

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

FLAVIA DANIELA MOTTA

**Geração de ozônio isotopicamente marcado com
átomo de oxigênio-18, ($^{18}\text{O}_3$), formando oxigênio-18
molecular singlete, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, e modificações na
2'- desoxiguanosina**

Versão corrigida da tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

**Data do Depósito na SPG:
01/06/2011**

FLAVIA DANIELA MOTTA

Geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18, ($^{18}\text{O}_3$), formando oxigênio-18 molecular singlete, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), e modificações na 2'-desoxiguanosina

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

Orientador: Prof. Dr. Paolo Di Mascio

São Paulo

2011

Flavia Daniela Motta

Geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18, ($^{18}\text{O}_3$), formando oxigênio-18 molecular singlete, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, e modificações na 2'-desoxiguanosina.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais Floriano e Maria por todo amor, sabedoria, dedicação e apoio em todas as circunstâncias. Pelo exemplo de dignidade, humildade, perseverança, trabalho e altruísmo.

Amo vocês!

As minhas irmãs Paula e Marcia por todo carinho, incentivo e pela paciência. Uma por todas e todas por uma, sempre!

Aos Meus cunhados Alexandre e Felipe e sobrinhos Phelipe e Pamella pelo carinho, descontração e apoio.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Paolo Di Mascio pela orientação científica, oportunidade, respeito, discussões construtivas e pela amizade. Obrigada por contribuir para meu crescimento pessoal, profissional e por ter acreditado em mim em todos os momentos. Não tenho palavras para expressar a minha profunda admiração por você!

À Professora Dra. Sayuri Miyamoto pelas discussões construtivas.

À professora Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros por ter me acolhido em seu laboratório por um pequeno período que fez toda a diferença, obrigada.

À professora Dra. Glaucia Regina Martinez por compartilhar seus conhecimentos com simplicidade e entusiasmo.

Ao Dr. Jean Cadet pesquisador do CEA - Grenoble - França. Obrigada pela discussão científica e pela colaboração.

À Maria Oliveira pela grande amizade e por todos os momentos de alegria, felicidade, conquistas, dor, incerteza e pelas lágrimas. Você estará sempre no fundo do meu coração. Prometo que vou te visitar na pracinha...

À Kalyнца B.A.R. Fernandes, minha grande amiga. Obrigada por todos os momentos que passamos juntas e por todo apoio.

À Kerolyn S. Valente por toda amizade, respeito, alegria, entusiasmo e carinho.

Obrigada, minha linda! Meu grande presente

À Alessandra C. Scalfo pelos experimentos realizados nos finais de semana, feriados e os noturnos, pela amizade, respeito, companheirismo e descontração.

(Alê Mara, o pico sumiu!!!)

Aos meninos encantadores do laboratório, Pedro e Florêncio. Obrigada pelos grandes momentos de descontração, discussão científica, amizade e apoio. Flofs, obrigada pelas músicas ao anoitecer.

Ao Osmar Gomes pela amizade, respeito e por compartilhar a sua competência em HPLC com todos nós.

À Dra. Camila Carrião pela amizade, apoio e ajuda no espectrômetro de massas.

À Paty e a Pri por todo carinho, amizade e apoio. Pri, obrigada pelas discussões de massa.

À Letícia Favero pela alegria, descontração, experimentos, discussões, ajuda na busca de elucidar X_1 e X_2 e pelas dicas de baladas.

À Tereza, Gabriella e a Simone pelas conversas e amizade. Tereza, obrigada pela paciência de satisfazer as minhas curiosidades dos seus testes.

Aos professores das Faculdades Oswaldo Cruz.

Aos amigos da graduação: Silvia, Renata, Kelly e Flavio.

Ao Divinomar pelos conhecimentos em fotoquímica e entusiasmos pela ciência.

Ao Técnico Luiz por toda ajuda, empréstimos de reagente e simpatia.

A todos os colegas dos laboratórios Paolo, Marisa, Sayuri e agregados - Graziella, Maurício, Izaura, Fernanda Sena, Miriam, Agda, Thaís, Liz, Marilene, Fernanda, Emerson, Ivone, Lívea, Alexandre, Raul, Henrique, Angélica, Thiago, Tati, Maitê, Henrique, Guilherme, Wanderson, Fernandão, Rafa, Daniela, Zilda, Alê Vaz Machado, Chris, Rafael, Mariana. Agradeço pelo convívio agradável, pelos momentos de descontração e pela contribuição direta ou indireta ao meu crescimento e fortalecimento pessoal e profissional. OBRIGADA!

À secretária de pós-graduação.

A todos os funcionários e professores do Instituto de Química.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma.

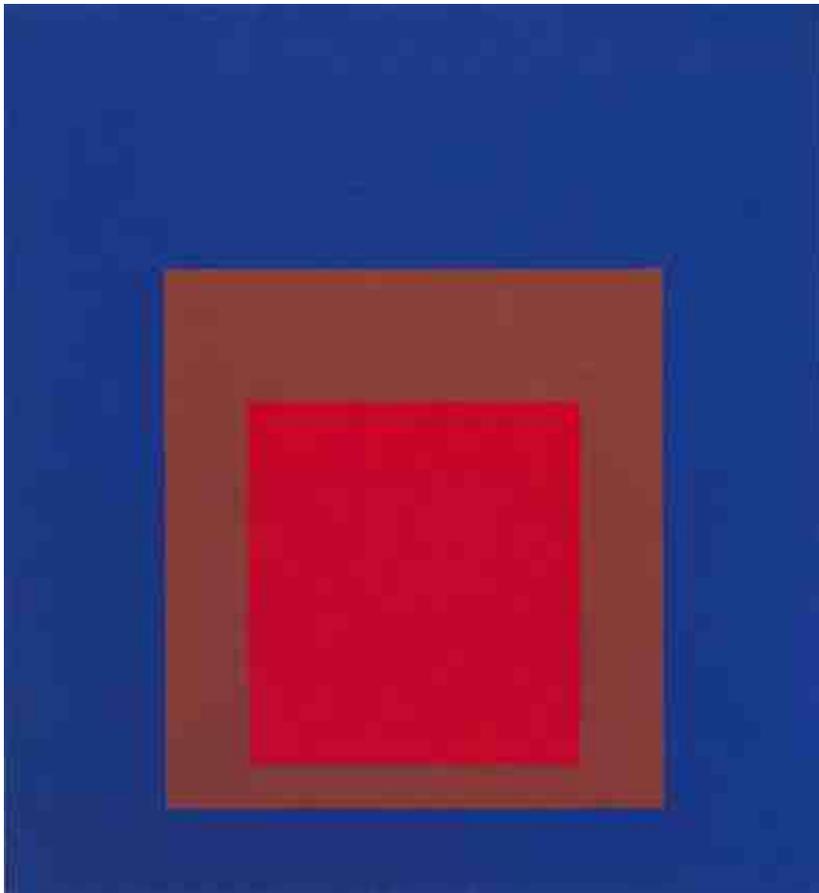
Pró Reitoria de Pesquisa-USP.

Agradecimento especial à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

*"Fora dos muros de Verona não é mundo para mim: o resto da terra
não é outra coisa que uma permanência de desolação e de pena.*

Banido desse lugar sou banido do universo."

(W. Shakespeare no ato III de Romeu e Julieta)



Josef Albers, *Homage to the Square: On an Early Sky*, 1964.

RESUMO

Motta, F.D. **Geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18, ($^{18}\text{O}_3$), formando oxigênio-18 molecular no estado singlete, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), e modificações na 2'-desoxiguanosina** 2011. 318p. Tese – Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ozônio (O_3) é um poderoso oxidante e quantidades significativas podem ser formadas em ambientes urbanos, como resultado de uma série de eventos fotoquímicos, sendo um risco para a saúde humana. Devido a sua reatividade química, o ozônio é capaz de promover modificações oxidativas em diversas biomoléculas, tais como, DNA, proteínas e lipídios. As reações do O_3 com biomoléculas geram quantidades significativas de O_2 ($^1\Delta_g$). Sendo assim, essas reações são caracterizadas pela transferência de um átomo de oxigênio do O_3 ao substrato oxidado. Devido à regra de conservação do *Spin*, isto requer que o dióxigênio gerado nesta reação esteja no seu estado singlete. Neste específico mecanismo, a formação do hidrotrióxido tem sido frequentemente assumida como um importante intermediário da ozonização. Ainda, constatou-se o elevado potencial mutagênico do O_3 sobre o DNA, levando, principalmente, à substituição de suas bases. A frequência das substituições das bases foi essencialmente localizada no par G: C's (75%), uma característica das espécies reativas de oxigênio, como o O_2 ($^1\Delta_g$). No entanto, os mecanismos pelos quais O_3 causa danos ao DNA ainda não foram completamente elucidados. No presente trabalho, as evidências espectroscópicas na geração do O_2 ($^1\Delta_g$) foram obtidas através da emissão de luz bimolecular na região vermelha do espectro ($\lambda = 634 \text{ nm}$) e através da emissão de luz monomolecular na região do infravermelho próximo ($\lambda = 1270 \text{ nm}$) durante a reação de O_3 com dGuo e 8-oxodGuo. Além disso, desenvolveu-se uma metodologia para a geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18 a partir do $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$). Deste modo, as evidências da formação dos diastereoisômeros da spiroiminodihidantoina, tanto a isotopicamente marcada no ^{18}O quanto a não marcada, juntamente com a 8-oxodGuo, imidazolona e oxazolona, foram detectados como produtos de oxidação das reações com $^{18}\text{O}_3$. Para tal observação, análises foram realizadas por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas. Ademais, a detecção do $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) durante a decomposição do $^{18}\text{O}_3$ foi obtida por captação química do O_2 ($^1\Delta_g$) pelo derivado de antraceno, EAS, detectando o endoperóxido corresponde com a adição de dois átomos de ^{18}O na posição 9,10 do antraceno. Além disso, mais uma evidência da presença do O_2 ($^1\Delta_g$) foi inequivocamente demonstrada pela caracterização do espectro de emissão no infravermelho próximo.

Palavras-chave: Oxigênio molecular singlete, ozônio, DNA, marcação isotópica, quimiluminescência e espectrometria de massas.

