., Ogata, T., and Kamada, H. (2000) *Anal. Sci.* **16**, 1029–1032
45. Finkelstein, E., Rosen, G. M., and Rauckman, E. J. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 4494–4999
46. Wadhawan, J. D., Welford, P. J., Maisonhaute, E., Climent, V., Lawrence, N. S., McPeak, H. B., Hahn, C. E. W., and Compton, R. G. (2001) *J. Phys. Chem. B* **105**, 10659–10668
47. Eriksen, T. E., Lind, J., and Merenyi, G. (1985) *Radiat. Phys. Chem.* **26**, 197–199
48. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49–58
49. Stoyanovsky, D. A., Goldman, R., Jonnalaladda, S. S., Day, B. W. Claycamp, H. G., and Kagan, V. E. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 3–11
50. Guo, Q., Qian, S. Y., and Mason, R. P. (2003) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14**, 862–871
51. Reuvers, A. P., Greenstock, C. L., Borsa, J., and Chapman, J. D. (1973) *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **24**, 533–536
52. Neta, P., Steenken, S., Janzen, E. G., and Shetty, R. V. (1980) *J. Phys. Chem.* **84**, 532–534
53. Alvarez, M. N., Folies, L., Wardman, P., and Radi, R. (2004) *Free Radic. Biol. Med.* **36**, Suppl. 1, 57
54. Chen, S. N., and Hoffman, M. Z. (1973) *Radiat. Res.* **56**, 40–47
55. Bonini, M. G., and Augusto, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 9749–9754
56. Liochev, S. I., and Fridovich, I. (1999) *IUBMB Life* **48**, 157–611
57. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1998) in *Free Radicals in Biology and Medicine*, pp. 36–130, Oxford University Press, Oxford
58. Giulivi, C., Boveris, A., and Cadenas, E. (1999) in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems* (Gilbert, D. L., and Colton, C. A., eds) pp. 77–102, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
59. Gilbert, D. L., and Colton, C. A. (1999) in *Reactive Oxygen Species in Biological Systems* (Gilbert, D. L., and Colton, C. A., eds) pp. 680–695, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
60. Xia, Y., and Zweier, J. L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1382–1390

Oxidative and alkylating damage in DNA

Glaucia R. Martinez, Ana Paula M. Loureiro, Sabrina A. Marques,
Sayuri Miyamoto, Lydia F. Yamaguchi, Janice Onuki,
Eduardo A. Almeida, Camila C.M. Garcia, Lívea F. Barbosa,
Marisa H.G. Medeiros, Paolo Di Mascio*

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes 748, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil*

Received 5 May 2003; received in revised form 15 May 2003; accepted 29 May 2003

Abstract

Modification of cellular DNA upon exposure to reactive oxygen and nitrogen species is the likely initial event involved in the induction of the mutagenic and lethal effects of various oxidative stress agents. Evidence has been accumulated for the significant implication of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), generated as the result of UVA activation of endogenous photosensitizers as porphyrins and flavins. 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) has been shown to be the exclusive product of the reaction of $^1\text{O}_2$ with the guanine moiety of cellular DNA, in contrast to the hydroxyl radical, which reacts almost indifferently with all the nucleobases and the sugar moiety of DNA. Furthermore 8-oxodGuo is also produced by other oxidants and can be used as an ubiquitous biomarker of DNA oxidation but can not be a specific marker of any particular species.

The role of DNA etheno adducts in mutagenic and carcinogenic processes triggered by known occupational and environmental carcinogens has also been studied. Much interest in etheno adducts resulted from the detection of increased levels of 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine and 3, N^4 -etheno-2'-deoxycytidine in DNA from human, rat and mouse tissues under pathophysiological conditions associated with oxidative stress. A method involving on-line HPLC with electrospray tandem mass spectrometry detection has been developed for the analysis of 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 -edGuo) in DNA. This methodology permits direct quantification of 20 fmol (7.4 adducts/ 10^8 dGuo) of the etheno adduct from approximately 350 μg of crude DNA hydrolysates. This method provides the first evidence of the occurrence of 1, N^2 -edGuo as a basal endogenous lesion and may be utilized to better assess the biological consequences of etheno DNA damage under normal and pathological conditions. This work addresses the importance of isotope labeling associated with mass spectrometry technique for biomolecule damage studies.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Etheno adducts; 2,4-Decadienal; Singlet oxygen; Biomarker; 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; Naphthalene endoperoxide; HPLC–MS/MS

1. Introduction

Nowadays it is well known that either exogenous or endogenous agents can modify the cellular DNA, along with other cellular components. To ensure

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30913815x224;
fax: +55-11-38155579.
E-mail addresses: mhgdmede@iq.usp.br (M.H.G. Medeiros),
pdmascio@iq.usp.br (P. Di Mascio).

normal growth control and accuracy in DNA replication, cells have developed many strategies to manage stress. However, a failure on some of these defense mechanisms may lead to the development of some pathologies such as cancer [1].

Reactive oxygen and nitrogen species might be produced by endogenous sources, as cell aerobic metabolism and inflammation, or by exposure to a variety of chemical and physical agents. The UVA component of solar radiation has been shown to produce deleterious biological effects in which singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$), in its lowest excited state ($^1\Delta_g$), seems to play an important role [2]. We have been studying DNA oxidation by $^1\text{O}_2$ using a ^{18}O -labeled naphthalene endoperoxide as chemical generator of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ [3] and detecting the corresponding ^{18}O -labeled products by mass spectrometry [4,5]. It was demonstrated that 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) is the exclusive product in isolated DNA [6] and it is formed directly by the reaction with $^1\text{O}_2$ in cellular media [7].