ABSTRACT

Motta, F.D. **Isotopically labeled ozone, $^{18}\text{O}_3$, generate ^{18}O -labeled singlet molecular oxygen, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, and oxidation of product of the purine moiety of 2'-deoxyguanosine.** 2011. 318p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ozone (O_3) is a potent oxidant and significant amounts can be formed in urban environments as a result of a series of complex photochemical events. It is a threat for human health. Due its chemical reactivity towards biological targets, ozone is able to promote oxidative modification in several biomolecules, such as DNA, proteins and lipids. Reactions of O_3 with biomolecules are able to generate in high yields of singlet molecular oxygen [$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$]. The transfer of one oxygen atom from O_3 to the oxidized substrate characterizes these reactions. Spin conservation rules require that the dioxygen generated in this reaction has to be in its singlet state. In this specific mechanism, hydrotrioxide has often been assumed as important intermediates in the ozonization process. In addition, ozone has been established as a powerful mutagenic agent, and the most observed mutation is in G:C transversion. This kind of transversion is typical in reactions involving DNA and reactive oxygen species, such as $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. However, the mechanisms by which O_3 causes DNA damage have not yet been fully elucidated. In the present research, spectroscopic evidence for the generation of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ was obtained by measuring the dimol light emission in the red spectral region ($\lambda = 634 \text{ nm}$) and the monomol light emission in the near-infrared region ($\lambda=1270 \text{ nm}$). Both measurements were done during interaction of O_3 with dGuo and 8-oxodGuo. In addition, a system was built to produce isotopically labeled ozone with ^{18}O . Therefore, in the same system that 8-oxodGuo, imidazolone and oxazolone, ^{18}O -labeled and unlabeled diastereoisomeric spiroiminodihydantoin nucleosides were detected as the oxidation products with $^{18}\text{O}_3$. In that case, analyses by HPLC coupled to mass spectrometry were performed. Moreover, in the O_3 decomposition the formation of ^{18}O -labeled $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ from ^{18}O -labeled ozone was obtained by chemical trapping of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ with EAS anthracene derivative and detected the corresponding ^{18}O -labeled EAS endoperoxide. More evidence of the presence of $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ was unequivocally demonstrated by the direct characterization of the near-infrared light emission spectrum.

Keywords: Singlet molecular oxygen, ozone, DNA, isotopic labelling, chemiluminescence, mass spectrometry.

ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\Delta_g$	Primeiro estado excitado do oxigênio molecular (delta)
$^1\Sigma_g^+$	Segundo estado excitado do oxigênio molecular (sigma)
$^3\Sigma_g^-$	Estado triplete do oxigênio molecular (sigma)
λ	Comprimento de onda
ε	coeficiente de absorvidade molar
τ	Tempo de meia vida
4-OH-8-oxodGuo	4-OH-8-oxodGuo-4-Hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
5 α -OOH	3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ene-5-hidroperóxido
5-OOH-8-oxodGuo	5-hidroxiperoxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
5-OH-8-oxodGuo	5-OH-8-oxodGuo-5-Hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
8-BrdGuo	8-Bromo-2'-desoxiguanosina
8-MeOdGuo	8-Metoxi-2'-desoxiguanosina
8-oxodGuo	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
Ade	Adenina
ACN	Acetonitrila
Cyt	Citosina
DABCO	1,4-diazobiciclo[2,2,2]octano
Da	Dalton
dGhox	Guanidinhidantoína oxidada
dAdo	2'-desoxiadenosina
dCyd	2'-desoxicitidina

dGuo	2'-desoxiguanosina
dThd	Timidina
dOxa	Ácido oxalúrico
dOz	Oxazolona
dSp	Espiroiminodihidantoína-2'-desoxirribonucleosídeo
DHPN	N,N'-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida
DHPN	N-(2,3-dihidroxiopropil)-3-{4-[2-(2,3-dihidroxiopropilcarbomoil)-etil]-naftalen-1-il}-propanamida
DHPN ¹⁸ O ₂	Endoperóxido N,N'-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida marcado com oxigênio-18
DHPNO ₂	Endoperóxido N,N'-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
dlz	Imidazolona
DMN	1,4-Dimetilnaftaleno
DMNO ₂	Endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EAS	Sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracên-9-il]-etil}éster de sódio
EAS ¹⁸ O ₂	Endoperóxido do sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-etil}éster de sódio marcado com oxigênio-18
EASO ₂	Endoperóxido do sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-etil}éster de sódio
EROs	espécie reativa de oxigênio
ESI-	Modo negativo de ionização por <i>electrospray</i>
ESI+	Modo positivo de ionização por <i>electrospray</i>
Gua	Guanina
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
imidazolona	2-Amino-5-[(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)-amino]-

	4H-imidazol-4-ona
ISC	Cruzamento intersistema
LOO•	Radical peroxila lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
m/z	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas com detecção em tandem
MS ²	Segundo analisador do espectrômetro de massas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NDPO ₂	Endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio
Oxazolona	2,2-Diamino-4-[-(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil) amina]-5-(2H)-oxazolona
QL	Quimiluminescência
RO•	Radical alcoxila
ROO•	Radical peroxila
ROOH	Peróxido orgânico
ROOOH	Hidrotrióxido orgânico
sens	Sensibilizador
Thy	Timina
UV	Ultravioleta
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
IPEN	Instituto de Pesquisas Nucleares
OMS	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>Espécies reativas de oxigênio</i>	25
1.2 <i>Oxigênio molecular singlete</i>	31
1.2.2 <i>Desativação do oxigênio molecular singlete</i>	35
1.2.2.1 <i>Tempo de vida do oxigênio molecular singlete</i>	35
1.2.2.2 <i>Desativação física e química do oxigênio molecular singlete</i>	37
1.2.3 <i>Tipos de reações do oxigênio molecular singlete</i>	40
1.2.4 <i>Fontes químicas de oxigênio molecular singlete</i>	44
1.2.4.1 <i>Fotossensibilização</i>	45
1.2.4.2 <i>Endoperóxido de naftaleno</i>	47
1.2.4.3 <i>Peróxido de hidrogênio</i>	49
1.2.4.4 <i>Dioxetanos</i>	50
1.2.4.5 <i>Trióxido</i>	51
1.2.4.6 <i>Ozônio</i>	52
1.2.4.7 <i>Peroxinitrito</i>	53
1.2.5 <i>Captadores químicos</i>	53
1.3 <i>Geração de oxigênio molecular singlete em sistema biológico.</i>	55
1.4 <i>Reações do oxigênio molecular singlete com DNA</i>	63
1.5 <i>Ozônio</i>	70
1.6 <i>Propriedades físico- químicas do O₃</i>	75
1.7 <i>Geração de oxigênio molecular singlete proveniente da reação de Ozônio com biomolécula, compostos orgânicos e inorgânicos.</i>	79
1.8 <i>Reações do ozônio com Biomoléculas</i>	90
1.8.1 <i>DNA e Bases nitrogenadas</i>	90
1.8.2 <i>Lipídios</i>	92
1.8.3 <i>Aminoácidos, peptídeos e proteínas</i>	94

1.8.4 Poliaminas: Espermina e Espermidina _____	94
1.9 Ozônio terapia, o O_3 possui propriedades terapêuticas? _____	95
2. OBJETIVO _____	97
2.1 Objetivo geral _____	97
2.2 Metas _____	97
3 MATERIAIS E MÉTODOS _____	98
3.1 Materiais _____	98
3.2 Equipamentos _____	99
3.3 Geração do O_3 _____	100
3.4 Quantificação do ozônio _____	100
3.4.1 Iodometria _____	100
3.4.2 Análise espectrofotométrica do UV- visível _____	104
3.4.3 Método utilizado para a quantificação do ozônio nos fluxo de 6 e 8 mL a 25 e 50% do potencial de redução do ozonizador. _____	104
3.5 Decomposição do ozônio por espectrometria UV-Visível _____	105
3.6 Sínteses: Endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno; 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e Diastereoisômeros da Espiroiminodihidantoína. _____	106
3.6.1 Foto-oxidação do 1,4-dimetilnaftaleno _____	106
3.6.2 Sínteses da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina. _____	108
3.6.2.2 Síntese da 8-Bromo--2'-desoxiguanosina _____	109
3.6.2.3 Síntese da 8- (benziloxi)-2'-desoxiguanosina _____	109
3.6.2.4 Síntese da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina _____	110
3.6.2.5 Purificação da 8-oxodGuo por HPLC. _____	111
3.6.2.6 Análise da 8-oxodGuo por HPLC acoplado ao espectrômetro de massa. _____	112
3.6.3 Síntese, purificação e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína-2'-desoxirribose. _____	112
3.7 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com 2'-desoxiguanosina. _____	114

3.8 Efeito do pH nas medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com os nucleosídeos isolados e seus derivados e poliaminas. _____	115
3.8.1 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com nucleosídeos. _	116
3.8.2 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com bases nitrogenadas. _____	117
3.8.3 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com xantina. _____	117
3.8.4 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com a 8-oxodGuo. __	117
3.8.5 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com as poliaminas: espermina e espermidina. _____	118
3.9 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) da reação da dGuo ozonizada após a injeção de com Ce^{4+} . _____	118
3.10 Quimiluminescências da decomposição do ozônio _____	119
3.11 Medidas da emissão bimolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com 2'-desoxiguanosina _____	120
3.12 Medidas da emissão bimolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com as poliaminas espermina e espermidina. _____	122
3.13 Análise dos produtos formados da oxidação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com o $^{16}O_3$. _____	123
3.13.1. Caracterização e detecção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina gerada na reação a 2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	125
3.13.1.1 Análise da fragmentação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina gerada na reação de 2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	126
3.13.2. Caracterização e Detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	126
3.13.2.1 Análise da fragmentação de espiroiminodihidantoína gerada na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	127
3.13.3 Caracterização e detecção de imidazolona e oxazolona geradas na reação a 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	127
3.13.4 Caracterização e detecção de X_1 e X_2 gerados na reação a 2'-desoxiguanosina e $^{15}N_5$ -2'-desoxiguanosina com $^{16}O_3$. _____	128

3.13.4.1 Análise da fragmentação da X ₁ e X ₂ gerados na reação a 2'-desoxiguanosina e ¹⁵ N ₅ -2'-desoxiguanosina com ¹⁶ O ₃ .	128
3.14 Análise dos produtos formados na reação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina (MeOdGuo) como ¹⁶ O ₃ .	129
3.15 Geração do ozônio isotopicamente marcado no átomo de oxigênio molecular-18.	130
3.15.1. Captação química do ¹⁸ O ₂ (¹ Δ _g) gerado na reação da 2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ utilizando EAS e gerando EAS ¹⁸ O ₂ .	131
3.15.2 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	133
3.15.2.1. Caracterização e detecção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina gerada na reação a 2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	133
3.15.2.1.1 Análise da fragmentação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada gerada na reação de 2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	134
3.15.2.2 Caracterização e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	134
3.15.2.2.1 Análise da fragmentação de espiroiminodihidantoína isotopicamente marcada gerada na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	135
3.15.2.3. Caracterização e Detecção de imidazolona e oxazolona isotopicamente marcadas geradas na reação a 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	135
3.15.4 Caracterização e detecção de X ₁ e X ₂ gerados na reação a 2'-desoxiguanosina e ¹⁵ N ₅ -2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	136
3.15.4.1 Análise da fragmentação da X ₁ e X ₂ gerados na reação a 2'-desoxiguanosina e ¹⁵ N ₅ -2'-desoxiguanosina com ¹⁸ O ₃ .	136
3.16 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação da [¹⁵ N ₅]-2'-desoxiguanosina com ¹⁶ O ₃ .	137
3.17 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com ¹⁶ O ₃ .	138
4 RESULTADOS	139
4.1 Medidas de concentração de ozônio	139

4.1.1 Iodometria _____	139
4.1.2 Avaliação da concentração de ozônio por Espectrofotometria UV-Visível. _____	141
4.2 Sínteses: Do endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina - Diastereoisômeros da Espiroiminodihidantoína. _____	143
4.2.1 Endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO ₂) _____	143
4.2.2 Síntese da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina _____	145
4.2.3 Síntese e purificação dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína . _____	151
4.3 Medidas da emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação de O ₃ com 2'-desoxiguanosina. __	154
4.4 Efeito do pH nas medidas da emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação de O ₃ com os nucleosídeos isolados e seus derivados e poliaminas. _____	158
4.4.1 Medidas de emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação das purinas: 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiadenosina e com as bases nitrogenadas Guanina, Adenina, 8-oxodGuo e Xantina com ozônio. _____	160
4.4.2 Medidas de emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação das pirimidinas: 2'-desoxicidina (dC), Timidina e suas bases nitrogenadas Citosina e Timina com O ₃ . _____	164
4.4.3 Medidas de emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação das poliaminas: Espermina e Espermidina com ozônio. _____	167
4.5 Medidas da emissão monomolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação dos produtos de reação de O ₃ com a dGuo na presença de Ce ⁴⁺ . _____	169
4.6 Medidas da emissão bimolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação de O ₃ com 2'-desoxiguanosina. _____	170
4.7 Medidas da emissão bimolecular do O ₂ (¹ Δ _g) na reação de O ₃ com as poliaminas espermina e espermidina. _____	175
4.8 Quimiluminescências durante a decomposição do ozônio na emissão monomolecular e bimolecular do O ₂ (¹ Δ _g) e por espectrometria UV-Visível. _____	178
4.8.1 Absorção UV-Visível durante a decomposição do ozônio. _____	178
4.8.2 Luminescência durante a decomposição do ozônio _____	180
4.9 Caracterização da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o ¹⁶ O ₃ e ¹⁸ O ₃ e por [¹⁵ N ₃]-dGuo com ¹⁶ O ₃ . _____	184

4.10 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína formada na reação da 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com $^{16}\text{O}_3$.	191
4.11 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína formada na reação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e 8-metoxi-2'-desorribose com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e $^{16}\text{O}_3$.	209
4.12 Caracterização da Imidazolona e Oxazolona formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com $^{16}\text{O}_3$.	221
4.13 Caracterização de X_1 e X_2 formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com $^{16}\text{O}_3$.	234
4.14. Captação química do $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) gerado na reação de 2'-desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$ e durante a decomposição do $^{16}\text{O}_3$ utilizando EAS e analisado EAS $^{18}\text{O}_2$.	243
5. DISCUSSÃO	248
5.1 Geração e concentração do O_3 .	250
5.2 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com moléculas orgânicas.	251
5.2.1 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação da Guanina e da 2'-desoxiguanosina com O_3 .	252
5.2.2 Medidas de emissão monomolecular na reação da Adenina e 2'-desoxiadenosina com O_3 .	255
5.2.3 Medidas de emissão monomolecular na reação da Xantina com O_3 .	256
5.2.4 Medidas de emissão monomolecular na reação da 8-oxodGuo com O_3 .	257
5.2.5 Medidas de emissão monomolecular na reação da timina e timidina com O_3 .	260
5.2.6 Medidas de emissão monomolecular na reação da citosina e 2'-desoxicitidina com O_3 .	262
5.2.7 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação das poliaminas: Espermina e Espermidina com ozônio.	264
5.3 Medidas da emissão bimolecular do O_2 ($^1\Delta_g$)	265
5.3.1 Medidas da emissão bimolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com a 2'-desoxiguanosina.	265
5.3.2 Medidas da emissão bimolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) com as poliaminas.	266

5.3.3. Quimiluminescência durante a decomposição do ozônio e captação química do $O_2 (^1\Delta_g)$ por EAS.	267
5.3.4 Caracterização da 8-oxodGuo	270
5.3.5 Caracterização da dSp	274
5.3.6 Caracterização da Imidazolona e Oxazolona	279
5.3.7 X_1 e X_2	282
6. CONCLUSÃO	284
7. PERSPECTIVAS	286
8. BIBLIOGRAFIA	288
APÊNDICES	316
<i>Apêndice A - Esquema de dois sistemas de utilizado para detecção de emissão de luz montado no laboratório.</i>	<i>316</i>
<i>Apêndice B - Cromatograma com detecção UV a 230 nm da reação da dGuo com ozônio em diferentes pH's.</i>	<i>317</i>
<i>Apêndice C - Cromatograma detecção UV a 230 nm da reação da dGuo com ozônio em H_2O e D_2O</i>	<i>318</i>
ANEXOS	319
SÚMULA CURRICULAR	319

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas incluem espécies radicalares, espécies não radicalares e espécies eletronicamente excitadas, como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical alcóxila ($\text{RO}\cdot$), radical peróxila ($\text{ROO}\cdot$), o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2\cdot$), peroxinitrito (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hipoclorito (HOCl), hidroperóxidos orgânicos (ROOH) ozônio (O_3) e oxigênio molecular singlete [$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$], (Halliwell e Gutteridge, 2007) . A tabela 1.1 apresenta o tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) estimado para algumas espécies reativas.

Tabela 1.1 – Tempo de meia vida ($\tau_{1/2}$) estimado de algumas espécies reativas.

Espécies reativas	$\tau_{1/2}$ (segundos)
$\cdot\text{OH}$	$<10^{-9}$
$\text{RO}\cdot$	$\sim 10^{-6}$
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	$\sim 10^{-6}$
$\text{NO}_2\cdot$	$\sim 10^{-6}$
ONOO^-	$10^{-3}-10^{-1}$
$\text{NO}\cdot$	1-10
$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$	10^{-6}
$\text{ROO}\cdot$	7

www.kinetics.nist.gov/solution/index.php.

A fim de entender o impacto biológico das espécies reativas de oxigênio (EROs), é importante o conhecimento de quais espécies são produzidas e em que condições. Assim tem-se como desafio conciliar a química com a biologia sobre um aspecto mecanístico. Para tal observação requer a identificação de oxidantes específicos envolvidos em um processo biológico, o conhecimento de sua reatividade e a dinâmica dos processos (Winterbourn, 2008).

Os sistemas biológicos são constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio. Algumas dessas espécies são produzidas especificamente em processos fisiológicos relevantes. (Valko M, *et. al.*, 2004).

As espécies reativas de oxigênio são capazes de gerar danos biológicos, tais como oxidação de biomoléculas, incluindo DNA, RNA, lipídeos, carboidratos, antioxidantes e proteínas, e, além disso, são relacionadas ao envelhecimento e a determinadas patologias, incluindo o câncer e doenças cardiovasculares, inflamatórias, dentre outras. Não obstante, espécies reativas de oxigênio são ainda relacionadas aos processos de morte celular, tanto por necrose quanto por apoptose (Navarro, 2009).

Ainda, EROs podem ser produzidas por radiação ionizante, radiação UV e no metabolismo de xenobióticos. Destaca-se, por tanto, a respiração mitocondrial como uma importantíssima fonte de EROs. Em termos gerais, no metabolismo de organismos aeróbicos, o oxigênio molecular triplete [$O_2 (^3\Sigma_g^-)$] é essencial para fornecer energia por meio da combustão de alimentos através para a geração de ATP. Dentro deste contexto, ressalta-se a importância da mitocôndria, uma organela celular, no interior da qual ocorre o principal metabolismo oxidativo dos eucariotos. Uma das funções indispensáveis para a vida celular é a síntese de ATP, a qual

ocorre na matriz mitocondrial devido ao acoplamento da cadeia de transporte de elétrons com a fosforilação oxidativa (D. Voet e J.Voet, 2006).

Durante o processo de respiração celular, o oxigênio molecular é reduzido à água através de um processo de transferência sequencial de 4 elétrons, o qual é finalizado pela citocromo oxidase (complexo IV). Ainda que a cadeia de transporte de elétrons seja um sistema eficiente, existe um pequeno e contínuo vazamento de elétrons. O oxigênio molecular presente na reação sofre uma redução monoelétrica, o que ocorre principalmente nos complexos I, II e III (Cadenas e Davies, 2000; Kowaltowski, 2001). Ademais, o acúmulo das coenzimas reduzidas, NADH e FADH₂, gera um maior potencial de membrana, proporcionando, assim, um aumento no tempo de meia vida desses intermediários reduzidos da cadeia de transporte de elétrons – esse estado reduzido facilita o vazamento de elétrons. A figura 1.1 mostra o esquema da cadeia de transporte de elétrons, (D. Voet e J.Voet, 2006).