One of the most important consequences of $^1\text{O}_2$ -induced DNA damage is mutagenesis. The G to T transversions have been related to 8-oxodGuo, which in the *syn* conformation is able to mispair with adenine. Through an in vitro replication assay, several DNA polymerases directly involved in DNA replication, such as pol α , pol δ and pol III, insert preferentially dAMP opposite to 8-oxodGuo [8]. Confirming these assumptions, the replication of modified vectors, containing a single 8-oxodGuo at a specific site, resulted in G to T transversions at the lesion location, in both bacteria [9] and mammalian cells [10].

Exocyclic DNA adducts of endogenous origin are recognized in recent publications as potential biomarkers in the study of oxidative stress and cancer etiology, and also in the assessment of the efficacy of chemopreventive agents against DNA damage and cancer risk [11–15]. With the attempt to clarify some of the mechanisms responsible for the generation of DNA damage, several reactive lipid peroxidation products have long been identified [16–20]. We have shown that the reaction of 2'-deoxyadenosine (dAdo) or 2'-deoxyguanosine (dGuo) with *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) epoxides [21–23] generates two highly mutagenic adducts to mammalian cells [24,25] 1, N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine (ϵ dAdo) and 1, N^2 -etheno-2'-deoxyguanosine (1, N^2 - ϵ dGuo), respectively.

2. Implication of singlet oxygen in oxidative DNA damage

Singlet molecular oxygen reacts with electron rich biomolecules such as the guanine moiety of DNA [26]. The mutagenic and genotoxic responses observed when DNA or cells are treated with $^1\text{O}_2$ could be better understood by the identification of the oxidation products generated in this process.

The formation of $^1\text{O}_2$ may involve different physical, chemical and biochemical pathways (Fig. 1). These include, among others, the type II photosensitization mechanism [27], reactions of hydrogen peroxide with either hypochlorite [28] or peroxyxynitrite [29], enzymatic processes of peroxidases and oxidases [30] and decomposition of dioxetanes and endoperoxides [31–33]. Also, the generation of $^1\text{O}_2$ by the Russell mechanism has been pointed out to be a key chemical event responsible for the chemiluminescence arising

(A) Photosensitized generation of $^1\text{O}_2$

(B) Chemical generation of $^1\text{O}_2$

(1) Hydrogen peroxide oxidation

(2)

Fig. 1. Generation of $^1\text{O}_2$ by different sources. (A) Scheme illustrating the photosensitized process, in which the type I mechanism gives rise to radicals intermediates whereas the type II mechanism generates $^1\text{O}_2$ by energy transfer. (B) Chemical sources of $^1\text{O}_2$. (1) Oxidation of hydrogen peroxide by hypochlorite or its disproportionation catalyzed by molybdate ions. (2) Thermolysis of naphthalene endoperoxides with appropriate substituents acting as a pure chemical source of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$.

Fig. 2. Detection of $^1\text{O}_2$ generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism. (A) Schematic representation of the Russell mechanism, showing the combination of two peroxy radicals ($\text{LAOO}^\bullet$) through a linear tetraoxide transition state, which decomposes giving: a ketone (LAO), an alcohol (LAOH) and $^1\text{O}_2$ (a) or an excited ketone (LAO^*), an alcohol (LAOH) and oxygen (b). (B) Positive APCI mass spectra of the ^{18}O -labeled DPA endoperoxide ($\text{DPA}^{18}\text{O}^{18}\text{O}$) detected after incubation of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ (25 mM) and Ce^{4+} (25 mM) in the presence of DPA (60 mM) in chloroform: D_2O (1:1, v/v). (C) Monomol light emission of $^1\text{O}_2$ generated in the reaction of $\text{LAOOH}/\text{Ce}^{4+}$ and from thermolysis of 15 mM 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide (DMNO_2) at 37°C in chloroform.

from lipid peroxidation. Russell proposed that the bimolecular reaction of peroxy radical involves a cyclic mechanism from a linear tetraoxide intermediate, which decomposes to yield an alcohol, ketone and molecular oxygen (Fig. 2A) [34]. It has been postulated that this reaction could either generate oxygen in the singlet excited state [35] (Fig. 2A(a)) at ca. 10% yields or excited triplet ketone (Fig. 2A(b)) at yields

lower than 0.01% [36,37]. The generation of $^1\text{O}_2$ from lipid hydroperoxides has been clearly demonstrated by our group in a recent study using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide ($\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$) [38,39]. The formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ ($^{18}[^1\text{O}_2]$) in the reaction of $\text{LA}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ with metal ions (Ce^{4+} or Fe^{2+}) and peroxyxynitrite was detected by chemical trapping with 9,10-diphenylanthracene (DPA) and HPLC coupled to tandem mass spectrometry (Fig. 2B). The generation of $^1\text{O}_2$ was also unequivocally demonstrated by spectral measurements in the near infrared region showing a characteristic $^1\text{O}_2$ band with emission maximum at 1270 nm (Fig. 2C).

It was shown that $^1\text{O}_2$ is involved in the cell cytotoxicity associated with photodynamic therapy [40] and UVA component of the solar radiation [41]. The involvement of $^1\text{O}_2$ has also been shown in the induction of gene expression and signal transduction [42]. In addition, $^1\text{O}_2$ is generated in phagocytosis [43] where it participates in defense mechanisms against viruses and bacteria. Recently, it has been proposed that $^1\text{O}_2$ could be a substrate for the catalytic function of antibodies generating ozone and hydrogen peroxide in the process [44,45].