O produto primário do vazamento de elétrons é o O₂^{•-}, formado pela adição de um elétron ao O₂ (³Σ_g⁻), o qual é menos reativo que o [•]OH e não reage com a maioria das moléculas biológicas em solução aquosa. Apesar de ser pouco reativo, o O₂^{•-} desaparece rapidamente em solução devido à reação de dismutação catalisada enzimaticamente pela superóxido dismutase, resultando em uma molécula de O₂ (³Σ_g⁻) e H₂O₂. Contudo, o O₂^{•-} pode atuar como agente redutor, sendo capaz de doar elétrons para o citocromo c (Halliwell e Gutteridge, 2007). O H₂O₂ possui baixa reatividade, mas solubiliza-se em água e pode difundir entre as células.

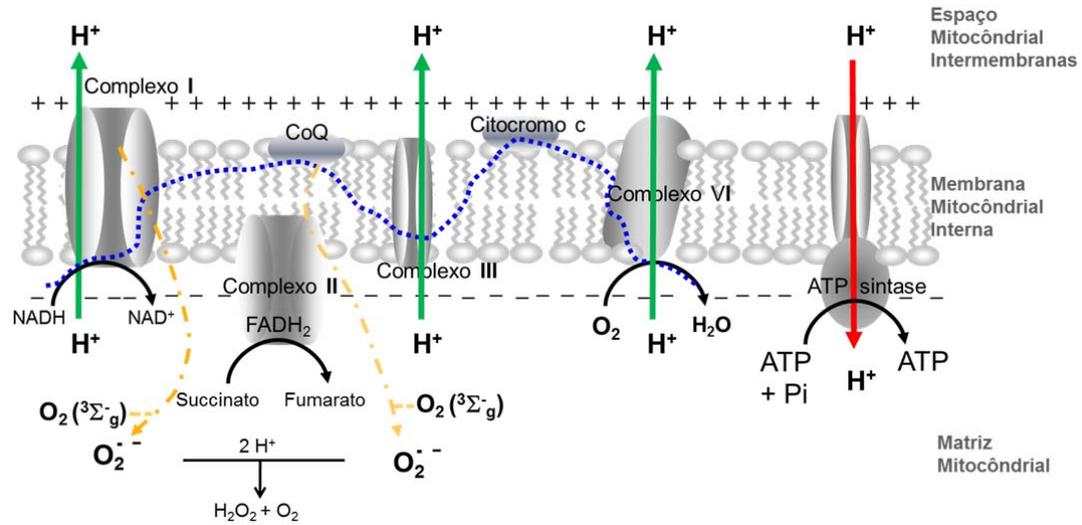
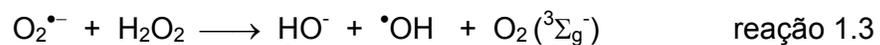
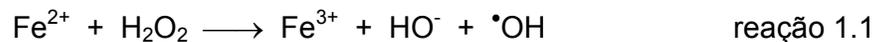


Figura 1.1- Esquema da cadeia de transporte de elétrons – Respiração mitocondrial e formação do ânion radical superóxido.

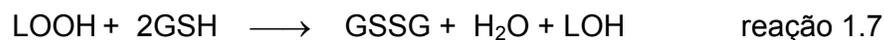
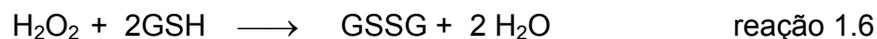
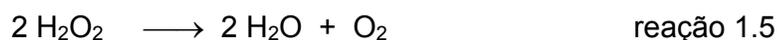
Além disso, danos em biomoléculas podem ser formados por espécies reativas catalisadas por metais de transição. O peróxido de hidrogênio na presença de íons de Fe^{2+} pode gerar o $\cdot OH$ através de reações de oxirredução corroborado pela primeira vez por Fenton em 1876. Esta reação clássica é conhecida como reação de Fenton, a qual é termodinamicamente favorecida e muito complexa de modo que o mecanismo de oxidação ainda permanece em debate, reações 1.1 e 1.2. Outra possibilidade de gerar $\cdot OH$ provém da mistura de H_2O_2 com o $O_2^{\bullet-}$, reação conhecida como Haber- Weiss, reação 1.3, (Halliwell e Gutteridge, 2007).



À produção das espécies reativas por diversas vias metabólicas e a sua alta reatividade podem promover lesões em biomoléculas, causando um distúrbio na homeostase redox, conhecido como “estresse oxidativo”. Deste modo, prejudicando o funcionamento celular “normal”. No entanto, para superar esse efeito os organismos contam com um sistema sofisticado de defesa celular, chamado de defesa antioxidante. Portanto, existe nas células um balanço entre a produção de EROs e os mecanismos de defesa antioxidante para manter sua concentração de EROs em níveis “controlados” e assim sendo o balanço redox, (Foyer, *et. al.*, 2005).

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que retarda, impede ou remove um dano oxidativo a uma molécula de destino, (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os quais estão divididos em duas classes: enzimáticos e não enzimáticos.

Antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutase é altamente eficiente na dismutação catalítica do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (McCord e Fridovich, 1969; Weisiger e Fridovich, 1973; Fridovich, 1995), reação 1.4; a catalase converte o peróxido de hidrogênio à água e a oxigênio molecular, reação 1.5 (Chance, 1979 ; Lardinois, 1995); glutathione peroxidases, reduz o H_2O_2 e outros peróxidos a H_2O e GSSG utilizando um substrato, a glutathione reduzida (GSH) (Chance, 1979 ; Brigelius-Flohé, 1999), reações 1.6 e 1.7, respectivamente.



As reações apresentadas acima equivalem a um panorama global das reações gerais, pois estas passam por intermediários formados por complexo enzimático de suas respectivas catálises.

Antioxidantes não enzimáticos são fundamentalmente compostos de baixa massa molar. Alguns são sintetizados *in vivo* e outros são obtidos através da dieta. Estes compostos são considerados importantes na defesa antioxidante.

Antioxidantes sintetizados *in vivo*: bilirrubina é o principal produto do metabolismo do grupo heme da hemoglobina e pode minimizar os efeitos de ONOOH, RO₂[•], RO[•] e O₂ (¹Δ_g) (Seril, *et. al.*, 2003), no entanto, a bilirrubina pode fotossensibilizar e gerar O₂ (¹Δ_g). O ácido úrico é produzido através da hipoxantina e xantina, e é um forte inibidor da propagação dos efeitos deletérios gerados pelo O₃ e NO₂[•], ele também pode proteger proteínas contra a nitração, (Robinson, *et. al.*, 2004).

Antioxidantes derivados da dieta: Ácido ascórbico (vitaminas C) (Padayatty, 2003; Nishikimi, 2003); α-tocoferol (vitamina E) (Diplock, 1985); fenóis (Manach e Donovan, 2004) e carotenoides. O licopeno é o carotenóide mais eficiente para desativação do O₂ (¹Δ_g). (Foote e Denny, 1968b; Burton e Ingold, 1986; Di Mascio *et. al.*, 1991; Sies e Stahl, 1995).

Quando uma espécie reativa é gerada *in vivo*, muitos antioxidantes estão presentes para minimizar os possíveis efeitos deletérios. Deste modo, sua relativa importância depende de: qual espécie reativa é gerada; como e onde é gerada, e qual alvo a lesão é medida (Halliwell e Gutteridge, 2007). Exemplo, quando os fluídos pulmonares são expostos ao O₃ ou NO₂[•], o ácido úrico age como um antioxidante, porém, essa ação protetora possui baixa atividade antioxidante contra

as lesões causadas nos constituintes do plasma sanguíneo gerada pelo HOCl (Robinson, K.M. 2004). Outra abordagem pode ser descrita quando o estresse oxidativo gerado é o mesmo, contudo o alvo avaliado é distinto, portanto gera respostas diferentes (Halliwell ; Gutteridge, 2007).

1.2 Oxigênio molecular singlete

Quimiluminescência corresponde ao processo de transformação de energia química em emissão de luz. Durante décadas esse fenômeno tem atraído o interesse de pesquisadores de diferentes áreas, como desenvolvimento e pesquisa em seus aspectos mecanísticos fundamentais e na diversidade de suas aplicações práticas (Adam *et. al.*, 2005). O conhecimento aprofundado dos sistemas quimiluminescentes abre caminhos para o entendimento das dificuldades relacionadas às reações químicas (Kazakov e Adam, 1993). Vários aspectos da química do $O_2 (^1\Delta_g)$ têm sido extensivamente estudados, especialmente nas últimas décadas, uma vez que detectores ultrasensíveis tornaram-se disponíveis. Desta forma houve uma expansão rápida dos estudos nas áreas de interesse biológico, químico, ambiental e medicinal (Packer, L. e Sies, H., 2000). Dentre as inúmeras reações quimiluminescentes conhecidas, a de particular interesse e objetivo deste estudo é derivada da emissão de luz do oxigênio molecular singlete.

O oxigênio molecular é um bi radical por apresentar dois elétrons desemparelhados em dois orbitais π^* antiligante de mesma energia (degenerados) de *spins* paralelos em sua camada eletrônica mais externa, sendo denominado como estado triplete ($^3\Sigma_g^-$). Portanto, esta característica o torna pouco reativo, dado

o fato dos dois elétrons desemparelhados apresentarem a mesma orientação de *spin*. Sendo a redução direta por dois elétrons de *spins* antiparalelos ser proibida pela regra de conservação de *spin*, o oxigênio molecular é relativamente inerte. Contudo sua configuração eletrônica pode ser alterada de modo a tornar a molécula altamente reativa, através da absorção de energia, a qual resulta na inversão do *spin* do elétron da camada eletrônica mais externa, removendo a restrição de conservação do *spin*. Desta forma, esse processo resulta em dois estados eletrônicos distintos, o $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$ que possuem energias de 22 kcal/mol e de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental, respectivamente, figura 1.2. A transição do estado $^1\Sigma_g^+$ possui um tempo de meia-vida curto retornando rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Enquanto que a transição $^1\Delta_g$ para $^1\Sigma_g^+$ possui um tempo de meia vida mais longo. Devido a essa característica o estado excitado $^1\Delta_g$ tem relevância em sistemas biológicos (Monroe, 1985; Gorman e Rodgers, 1989) e é tradicionalmente referido como oxigênio molecular singlete.

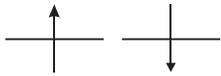
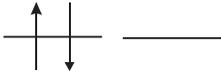
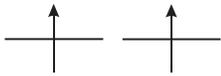
Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (μ s)
$^1\Sigma_g^+$		37,5	10^{-5}
$^1\Delta_g$		22,5	1
$^3\Sigma_g^-$			

Figura 1.2 - Distribuição eletrônica nos orbitais π^* do oxigênio molecular no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$).

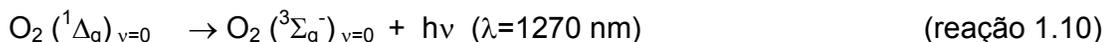
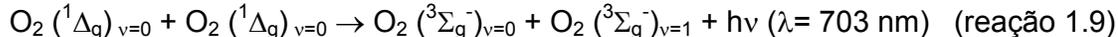
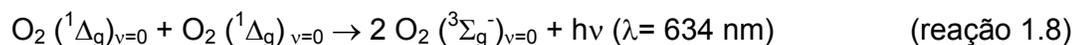
Como oxigênio molecular singlete é uma espécie eletronicamente excitada, ao decair ao estado fundamental pode ocorrer simultaneamente uma emissão luminescente extremamente fraca.

A história da quimiluminescência do $O_2(^1\Delta_g)$ foi amplamente descrita por Khan e Kasha (1963 e 1964). A investigação espectroscópica evidenciou uma luminescência na região vermelha do espectro que foi atribuída à presença de duas bandas de emissão de luz em 634 (reação 1.8) e 703 nm (reação 1.9) em um sistema constituído por H_2O_2/OCl^- . Ainda, Arnold e Ogryzlo (1964) registraram um espectro de emissão com duas bandas de emissão a partir de uma descarga elétrica de oxigênio molecular gasoso como Khan e Kasha demonstraram no sistema H_2O_2/OCl^- . Essa luminescência foi atribuída à colisão de duas moléculas de $O_2(^1\Delta_g)$ (emissão bimolecular) sendo a intensidade do sinal proporcional ao quadrado de sua concentração (Bader e Ogryzlo, 1964 e Kanofsky, 1989).

Khan e Kasha (1979) desenvolveram um sistema espectroscópico capaz de detectar espectros da emissão de luz monomolecular do $O_2(^1\Delta_g)$ diretamente da solução, reação 1.10, usando um detector termoeletricamente resfriado, uma fotomultiplicadora de sulfeto. Dois anos depois, um detector mais sensível foi desenvolvido baseado em um sistema de detecção de germânio, capaz de detectar a geração de $O_2(^1\Delta_g)$ em diversas reações (Khan, 1981). A intensidade dessa emissão é diretamente proporcional à concentração de $O_2(^1\Delta_g)$. Sendo assim, foi demonstrado que a intensidade da emissão de luz em 1270 nm é diretamente proporcional à quantidade de $O_2(^1\Delta_g)$ produzida durante a termólise do endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato de sódio, (NDPO₂) (Di Mascio *et al.*, 1989).

O $O_2 (^1\Delta_g)$ apresenta bandas de emissão intensa em 634, 703 e 1270 nm e, bandas de pouca intensidade em 580, 1070 e 1580 nm no sistema tradicional H_2O_2/OCl^- (Browne e Ogryzlo, 1964; Khan e Kasha, 1970).

A emissão monomolecular (1270 nm) é mais específica, enquanto a detecção da emissão bimolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ pode gerar artefato, devido a possíveis interferências de outra emissão de luz proveniente de outras espécies. Esse fato implica que outras reações relacionadas a espécies reativas emitam luz, incluindo a reação de Fenton e a termodecomposição de dioxetanos, a qual produz carbonilas excitadas que emitem luz ao retornar ao estado fundamental.



De modo geral, o decaimento do $O_2 (^1\Delta_g)$ ao estado fundamental produz dois tipos de emissão de luz: a emissão monomolecular em 1270 nm e a emissão bimolecular resultante da colisão de duas moléculas de $O_2 (^1\Delta_g)$, a qual possui duas bandas de emissão luz em 634 e 703 nm. O monitoramento da emissão monomolecular e bimolecular é realizado através de um contador de fótons equipado com uma fotomultiplicadora (acoplado ou não a um monocromador) capaz de detectar e amplificar o sinal (Deneke e Krinsky, 1977; Cadenas e Sies, 1984; Boveris *et. al.*, 1981).

1.2.2 Desativação do oxigênio molecular singlete

1.2.2.1 Tempo de vida do oxigênio molecular singlete

As primeiras evidências da redução do rendimento da taxa de oxigênio na fotossensibilização de um antraceno em dissulfeto de carbono foram alcançadas com a adição de uma pequena quantidade de hidrocarboneto no meio reacional (Bowen, 1953). Porém a explicação para esse fenômeno foi evidenciado quando observaram que a relação entre a constante de velocidade do decaimento do $O_2(^1\Delta_g)$ e a constante de velocidade na foto-oxidação do antraceno foi solvente dependente. Assim foi concluído que o $O_2(^1\Delta_g)$ possui um tempo de vida muito maior em dissulfeto de carbono do que em metanol e benzeno (Foote, 1972).

O $O_2(^1\Delta_g)$ pode alcançar seu maior tempo de vida em hidrocarbonetos e dissulfeto de carbono. Substituições sucessivas do halogênio por hidrogênio reduzem o tempo de vida, em cadeia alifática e aromática, e valores de 20 a 30 μs são alcançados. Em solventes como álcool e água, que contém o grupo hidroxila pode ser observado o menor tempo de vida (Frimer A. A, 1985).

Para compostos com átomos de maior massa molar (halogênios) há pouco ou nenhum efeito no tempo de vida da espécie excitada. Por exemplo, o iodobenzeno (27 μs) tem um tempo de vida menor do que o bromobenzeno (43 μs) e clorobenzeno (42- 43 μs) (Hurst J. R, *et. al.*, 1982).

Entretanto, o tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$ é significativamente maior quando o átomo de hidrogênio do solvente é trocado pelo deutério, o efeito isotópico foi observado pela primeira vez por Kearns que descobriu uma grande diferença no

efeito isotópico em água e em clorofórmio, mas não em acetona. No entanto recentemente alguns grupos têm reportado o efeito isotópico da acetona e de outros solventes. Um comparativo do tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$ em água e água deuterada é de 4 e 68 μs respectivamente (Ogilby e Foote, 1983; Gorman e Rodgers, 1989), tabela 1.2. O tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$ em fase gasosa é de 45 min (vácuo) (Monroe, 1985).

Tabela 1.2 – Efeito do solvente no tempo de vida $O_2(^1\Delta_g)$.

Solvente	Tempo de vida $O_2(^1\Delta_g)$ μs
Acetona- h_6	50
Acetona- d_6	723
Acetonitrila- h_3	62
Acetonitrila- d_3	554
Benzeno- h_6	26
Benzeno- d_6	550
Clorofórmio- h_1	264
Cloroformio- d_1	740
Metanol	10
H_2O	4
D_2O	68

Ogilby e Foote, 1983 - Gorman e Rodgers, 1989.

Diante das observações feitas por Bowen (1953) o efeito do solvente na eficácia da foto-oxidação foi deduzido envolvendo um átomo de hidrogênio a partir de uma ligação CH. Sendo assim ele propôs um mecanismo no qual havia a formação de um transiente radicalar a partir da abstração do hidrogênio do solvente

pelo complexo $O_2(^1\Delta_g)$ -antraceno. No entanto Mekel e Kearns (1972) sugeriram que a energia eletrônica do $O_2(^1\Delta_g)$ é transferida para os níveis de energia vibracional do solvente. Essa teoria foi evidenciada por uma relação empírica entre o tempo de vida medido e a absorção do solvente a 1270 nm. Uma vez que frequências das bandas do IR desses solventes são comuns nessa região devido às vibrações das ligações C-H e O-H, sendo importantes na relaxação do $O_2(^1\Delta_g)$. Desta forma explicaria os efeitos dos solventes deuterados no tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$.

Atualmente podemos utilizá-la como uma ferramenta versátil e poderosa para caracterização do $O_2(^1\Delta_g)$ em diferentes testes. Baseando-se na substituição do solvente pelo seu equivalente deuterado, pelo fato do tempo de vida do $O_2(^1\Delta_g)$ ser maior, devido à minimização da sua desativação através de colisões com moléculas de solventes (Kajiwara e Kearns 1973 e Ogilby P. R., 2010).

1.2.2.2 Desativação física e química do oxigênio molecular singlete

O oxigênio molecular singlete interage com outras moléculas fundamentalmente de duas formas: transferência de energia de excitação para as moléculas aceptoras ou por reação química com as moléculas.

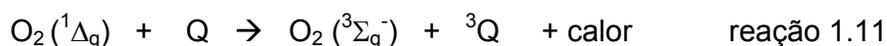
A desativação física envolve a transferência da energia de excitação eletrônica entre uma espécie excitada (doador) e uma espécie aceptor. A interação do oxigênio molecular singlete (doador) com supressor (aceptor) leva a sua desativação para o estado fundamental sem formar produto. Esse fenômeno pode ocorrer por transferência de energia e transferência de carga (Foote, 1979).

O uso da supressão física do $O_2 (^1\Delta_g)$ é uma ferramenta muito utilizada, sendo que a eficiência do supressor de $O_2 (^1\Delta_g)$ é muito variável em função do solvente ou da mistura de solventes utilizados (Li *et. al.*, 2001).

O mecanismo de transferência de energia foi demonstrado primeiramente por Foote e Denny (1968) em um sistema de fotossensibilização utilizando o β -caroteno e licopeno como supressor (Q) do $O_2 (^1\Delta_g)$, deste modo, concluíram que no sistema estudado houve uma menor geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ na presença do β -caroteno. Esse mecanismo envolve a formação do supressor no estado excitado triplete, o qual absorve energia do $O_2 (^1\Delta_g)$ e que subseqüentemente, decai para o estado triplete, estado fundamental. A eficiência do processo de transferência de energia está relacionada com a energia do estado triplete do supressor, a qual é necessário que seja próxima ou abaixo da energia do $O_2 (^1\Delta_g)$ de 22,5 kcal/mol (Foote *et. al.*, 1970a), reação 1.11. Uma supressão eficiente ocorre com moléculas que possuem mais de nove ligações conjugadas, isso é possível devido ao seu nível de energia do estado triplete. O licopeno mostrou ser o carotenóide mais eficiente na desativação do $O_2 (^1\Delta_g)$ (Di Mascio *et. al.*, 1989b e 1992).