In contrast to hydroxyl radical, the reaction of $^1\text{O}_2$ with DNA is highly specific. The reactivity of $^1\text{O}_2$ toward isolated DNA has been studied in detail and the guanine base has been found to be the exclusive target. This reaction generates 8-oxodGuo as a main oxidation product [6]. Using type II photosensitizers, the main products from the reaction of $^1\text{O}_2$ with free dGuo in aqueous solution were identified as the diastereoisomers of spiroiminodihydantoin nucleosides (dSp) [46]. In addition, 8-oxodGuo was also detected [47] but in a relatively lower yield compared to the dSp diastereoisomers. However, under the latter photooxidation conditions, the possibility of concomitant type I photosensitization reactions did not facilitate the investigation. Then, incubation of dGuo with $^1\text{O}_2$ generated in the thermolysis of the hydrophilic endoperoxides of N,N' -di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropylamide (DHPNO₂) or disodium 1,4-naphthalenedipropylanoate (NDPO₂) gave rise mainly to the dSp derivatives and 8-oxodGuo. The formation of both products was proportional to the endoperoxide concentration, confirming the previously reported results [4]. Such a difference observed between free dGuo and isolated DNA may be explained,

Fig. 3. Main oxidation products generated by the reaction of $^1\text{O}_2$ with the guanine moiety. The reaction of $^1\text{O}_2$ with dGuo gives rise to guanine-4,8-endoperoxide, which decomposes to dSp and 8-oxodGuo, the latter is the exclusive product in DNA strands.

at least partly, by the occurrence of reactions within DNA that favor the formation of 8-oxodGuo from the initially produced guanine-4,8-endoperoxide (Fig. 3).

The potential ability for $^1\text{O}_2$ to oxidize cellular DNA was assessed by measuring the level of 8-oxodGuo in DNA of cells incubated with DHPNO₂. The treatment resulted in a three-fold increase on the level of 8-oxodGuo, while the incubation with NDPO₂ did not show any difference related to the control [4]. It may be concluded that the formation of 8-oxodGuo is due almost exclusively to the intracellular generation of $^1\text{O}_2$. This is in agreement with the fact that the endoperoxide used (DHPNO₂) has been shown to have predominantly an intracellular

localization due to its non-ionic chemical character [48]. Furthermore, the ^{18}O -labeled endoperoxide DHPN $^{18}\text{O}_2$ was prepared to assess if the formation of oxidative damage resulted from the direct reaction of $^1\text{O}_2$ with cellular DNA. It has clearly been shown that intracellular formation of ^{18}O -labeled $^1\text{O}_2$ is able to efficiently produce ^{18}O -labeled 8-oxodGuo in the nuclear DNA [7].

In addition, $^1\text{O}_2$ reacts with 8-oxodGuo, and differences in the chemical reaction of $^1\text{O}_2$ with 8-oxodGuo as free nucleoside or when inserted into DNA fragments have been observed. The qualitative identification of the predominant final $^1\text{O}_2$ -oxidation products of 8-oxodGuo was performed using the

accurate HPLC–ESI–MS/MS method and the endoperoxide DHPNO₂ or DHPN¹⁸O₂ acting as a clean chemical source of ¹O₂ [5]. Thus, 2-amino-5-[(2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-4H-imidazol-4-one (dIz), 2,2-diamino-4-[2'-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl] amino]-5-(2H)-oxazolone (dOz) and diastereomeric dSp were found to be the main final stable 8-oxodGuo decomposition products. Mass spectrometry measurements provide evidence for the formation of an oxidized nucleoside that displays the same mass spectrometric characteristics than oxidized guanidinohydantoin 2'-deoxyribonucleoside compound (dGh^{ox}). This product was previously detected as an intermediate in the ¹O₂-mediated oxidation of 8-oxoGua in single stranded DNA, where oxaluric

acid was the predominant final stable decomposition product [49]. Overall, the formation of the currently reported ¹O₂-oxidation products of 8-oxodGuo may be rationalized in term of the transient formation of a 5-hydroperoxide (Fig. 4).

It has been shown that 8-oxodGuo is also a product of DNA oxidation by many other oxidizing processes and reactive species, including one-electron oxidants, hydroxyl radical and peroxyxynitrite [50]. Efforts have been made to develop sensitive techniques to measure this oxidative lesion on DNA as the HPLC separation with electrochemical detection. More recently, the detection by tandem mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode appears to be more sensitive and accurate to measure

Fig. 4. Main oxidation products generated by the reaction of ¹O₂ with 8-oxodGuo. The reaction of ¹O₂ with 8-oxodGuo gives rise to 5-hydroperoxide (5-OOH-8-oxodGuo), which decomposes to dSp, dIz, dOz, and dGh^{ox}; however, in DNA strands, it gives rise to dOxa through dGh^{ox} as an intermediate.

oxidative base damage to cellular DNA [51]. Using this technique, it was possible to detect around 0.8 lesions per 10^6 DNA nucleobases of liver young mice [52]. Furthermore, in order to avoid eventual artefactual peaks, it is possible to use immunoaffinity column purification before the HPLC–MS/MS

analysis [53]. The comet assay associated with DNA-specific repair enzymes has been used to monitor oxidized bases in addition to strand breaks. This technique allows an estimation of the purine and pyrimidine base lesions in a limited number of cells [51].

Fig. 5. Structures of some ethano and etheno adducts formed upon reaction of oxidized α,β -unsaturated aldehydes with DNA bases (see references in the text).