Assim, carotenóides na dieta parecem participar na prevenção do estresse foto-oxidativo da pele. O estresse foto-oxidativo induzido pela radiação solar causa envelhecimento de pele, acelerando a geração de EROs através de ação fotodinâmica em que o $O_2 (^1\Delta_g)$ pode ser gerado pela transferência de energia de fotossensibilizadores endógenos no estado excitado. Um estudo *in vivo* com camundongos sem pêlo mostrou a formação de um produto específico da peroxidação do colesterol derivado do $O_2 (^1\Delta_g)$, 5α -OOH- 3β -hidroxi- 5α -colestano-6-ene-5-hidroperóxido de colesterol (5α -OOH), quando expostos à radiação

ultravioleta UVA. O acúmulo do derivado 5 α -OOH na formação de rugas e flacidez foi reduzido em ratos submetidos a uma dieta rica em carotenoides. Desta forma, os carotenóides, agindo como supressor de O₂ (¹ Δ_g) apresentaram uma desaceleração do foto-envelhecimento da pele induzido pela exposição à radiação UVA (Terao, 2010).



O mecanismo por transferência de carga ocorre pela interação do O₂ (¹ Δ_g) com compostos que possuem características doadoras de elétrons (compostos ricos em elétrons) para formar um complexo de transferência de carga, reação 1.12. Alguns compostos como aminas (com alto potencial de ionização) (Foote, 1982), azida, sulfetos e fenóis provavelmente desativem o O₂ (¹ Δ_g) por esse mecanismo. Ouannes e Wilson (1968) observaram o efeito da 1,4-diazobicyclo[2, 2,2]octano (DABCO) na reação de oxidação de alguns compostos conhecidos como aceptores de O₂ (¹ Δ_g) e que a oxidação lenta envolvia transferência de carga de O₂ (¹ Δ_g) para o DABCO. Entretanto Di Mascio e Sies (1988) demonstraram haver um aumento da luminescência da emissão bimolecular do O₂ (¹ Δ_g) utilizando o DABCO na termodecomposição do NDPO₂ e com o sistema hipoclorito com H₂O₂. A razão desse aumento foi sugerida pelo fato do DABCO influenciar na mudança da localização da concentração do O₂ (¹ Δ_g) permitindo a colisão de duas moléculas da espécie excitada, o mesmo efeito não foi observado para a emissão monomolecular (1270 nm), que houve metade do sinal suprimido. Portanto na presença de DABCO

em concentrações necessárias para suprimir 50% do $O_2 (^1\Delta_g)$, afetou drasticamente a emissão monomolecular.



A desativação química ocorre quando o $O_2 (^1\Delta_g)$ reage com uma molécula para gerar um produto oxidado resultante, ou seja, ele é consumido na reação. Deste modo, compostos que contêm ligação dupla carbono-carbono com um hidrogênio alílico, composto com duplas conjugadas, aqueles que contêm duas ligações duplas separadas por uma ligação sigma e se houver um átomo doador de elétrons como N e S adjacente à dupla ligação pode gerar um dioxetano. As reações químicas serão apresentadas no próximo item detalhadamente.

Em células, o tempo de vida $O_2 (^1\Delta_g)$ depende da distância de difusão e, do compartimento celular. Assim, apesar de uma vida intracelular relativamente longa o $O_2 (^1\Delta_g)$ não possui uma distância significativa na difusão do seu local de formação. Isso pode ser atribuído à viscosidade intracelular (Kuimova, *et. al.*, 2009).

1.2.3 Tipos de reações do oxigênio molecular singlete

As reações do $O_2 (^1\Delta_g)$ com compostos insaturados podem ser organizadas em três tipos de reações; tipo *ene*, que tem como produto hidroperóxidos; reações de cicloadição $[2\pi+2\pi]$, resultando em 1,2-dioxetanos e reações de cicloadição $[4\pi+2\pi]$, resultando na formação de endoperóxidos (figura 1.3).

I) *Reação do tipo “ene”*

Alcenos que possuem hidrogênios alílicos são oxidados aos correspondentes hidroperóxidos alílico no processo de foto-oxidação por duas vias distintas, são elas por processo radicalar em cadeia e pela reação com o $O_2 (^1\Delta_g)$. A última se dá pela reação do tipo “ene” gerando hidroperóxidos como produtos finais. A reação é estereoespecífica e ocorre a abstração do hidrogênio alílico perpendicular ao alceno na conformação molecular de mais baixa energia ($< 20 \text{ KJ mol}^{-1}$). O ataque do $O_2 (^1\Delta_g)$ é suprafacial, pela mesma face, com deslocamento da dupla ligação, essa rota é consistente com a via concertada. (Gollnick e Kuhn, 1979; Stratakis e Orfanopoulos, 2000).

II) *Cicloadição $[2\pi + 2\pi]$*

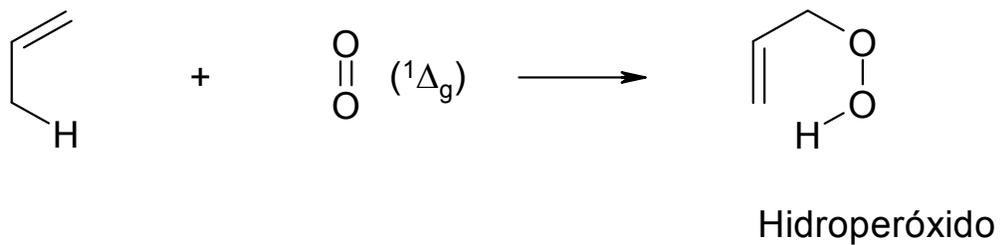
Alcenos com alta densidade eletrônica com substituintes de átomos doadores de elétrons como N e S, com baixos potenciais de ionização que não possuem o hidrogênio alílico reagem com o $O_2 (^1\Delta_g)$ pela reação de cicloadição $[2\pi+2\pi]$ formando dioxetanos de forma estereoespecífica. Uma vez que os dioxetanos são instáveis e sua decomposição envolve um intermediário birradical, o qual gera duas carbonilas, sendo uma delas no estado triplete (n, π^*) que podem ser acompanhados pela emissão de luz na região visível do espectro (Bartlett e Landis, 1979), os dioxetanos são uma das classes de compostos envolvidos na bioluminescência.

III) *Cicloadição* [$4\pi + 2\pi$]

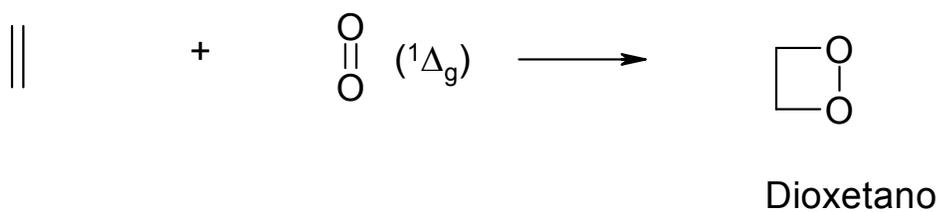
Oxigênio molecular singlete reage rapidamente com compostos que possuem ligações duplas conjugadas através da cicloadição $4\pi + 2\pi$ conhecida como tipo Diels-Alder gerando endoperóxidos (Aubry *et. al.*, 2003). A primeira evidência relativa ao efeito de substituintes e solventes na formação do endoperóxido foi resumida por Denny e Nickon, 1973. O efeito do substituinte na reatividade pode ser alcançado com substituintes doadores de elétrons, exemplo, a introdução de um grupo metila nas posições 2 e 3 do furano levam a um aumento da constante de velocidade em 5 vezes na adição do $O_2 (^1\Delta_g)$ em metanol (Denny e Nickon, 1973).

Diferentemente do oxigênio molecular triplete, o qual possui um caráter birradical, os elétrons da camada de valência do $O_2 (^1\Delta_g)$ estão pareados. Desta forma o $O_2 (^1\Delta_g)$ é uma espécie altamente eletrofílica, a qual reage com compostos com insaturações, ou átomos com alta densidade eletrônica.