3. DNA etheno adducts formation and measurement

Exocyclic DNA adducts of endogenous origin can be generated by several reactive lipid peroxidation products. Among them, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), malonaldehyde (MDA), acrolein, and crotonaldehyde have been the most widely studied aldehydes with respect to their chemical and biological activities (reviewed in [54]). They have been shown to yield DNA damage either through direct reaction with the DNA bases or through the generation of more reactive electrophilic compounds, such as bifunctional epoxides. In the first case, the products generated are the known cyclic substituted propano adducts, mainly 1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine, for the α,β -unsaturated aldehydes reactions [55,56], and the cyclic pyrimidopurinone (M₁G) and acyclic adducts formed with deoxyadenosine (M₁A) and deoxycytidine (M₁C) for the MDA reactions [57–62]. The epoxy carbonyl compounds resulting from the oxidation of the α,β -unsaturated aldehydes react with the DNA bases giving rise to substituted ethano or etheno adducts and unsubstituted etheno adducts [63–71] (Fig. 5). The ability of these reactive electrophiles to alkylate DNA bases, yielding the aforementioned respective promutagenic lesions, has been considered to contribute to the mutagenic and carcinogenic effects associated with the lipid peroxidation process leading to the oxidative stress (Fig. 6).

DDE has been reported as one of the most toxic lipid hydroperoxide breakdown products to cells [72,73]. Besides ϵ dAdo and 1,*N*²- ϵ dGuo, we have characterized six different etheno derivative adducts generated in the reaction of dAdo or dGuo with DDE epoxides [21–23]. Recently, 4,5-epoxy-2(*E*)-decenal was showed as a precursor of ϵ dAdo and 1,*N*²- ϵ dGuo formation [74], confirming the proposed reaction mechanism [21–23].

The unsubstituted promutagenic etheno adducts, mainly ϵ dAdo and 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine (ϵ dCyd) have been detected as background lesions in rodent and human tissues [13,67,75–82]. However, only a few studies have shown the occurrence of *N*²,3-etheno-2'-deoxyguanosine (*N*²,3- ϵ dGuo) as a DNA background lesion [83–85]. Interestingly, increased levels of ϵ dAdo and ϵ dCyd were observed in clinical situations associated with oxidative stress,

Fig. 6. A possible pathway leading to cancer development as a result of DNA damage.

such as metal storage diseases [86,87] and chronic infections and inflammation [88]. These lesions were also shown to be elevated in colon polyps of patients with familial adenomatous polyposis, who later develop carcinomas in the colon [89], and in white blood cell DNA of women consuming diets rich in polyunsaturated fatty acids [90]. A correlation between the accumulation of arachidonic acid metabolites and the formation of ϵ dAdo and ϵ dCyd was also observed during the tumor promotion phase of the mouse skin two-stage model of carcinogenesis [91].

In vitro studies have shown that the levels of the four unsubstituted etheno adducts (ϵ dAdo, ϵ dCyd, *N*²,3- ϵ dGuo, and 1,*N*²- ϵ dGuo) are increased when nucleosides or DNA are incubated with lipid peroxidation products [21,22,63–65,68,74,92]. Oxidized α,β -unsaturated aldehydes, such as 4-hydroxynonenal, crotonaldehyde, acrolein, and DDE epoxides [21,22,63–66,74,93–95], are possible endogenous adduct sources. Interestingly, 1,*N*⁶-ethenoadenine was also formed from the reaction of DNA with 2-phosphoglycolaldehyde, a model for the 3'-phosphoglycolaldehyde residue generated by oxidation at C3' of 2'-deoxyribose in DNA [96]. Certain carcinogenic exogenous agents, including mucochloric acid, vinyl chloride, and ethyl carbamate (urethane) can also produce etheno adducts [82,97,98].

DNA adducts are excellent biomarkers in determining the extent of genetic damage. These markers are useful in understanding the carcinogenesis mechanism and the assessment of cancer risk imposed by several chemical agents. Considering the importance of detection and quantification of these lesions *in vivo*, the development of sensitive and selective methods is necessary. Several methods, as competitive immunoassay [99], the ultra-sensitive, highly specific gas chromatography/electron capture negative chemi-

cal ionization high-resolution mass spectrometry [69], and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (HPLC–ESI–MS/MS) with off-line reversed-phase extraction to purify the adducts from milligram amounts of DNA [21,100] have been employed. On-line immunoaffinity chromatography coupled with HPLC–ESI–MS/MS has recently been applied for the detection and automated quantification of trace levels of ϵ Cyd in crude DNA hydrolysates [81]. The adduct ϵ Ado was detected using a similar method

Fig. 7. HPLC–ESI–MS/MS (MRM mode) detection of 1,N²- ϵ dGuo in DNA extracted from the liver of an untreated eleven-week-old female Wistar rat. (A) 1,N²- ϵ dGuo: m/z 292 → 176; (B) 1 pmol of [¹⁵N₅]-1,N²- ϵ dGuo internal standard: m/z 297 → 181. DNA was isolated by the chaotropic NaI method and hydrolyzed enzymatically. A Shimadzu HPLC system consisting of an autosampler, an automated switching valve, two pumps, and an UV detector was used for sample injection and cleanup of the analytical column (Luna C18(2) 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μ m, Phenomenex, Torrance, CA) with a gradient of formic acid (0.1% in water) and acetonitrile. A third HPLC pump was used to simultaneously load a second column (C18(2) Phenosphere-Next 150 mm × 2 mm i.d., 3 μ m, Phenomenex) with an isocratic flow of a (50:50) solution of formic acid 0.1% in water:acetonitrile. The position of the switching valve was changed twice: at 24 min, allowing the first column eluent to enter the second column; and at 35 min, permitting the first column to be washed while the adduct was eluted through the second column to the mass spectrometer. The cone voltage was kept at 15 V. The collision energy was set at 10 eV. The pressure of the collision gas (argon) in the gas cell was adjusted to 6.7×10^{-4} mbar. See more details in [70].