I



II



III

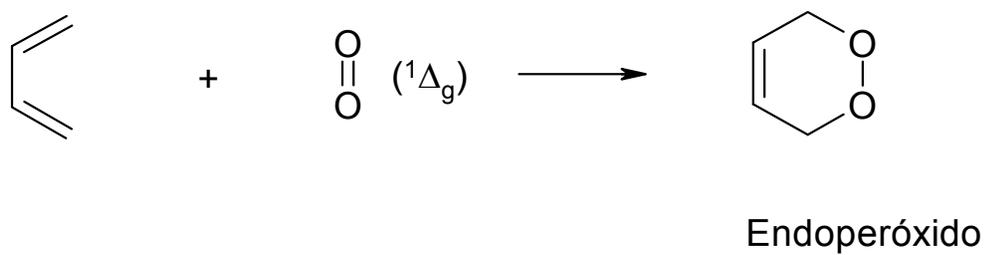
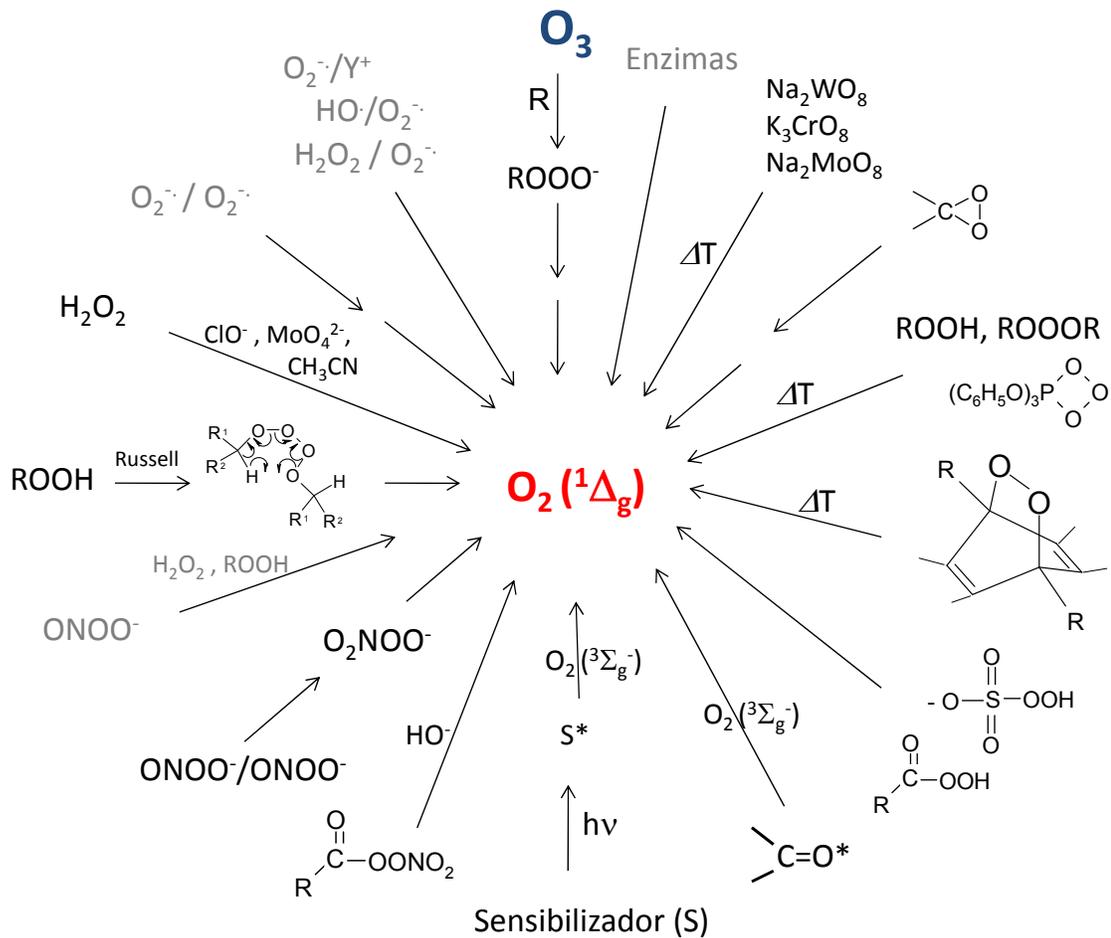


Figura 1.3 - Reação do oxigênio molecular singlete, (I) Reação do tipo ene, (II) Reação do tipo $[2\pi+2\pi]$ e (III) Reação do tipo $[4\pi+2\pi]$.

1.2.4 Fontes químicas de oxigênio molecular singlete

O esquema abaixo apresenta uma visão geral dos mecanismos clássicos de geração de $O_2(^1\Delta_g)$.



1.2.4.1 Fotossensibilização

Um método clássico de gerar $O_2 (^1\Delta_g)$ é a utilização de processos fotodinâmica envolvendo luz, corante e dióxigênio. Um importante mecanismo responsável pela transferência de energia do estado eletrônico excitado para um aceptor em seu estado fundamental de menor energia é referido como fotossensibilização, um processo bimolecular.

O oxigênio singlete molecular é simples e usualmente gerado pela transferência de energia do estado triplete excitado de um fotossensibilizador para o oxigênio molecular no estado fundamental, triplete. Fotossensibilizadores eficientes absorvem luz em um intervalo de 380 a 900 nm e apresentam fluorescência e fosforescência.

Este processo acontece fundamentalmente quando o fotossensibilizador é irradiado por um comprimento de onda de absorção máxima, ocorrendo à excitação eletrônica ao estado singlete ($^1sens^*$). Geralmente este estado eletronicamente excitado possui um tempo de vida curto e, é convertido rapidamente para o estado fundamental emitindo fluorescência ou decair para o estado excitado triplete ($^3sens^*$), através de um cruzamento intersistemas (ICS), o qual possui um tempo de vida maior. Desta forma, os sensibilizadores mais eficientes são aqueles que possuem um $^3sens^*$ de longa duração e alto rendimento quântico. Entre os sensibilizadores mais utilizados estão o azul de metileno, rosa bengala, cristal violeta, coenzimas e pigmentos como derivados de porfirina que apresentam bandas de absorção de luz na região do visível, tabela 1.3, (Kochevar *et. al.*, 2000).

Tabela 1.3 – Parâmetros fotofísicos de alguns fotossensibilizadores.

Fotossensibilizador	Faixa de absorção (nm)	Rendimento quântico de O ₂ (¹ Δ _g).	Solvente
Rosa bengala	450-580	0,76	Água, metanol
Azul de metileno	550-700	0,56	Água, metanol
Fenalenona	< 400	0,95	Orgânicos

(Kochevar *et. al.*, 2000).

Existem dois mecanismos possíveis para gerar o sensibilizador no estado excitado triplete. (Foote, 1986 ; Gollnick, 1968). O mecanismo tipo I envolve a produção de radicais livres ou íons radicais pela interação do sensibilizador no estado excitado triplete com o substrato reduzido por transferência de elétrons ou de prótons que também podem reagir com O₂ (³Σ_g⁻) resultando em produtos oxidados. No mecanismo do tipo II ocorre a transferência de energia do sensibilizador no estado excitado triplete para o O₂ (³Σ_g⁻), gerando O₂ (¹Δ_g). Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente e, deste modo, o fator que determina qual mecanismo prevalecerá é a competição entre o substrato e o oxigênio no estado fundamental pelo fotossensibilizador, figura 1.4. Assim o processo é dependente da concentração de dióxigênio molecular no estado fundamental, considerando que O₂ (³Σ_g⁻) é bem menos solúvel em água (200 μM) do que em solventes orgânicos (9 - 12 mM). A estrutura química do fotossensibilizador e do substrato também influencia na competição (Foote *et. al.*, 1982). O efeito do solvente também é relevante na eficiência do mecanismo do tipo II, uma vez que a natureza do solvente influencia no tempo de vida do O₂ (¹Δ_g), assim existindo a competição entre a sua desativação química e física (Merkel e Kearns, 1972).

Normalmente os fotossensibilizadores com a função carbonila, como cetona e quinonas que possuem o estado triplete n, π^* são eficazes na abstração de hidrogênio dos substratos orgânicos. Fotossensibilizadores que possuem a natureza π, π^* como a fluoresceína, fenotiazina e compostos poliaromáticos reagem com mais frequência pelo mecanismo tipo II, $O_2 (^1\Delta_g)$.

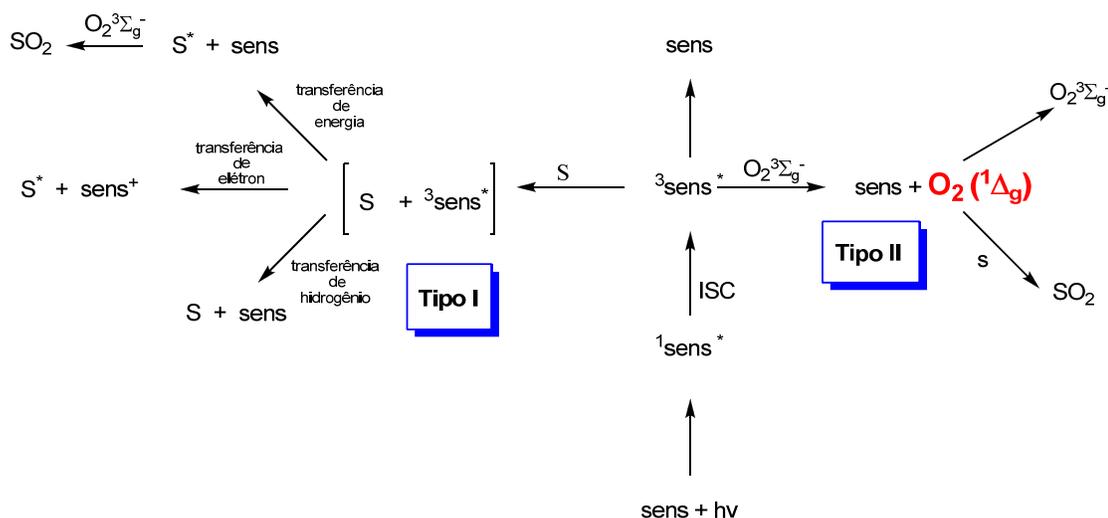


Figura 1.4 – Esquema de fotossensibilização mostrando os mecanismos tipo I e II.

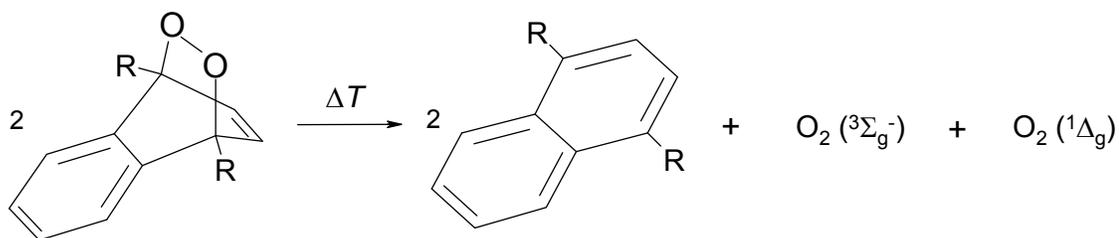
(S = Reagente), ISC = cruzamento intersistema, sens = sensibilizador).

1.2.4.2 Endoperóxido de naftaleno

Os endoperóxidos de aromático policíclicos são fontes conhecidas de $O_2 (^1\Delta_g)$. O processo ocorre pela sua termólise resultando em quantidades estequiométricas de $O_2 (^1\Delta_g)$, $O_2 (^3\Sigma_g^-)$ e o composto aromático correspondente (Turro, 1981), portanto os endoperóxidos são quimicamente inertes e podem ser utilizados em sistema biológicos.

Estudos da reatividade química do endoperóxido mostrou que os peróxidos transanulares geram uma grande quantidade de oxigênio molecular no estado eletronicamente excitado. O mecanismo de fragmentação do endoperóxido a oxigênio molecular e ao aromático correspondente foi observado por Wilson (1969) e Turro (1981). A fragmentação pode ocorrer por dois mecanismos: (i) mecanismo dirradical, envolvendo a clivagem homolítica da ligação C-O seguido pela perda de O₂, ambos podem ser formados O₂ (¹Δ_g) e O₂ (³Σ_g⁻) e (ii) mecanismo envolvendo a clivagem concertada de ambos os C-O. (Concertado: Um termo que descreve um processo químico no qual as ligações que se quebram e se formam ocorre simultaneamente).