[75]. Despite the good sensitivity of the newly developed techniques, the *in vivo* formation of 1,*N*²- ϵ dGuo was just recently demonstrated by our group [70]. We developed a method to quantitatively determine 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA samples using on-line HPLC separation with tandem mass spectrometry detection by MRM. This innovative method improved the analytical assay previously reported for 1,*N*²- ϵ dGuo quantification in DNA hydrolysates [21]. The major advantage of the method is the on-line adduct separation from normal nucleosides coupled with the accuracy provided by MS/MS detection. It solves the problems involved in off-line pre-purification steps, allowing for the direct analysis of crude DNA hydrolysates. The addition of an isotopically labeled internal standard (¹⁵N₅-1,*N*²- ϵ dGuo) prior to DNA hydrolysis improves the confidence level of analyses since it allows the correction of any possible loss of analyte during the procedure. This methodology enabled the direct quantification of 20 fmol (7.40 adducts/10⁸ dGuo) of 1,*N*²- ϵ dGuo in 350 μ g of crude DNA hydrolysate and provided the first evidence for the occurrence of 1,*N*²- ϵ dGuo as an endogenous basal lesion (5.22 ± 1.37 adduct/10⁷ dGuo in female rat liver DNA) (Fig. 7). This method can be usefully employed to assess the biological levels of 1,*N*²- ϵ dGuo under normal and pathological conditions.

The biological relevance of the occurrence of 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA has been revealed by studies showing the mutagenicity of this adduct. *In vitro* misincorporation studies showed that 1,*N*²- ϵ dGuo tends to strongly block replication at and beyond the site of substitution and to favor the misincorporation of dATP and dGTP across it [101]. Another study, in which miscoding opposite this adduct in an *E. coli*/M13MB19-based system was examined, has shown that it is mutagenic in *E. coli* *uvrA*[−], with more abundant G $\rightarrow$ A mutations, followed by G $\rightarrow$ T mutations [102]. 1,*N*²- ϵ dGuo also generates deletions, rearrangements, double mutants and base pair substitutions at sites near the 1,*N*²- ϵ dGuo site [25]. Recently, Sapparbaev et al. [103] have reported that 1,*N*²-etheno-guanine (1,*N*²- ϵ Gua) is a primary substrate of *E. coli* mismatch-specific uracil–DNA glycosylase and human alkylpurine–DNA–*N*-glycosylase. These data reinforce the potential biological relevance of this adduct.

4. Conclusion

This work addresses the importance of isotope labeling associated with mass spectrometry technique for biomolecule damage studies. Using the chemical source of ¹⁸O-labeled ¹O₂, it was possible to study mechanistic aspects of ¹O₂ induced-DNA oxidation. Furthermore, the use of HPLC–MS/MS with isotopically labeled standard provides a high sensitive and specific method that enables basal levels detection of 1,*N*²- ϵ dGuo in DNA from *in vivo* samples.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Brazilian entities FAPESP—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq—Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico, PRONEX/FINEP—Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência, and the Pró-Reitoria de Pesquisa of USP—University of São Paulo. G.R.M., A.P.M.L., S.A.M., S.M., L.F.Y., J.O. and E.A.A. are recipients of FAPESP fellowships. L.F.B. and C.C.M.C. are recipients of CNPq fellowships.

References

- [1] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed., Oxford University Press, New York, 1999.
- [2] R.M. Tyrrell, Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 290–296.
- [3] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 10212–10213.
- [4] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, Naphthalene endoperoxide as a source of [¹⁸O]-labeled singlet oxygen for oxidative DNA damage studies, *Trends Photochem. Photobiol.* 9 (2002) 25–39.
- [5] G.R. Martinez, J.-L. Ravanat, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, P. Di Mascio, [¹⁸O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives, *Biol. Chem.* 383 (2002) 607–617.
- [6] J.-L. Ravanat, C. Saint-Pierre, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen, *Helv. Chim. Acta* 84 (2001) 3702–3709.

- [7] J.-L. Ravanat, P. Di Mascio, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, J. Cadet, Singlet Oxygen induces oxidation of cellular DNA, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40601–40604.
- [8] S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature* 349 (1991) 431–434.
- [9] K.C. Cheng, D.S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, L.A. Loeb, 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage causes G–T and A–C substitutions, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 166–172.
- [10] M. Moriya, Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammals—cells—8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C–T.A transversions in simian kidney-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (2003) 1122–1126.
- [11] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis* 21 (2000) 361–370.
- [12] L.J. Marnett, J.P. Plataras, Endogenous DNA damage and mutation, *Trends Genet.* 17 (2001) 214–221.
- [13] H. Bartsch, J. Nair, New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies, *Eur. J. Cancer* 36 (2000) 1229–1234.
- [14] H. Bartsch, J. Nair, Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress, *Toxicology* 153 (2000) 105–114.
- [15] F.P. Guengerich, Forging the links between metabolism and Carcinogenesis, *Mutat. Res.* 488 (2001) 195–209.
- [16] A. Benedetti, M. Comporti, H. Esterbauer, Identification of 4-hydroxynonenal as a cyto-toxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 620 (1980) 281–296.
- [17] A. Benedetti, R. Fulceri, M. Comporti, Inhibition of calcium sequestration activity of liver microsomes by 4-hydroxyalkenals originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 793 (1984) 489–493.
- [18] A. Benedetti, M. Comporti, R. Fulceri, H. Esterbauer, Cytotoxic aldehydes originating from the peroxidation of liver microsomal lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 792 (1984) 172–181.
- [19] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, M.U. Dianzani, G. Poli, T.F. Slater, Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes, *J. Biochem.* 208 (1982) 129–140.
- [20] G. Poli, M.U. Dianzani, K. Cheeseman, T.F. Slater, J. Lang, H. Esterbauer, Separation and characterization of the aldehydic products of lipid-peroxidation stimulated by carbon-tetrachloride or ADP iron in isolated rat hepatocytes and rat-liver microsomal suspensions, *J. Biochem.* 227 (1985) 629–638.
- [21] A.P.M. Loureiro, P. Di Mascio, O.F. Gomes, M.H.G. Medeiros, *Trans,trans*-2,4-decadienal-induced 1,N⁶-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 601–609.
- [22] V.M. Carvalho, P. Di Mascio, I.P. Arruda-Campos, T. Douki, J. Cadet, M.H.G. Medeiros, Formation of 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by *trans,trans*-2,4-decadienal, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1042–1047.
- [23] V.M. Carvalho, F. Asahara, P. Di Mascio, I.P. Arruda-Campos, J. Cadet, M.H.G. Medeiros, Novel 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 397–405.
- [24] G.A. Pandya, M. Moriya, 1,N⁶-Ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells, *Biochemistry* 35 (1996) 11487–11492.
- [25] S. Akasaka, F.P. Guengerich, Mutagenicity of site-specifically located 1,N²-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 501–507.
- [26] J. Cadet, T. Douki, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 143–153.
- [27] C.S. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.* 54 (1991) 659.
- [28] A.M. Held, D.J. Halko, J.K. Hurst, Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5732–5740.
- [29] P. Di Mascio, E.J.H. Bechara, M.H.G. Medeiros, K. Briviba, H. Sies, Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide, *FEBS Lett.* 355 (1994) 287–289.
- [30] J.R. Kanofsky, Singlet oxygen production by biological systems, *Chem. Biol. Interact.* 70 (1989) 1–28.
- [31] G. Cilento, in: W. Adam, G. Cilento (Eds.), *Chemical and Biological Generation of Excited States*, Academic Press, New York, 1982.
- [32] W. Adam, C.R. Saha-Möller, A. Schönberger, Photo-oxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type I and type II photosensitizers, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 9233–9238.
- [33] C. Pierlot, J.M. Aubry, K. Briviba, H. Sies, P. Di Mascio, Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media, *Methods Enzymol.* 319 (2000) 3–20.
- [34] G.A. Russell, Deuterium-isotope effects in the autoxidation of alkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 3871–3877.
- [35] J.A. Howard, K.U. Ingold, The self-reaction of *sec*-butyl-peroxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 1057–1058.
- [36] Q. Niu, G.D. Mendenhall, Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen (¹Δ_gO₂) from alkylperoxy radical recombination, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 1656–1657.
- [37] G.D. Mendenhall, X.C. Sheng, Yields of excited carbonyl species from alkoxyl and from alkylperoxy radical dismutation, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 8976–8977.
- [38] S. Miyamoto, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 6172–6179.
- [39] S. Miyamoto, G.R. Martinez, A.P.B. Martins, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Direct evidence of singlet molecular

- oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4510–4517.
- [40] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905.
- [41] J. Krutmann, Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatitis, *J. Dermatol. Sci.* 23 (2000) S22–S26.
- [42] L.O. Klotz, K.D. Kroncke, H. Sies, Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells, *Photochem. Photobiol. Sci.* 2 (2003) 88–94.
- [43] M.J. Steinbeck, A.U. Khan, M.J. Karnovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13425–13433.
- [44] P. Wentworth Jr., J.E. McDunn, A.D. Wentworth, C. Takeuchi, J. Nieva, T. Jones, C. Bautista, J.M. Ruedi, A. Gutierrez, K.D. Janda, B.M. Babior, A. Eschenmoser, R.A. Lerner, Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation, *Science* 298 (2002) 2195–2199.
- [45] B.M. Babior, C. Takeuchi, J. Ruedi, A. Gutierrez, P. Wentworth Jr., Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 3031–3034.
- [46] J.C. Niles, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, Spiroiminodihydantoin is the major product of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue, *Org. Lett.* 3 (2001) 963–966.
- [47] J. Cadet, M. Berger, T. Douki, B. Morin, S. Raoul, J.-L. Ravanat, S. Spinelli, Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage, *Biol. Chem.* 378 (1997) 1275–1286.
- [48] L.O. Klotz, C. Pellieux, K. Briviba, C. Pierlot, J.M. Aubry, H. Sies, Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA, *Eur. J. Biochem.* 260 (1999) 917–922.
- [49] V. Duarte, D. Gasparutto, L.F. Yamaguchi, J.-L. Ravanat, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediate oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 12622–12628.
- [50] C.J. Burrows, J.G. Muller, Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1109–1151.
- [51] J. Cadet, T. Douki, S. Frelon, S. Sauvaigo, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat, Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC–MS/MS measurement, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 441–449.
- [52] J. Cadet, T. Douki, S. Frelon, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, S. Sauvaigo, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di Mascio, Oxidative damage to DNA: formation and measurement, in: C. Pasquier (Ed.), *Proceedings of the 11th Conference of SFRRI*, Paris 2002, Monduzzi Editore, S.P.A. Bologna, Italy, 2002, pp. 129–135.
- [53] R. Singh, M. McEwan, J.H. Lamb, R.M. Santella, P.B. Farmer, An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 126–134.
- [54] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radic. Biol. Med.* 11 (1991) 81–128.
- [55] C.K. Winter, H.J. Segall, W.F. Haddon, Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes *trans*-4-hydroxy-2-hexenal and *trans*-4-hydroxy-2-nonenal in vitro, *Cancer Res.* 46 (1986) 5682–5686.
- [56] P. Yi, D. Zhan, V.M. Samokyszyn, D.R. Doerge, P.P. Fu, Synthesis and ^{32}P -postlabeling/high-performance liquid chromatography separation of diastereomeric 1, N^2 -(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine 3'-phosphate adducts formed from 4-hydroxy-2-nonenal, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 1259–1265.
- [57] H. Seto, T. Okuda, T. Takesue, T. Ikemura, Reaction of malondialdehyde with nucleic acid. I. Formation of fluorescent pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56 (1983) 1799–1802.
- [58] V. Nair, G.A. Turner, R.J. Offerman, Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3370–3371.
- [59] L.J. Marnett, A.K. Basu, S.M. O'Hara, P.E. Weller, A.F.M.M. Rahman, J.P. Oliver, Reaction of malondialdehyde with guanine nucleosides: formation of adducts containing oxadiazabicyclononene residues in the base-pairing region, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 1348–1350.
- [60] K. Stone, M. Ksebati, L.J. Marnett, Investigation of the adducts formed by reaction of malondialdehyde with adenosine, *Chem. Res. Toxicol.* 3 (1990) 33–38.
- [61] K. Stone, A. Uzieblo, L.J. Marnett, Studies of the reaction of malondialdehyde with cytosine nucleosides, *Chem. Res. Toxicol.* 3 (1990) 467–472.
- [62] L.J. Marnett, Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde, in: B. Singer, H. Bartsch (Eds.), *Exocyclic DNA Adducts in Mutagenesis and Carcinogenesis*, IARC Scientific Publication 150, Lyon, IARC, 1999, pp. 17–27.
- [63] B.M. Goldschmidt, T.P. Blazej, B.L. Van Duuren, The reaction of guanosine and deoxyguanosine with glycidaldehyde, *Tetrahedron Lett.* 13 (1968) 1583–1586.
- [64] V. Nair, R.J. Offerman, Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl-compounds and nucleic-acid bases, *J. Org. Chem.* 50 (1985) 5627–5631.
- [65] R.S. Sodem, F.L. Chung, 1, N^2 -ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by *trans*-4-hydroxy-2-nonenal, *Cancer Res.* 48 (1988) 320–323.
- [66] B.T. Golding, P.K. Slaich, G. Kennedy, C. Bleasdale, W.P. Watson, Mechanisms of formation of adducts from reactions of glycidaldehyde with 2'-deoxyguanosine and/or guanosine, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 147–157.
- [67] F.L. Chung, H.J. Chen, R.G. Nath, Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts, *Carcinogenesis* 17 (1996) 2105–2111.

- [68] A.J. Ham, A. Ranasinghe, H. Koc, J.A. Swenberg, 4-Hydroxy-2-nonenal and ethyl linoleate form $N^2,3$ -ethenoguanine under peroxidizing conditions, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1243–1250.
- [69] E.J. Morinello, A.J. Ham, A. Ranasinghe, R. Sangaiah, J.A. Swenberg, Simultaneous quantitation of $N^2,3$ -ethenoguanine and $1,N^2$ -ethenoguanine with an immunoaffinity/gas chromatography/high-resolution mass spectrometry assay, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 327–334.
- [70] A.P.M. Loureiro, S.A. Marques, C.C.M. Garcia, P. Di Mascio, M.H.G. Medeiros, Development of an on-line liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine $1,N^2$ -etheno-2'-deoxyguanosine in DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1302–1308.
- [71] A.P.M. Loureiro, P. Di Mascio, M.H.G. Medeiros, Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese, *Quim. Nova* 25 (2002) 777–793.
- [72] T. Kaneko, S. Honda, S. Nakano, M. Matsuo, Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts, *Chem. Biol. Interact.* 63 (1987) 127–137.
- [73] T. Kaneko, K. Kaji, M. Matsuo, Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes toward cultured human umbilical vein endothelial cells, *Chem. Biol. Interact.* 67 (1988) 295–304.
- [74] S.H. Lee, T. Oe, I.A. Blair, 4,5-Epoxy-2(E)-decenal-induced formation of $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $1,N^2$ -etheno-2'-deoxyguanosine adduct, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 300–304.
- [75] D.R. Doerge, M.I. Churchwell, J.L. Fang, F.A. Beland, Quantification of etheno DNA adducts using liquid chromatography, on-line sample processing, and electrospray tandem mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 1259–1264.
- [76] H.J.C. Chen, L.C. Chiang, M.C. Tseng, L.L. Zhang, J. Ni, F.L. Chung, Detection and quantification of $1,N^6$ -ethenoadenine in human placental DNA by mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1119–1126.
- [77] J. Nair, A. Barbin, Y. Guichard, H. Bartsch, $1,N^6$ -Etheno-deoxyadenosine and $3,N^4$ -ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/ ^{32}P -postlabeling, *Carcinogenesis* 16 (1995) 613–617.
- [78] R.R. Misra, S.Y. Chiang, J.A. Swenberg, A comparison of two ultrasensitive methods for measuring $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $3,N^4$ -etheno-2'-deoxycytidine in cellular DNA, *Carcinogenesis* 15 (1994) 1647–1652.
- [79] J. Nair, A. Barbin, I. Velic, H. Bartsch, Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species, *Mutat. Res.* 424 (1999) 59–70.
- [80] W.P. Watson, J.P. Aston, T. Barlow, A.E. Crane, D. Potter, T. Brown, Detection of $1,N^6$ -etheno-2'-deoxyadenosine and $3,N^4$ -etheno-2'-deoxycytidine occurring endogenously in DNA, in: IARC Scientific Publication 150, Lyon, France, 2000, pp. 63–73.
- [81] D.W. Roberts, M.I. Churchwell, F.A. Beland, J.L. Fang, D.R. Doerge, Quantitative analysis of etheno-2'-deoxycytidine DNA adducts using on-line immunoaffinity chromatography coupled with LC/ES–MS/MS detection, *Anal. Chem.* 73 (2001) 303–309.
- [82] H. Bartsch, A. Barbin, M.J. Marion, J. Nair, Y. Guichard, Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA, *Drug Metab. Rev.* 26 (1994) 349–371.
- [83] N. Fedtke, J. A. Boucheron, V.E. Walker, J. A. Swenberg, Vinyl chloride-induced DNA adducts. II. Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and $N^2,3$ -ethenoguanine in rat tissue DNA, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1287–1292.
- [84] T.Y. Yen, N.I. Christova-Gueogueieva, N. Scheller, S. Holt, J.A. Swenberg, M.J. Charles, Quantitative analysis of the DNA adduct $N^2,3$ -ethenoguanine using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1271–1276.
- [85] A.J.L. Ham, A. Ranasinghe, E.J. Morinello, J. Nakamura, P.B. Upton, F. Johnson, J.A. Swenberg, Immunoaffinity/gas chromatography/high-resolution mass spectrometry method for the detection of $N^2,3$ -ethenoguanine, *Chem. Res. Toxicol.* 12 (1999) 1240–1246.
- [86] J. Nair, P.L. Carmichael, R.C. Fernando, D.H. Phillips, A.J. Strain, H. Bartsch, Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7 (1998) 435–440.
- [87] J. Nair, H. Sone, M. Nagao, A. Barbin, H. Bartsch, Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long–Evans–Cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 56 (1996) 1267–1271.
- [88] J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S.R. Tannenbaum, G.N. Wogan, H. Bartsch, Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide, *Carcinogenesis* 19 (1998) 2081–2084.
- [89] K. Schmid, J. Nair, G. Winde, I. Velic, H. Bartsch, Increased levels of promutagenic etheno-DNA adducts in colonic polyps of FAP patients, *Int. J. Cancer* 87 (2000) 1–4.
- [90] J. Nair, C.E. Vaca, I. Velic, M. Mutanen, L.M. Valsta, H. Bartsch, High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6 (1997) 597–601.
- [91] J. Nair, G. Furstenberger, F. Burger, F. Marks, H. Bartsch, Promutagenic etheno-DNA adducts in multistage mouse skin carcinogenesis: correlation with lipoxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 703–709.
- [92] F. El Ghissassi, A. Barbin, J. Nair, H. Bartsch, Formation of $1,N^6$ -ethenoadenine and $3,N^4$ -ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases, *Chem. Res. Toxicol.* 8 (1995) 278–283.
- [93] H.J. Chen, L. Zhang, J. Cox, J.A. Cunningham, F.L. Chung, DNA adducts of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal: detection of 7-(1',2'-dihydroxyheptyl)-3H-imidazo[2,1-i] purine and $1,N^6$ -ethenoadenine by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 11 (1998) 1474–1480.

- [94] R.S. Sodom, F.-L. Chung, Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal, *Cancer Res.* 51 (1991) 137–143.
- [95] H.-J.C. Chen, F.-Y. Chung, Epoxidation of *trans*-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide, *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996) 306–312.
- [96] M. Awada, P.C. Dedon, Formation of the 1,*N*²-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1247–1253.
- [97] J.A. Swenberg, N. Fedtke, F. Ciroussel, A. Barbin, H. Bartsch, Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride-exposed rats are highly persistent in liver, *Carcinogenesis* 13 (1992) 727–729.
- [98] G. Eberle, A. Barbin, R.J. Laib, F. Ciroussel, J. Thomale, H. Bartsch, M.F. Rajewsky, 1,*N*⁶-Etheno-2'-deoxyadenosine and 3,*N*⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride, *Carcinogenesis* 10 (1989) 209–212.
- [99] P.G. Foiles, L.M. Miglietta, A. Nishikawa, J.T. Kusmirek, B. Singer, F.L. Chung, Development of monoclonal antibodies specific for 1,*N*²-ethenodeoxyguanosine and *N*²,3-ethenodeoxyguanosine and their use for quantitation of adducts in G12 cells exposed to chloroacetaldehyde, *Carcinogenesis* 14 (1993) 113–116.
- [100] M. Müller, F.J. Belas, I.A. Blair, F.P. Guengerich, Analysis of 1,*N*²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*] purine in DNA treated with 2-chlorooxirane by high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and comparison of amounts to other DNA adducts, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 242–247.
- [101] S. Langouët, M. Müller, F.P. Guengerich, Misincorporation of dNTPs opposite 1,*N*²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine in oligonucleotides by *Escherichia coli* polymerases I *exo*[−] and II *exo*[−], T7 polymerase *exo*[−] human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase, and rat polymerase β, *Biochemistry* 36 (1997) 6069–6079.
- [102] S. Langouët, A.N. Mican, M. Müller, S.P. Fink, L.J. Marnett, S.A. Muhle, F.P. Guengerich, Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by *Escherichia coli* polymerases in vitro and in vivo: 1,*N*²-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1,2-*a*]purine, *Biochemistry* 37 (1998) 5184–5193.
- [103] M. Saparbaev, S. Langouët, C.V. Privezentzev, F.P. Guengerich, H. Cai, R.H. Elder, J. Laval, 1,*N*²-Ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of *Escherichia coli* mismatch-specific uracil–DNA glycosylase and human alkylpurine–DNA–*N*-glycosylase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 26987–26993.