Alguns exemplos destes geradores são o endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO₂), 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio e o endoperóxido não iônico do N,N'-di(dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (Pierlot *et. al.*, 1996), figura 1.5.



Endoperóxido de naftaleno		R = Derivado de naftaleno	
*	DMNO ₂	—CH ₃	DMN
**	DPHNO ₂		DHPN
**	NDPO ₂		NDP

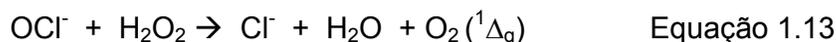
Figura 1.5 - Endoperóxidos de naftaleno gerador de O₂(¹Δ_g), durante o aquecimento se decompõe gerando o oxigênio molecular no estado excitado – mecanismo geral – Substituintes (R) na posição 1.4 do naftaleno e seus respectivos nomes e abreviações. * hidrofóbico; ** hidrofílico.

1.2.4.3 Peróxido de hidrogênio

A reação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) com hipoclorito (OCl⁻), é de grande impacto na quimiluminescência do O₂(¹Δ_g), reação 1.13. Desde a sua descoberta, essa reação é estudada em detalhes e é muito utilizada como um sistema modelo de geração apropriada de O₂(¹Δ_g) de forma eficiente (Kajiwara, 1979 ; Foote 1968). Com a utilização da marcação isotópica nos dois átomos de oxigênio,¹⁸O, foi demonstrado que o O₂(¹Δ_g) foi originado do peróxido e não do hipoclorito (Aubry, 1988).

O desproporcionamento do H_2O_2 catalisado pelo íon molibdato (MoO_4^{2-}) só ocorre em solução alcalina, sendo que a espécie mononuclear diperoxo (MoO_6^{2-}) é a responsável pela geração de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ e a regeneração do MoO_4^{2-} (Aubry *et. al.*, 1989).

A interação do íon radical superóxido com peróxido hidrogênio tanto em tetracloreto de carbono como em acetonitrila mostrou ser quimiluminescente na emissão monomolecular, (Khan, A. U. Kasha, 1994). Três etapas foram propostas para explicar a luminescência do $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$: A reação de Haber-Weiss, a transferência de elétrons entre o radical hidroxila e o íon radical superóxido, e a dismutação do íon radical superóxido.



1.2.4.4 Dioxetanos

A quimiluminescência fraca tem sido associada com peroxidação lipídica. A luminescência foi atribuída a dois fenômenos (i) a combinação do radical peroxila ou alcóxila e (ii) a termodecomposição do dioxetano. Em ambos os casos a luminescência foi atribuída as carbonilas eletronicamente excitadas, as quais em seu estado triplete quando decaem para o estado fundamental fosforecem entre 380 - 450 nm, e $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ (Cilento, 1982 ; Cadenas, 1984 ; Murphy e Sies, 1990).

Historicamente importante, a termólise do dioxetano mostrou a formação do oxigênio molecular no estado eletronicamente excitado. Essa possibilidade sugeria que $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ pode ser produzido pela transferência de energia a partir de carbonila

excitada no estado triplete, o último formado na decomposição de peróxidos orgânicos (Bowen, E. J., 1964). Posteriormente, tal processo de transferência de energia foi atribuído uma a série de reações quimiluminescentes, por exemplo, na recombinação de radicais peroxila, e a decomposição de trióxido.

1.2.4.5 Trióxido

Os trióxido são compostos com sequência de átomos de oxigênio O-O-O. A química envolvida nestes compostos tem sido um assunto de considerável interesse durante as últimas décadas. A hipótese que os hidrotrióxidos sejam intermediários formados na ozonização de certos compostos orgânicos. Os quais foram descritos pela primeira vez de forma independente por Price e Tumolo (1964) e White e Bailey (1965) para interpretar os resultados obtidos nos estudos das reações de ozônio com éteres e aldeídos aromáticos.

A família dos trióxidos compreende por: trióxido de hidrogênio HOOOH; hidrotrióxido orgânico; trióxido de dialquil e diaril; ozonídeos primário (1,2,3-trióxidolanes) ; ozonídeos transanular e ozonídeos derivado de fosfito (Bailey, 1978 ; Plesnicar, 1983 e 1992).

A decomposição térmica dos trióxidos é acompanhada de luminescência a partir da quebra da ligação RO-OO, a qual foi monitorada pelo decaimento no infravermelho próximo e no visível, (Adam *et. al.*, 2005).

A quimiluminescência (QL) nas regiões visíveis e infravermelhas da decomposição dos trióxidos é um fenômeno bem conhecido. A QL no infravermelho deriva do relaxamento da radiação O₂ (¹Δ_g), a qual é gerada diretamente da

decomposição do ROOOH ou a partir da dismutação dos radicais peroxila (ROO[•]). O último processo também emite luz na região visível do espectro, (Avzyanova E. V. *et. al.*, 1999). Essa emissão provém do O₂ (¹Δ_g) e das carbonilas excitadas no estado triplete pela combinação dos radicais peroxila.

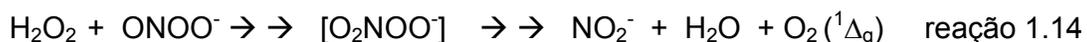
O mecanismo da ozonização do benzaldeído formando o hidrotrióxido correspondente envolve a inserção 1,3-dipolar do ozônio na ligação CH, consistindo em uma reação exotérmica, porém, este intermediário pode se decompor via um segundo mecanismo exotérmico concertado para formar ácido benzóico e O₂ (¹Δ_g). Outra teoria sobre a possibilidade mecanística do benzaldeído envolve um diferente intermediário, um tetróxido cíclico formado como um produto primário na cicloadição 1,3-dipolar do ozônio ao grupo carbonila do aldeído (Cerkovnik, 2008).

1.2.4.6 Ozônio

A quimiluminescência derivada das reações de ozônio é bem conhecida por mais de cem anos (Toby, 1984), mas somente nas últimas décadas foi apontado que O₂ (¹Δ_g) é a espécie emissora da luminescência resultante das reações do ozônio com vários substratos, como: aminas, compostos sulfurados, fenóis, cisteína, metionina, albumina, ácido úrico, ácido ascórbico, DNA, bases nitrogenadas, glutatona reduzida, NADPH e ânions nucleofílicos (NO₂⁻, N₃⁻, Br⁻, I⁻, CN⁻) (Kafnosfsky *et. al.*, 1991 e 1993). O mecanismo sugerido para essa via de reação do ozônio é fundamentado na transferência de um átomo de oxigênio para o substrato e consequentemente geração de O₂ (¹Δ_g) por meio de um intermediário trióxido. Esse tópico será abordado em maiores detalhes nos próximos itens.

1.2.4.7 Peroxinitrito

Como exemplos de geração química de $O_2 (^1\Delta_g)$ podem ser citados as reações de peróxido de hidrogênio com peroxinitrito ($ONOO^-$), decomposição do oxoperoxinitrato (O_2NOO^-), (Miyamoto *et. al.*, 2009) equação 1.14.



1.2.5 Captadores químicos

Captadores químicos são apropriadamente utilizados para detectar e quantificar a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ em um sistema. O termo endoperóxido surgiu em 1944 (Schenck G.O.), o qual foi usado para descrever a formação de um peróxido cíclico obtido da fotossensibilização do 1,3-ciclohexadieno, a clorofila foi utilizada como fotossensibilizador. Essa foi a primeira síntese do ascaridol.

Essa técnica é sensível, porém a eficácia de um captador químico depende principalmente da sua reatividade, especificidade com $O_2 (^1\Delta_g)$ e a sua solubilidade no solvente de interesse. A reatividade de uma substância como o $O_2 (^1\Delta_g)$ pode ser expressa por seu valor β , que indica 50% da concentração de $O_2 (^1\Delta_g)$ disponível que será captada (McCall, 1984). Algumas classes de captadores químicos são utilizadas para a detecção da formação de $O_2 (^1\Delta_g)$, como por exemplo, furanos, colesterol, ácidos graxos, derivados indólicos e derivados de antraceno.

Os compostos derivados de furano foram um dos primeiros captadores utilizados, os quais apresentam alta reatividade nas reações com $O_2 (^1\Delta_g)$, no

entanto os endoperóxidos inicialmente gerados são normalmente instáveis e somente a baixa temperatura eles podem ser isolados e caracterizados em solução por espectroscopia (Schenck, 1949). De forma que foi possível isolar 20 % do endoperóxido de furano correspondente em solvente orgânico, porém a -10°C podem ser explosivos.

De tal modo, Graziano e colaboradores, (1980, 1981, 1982) demonstraram que os endoperóxidos de furano podem ser mais estáveis quando substituintes que possuem a propriedade de deslocar a nuvem eletrônica em sua direção estão ligados à dupla ligação.

Desta forma, os furanos reagem com $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ gerando compostos dicarbonílicos via reação Diels-Alder formando um ozonida como intermediário (figura 1.6) (Foote *et. al.*, 1984; Kreitner *et. al.*, 1996). Entretanto estes endoperóxidos derivado de furano não se mostraram específicos para o $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, já que podem formar dioxetanos na presença de outras espécies oxidantes (Foote *et. al.*, 1984; McCall, 1984).

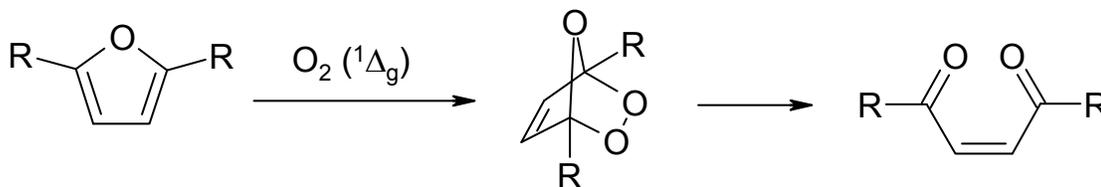


Figura 1.6 - Reação de um derivado de furano com $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, formando um ozonida como intermediário. R é um substituinte.

O derivado de antraceno, o sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil} éster de sódio (EAS), reage com $O_2 (^1\Delta_g)$ para formar o endoperóxido correspondente (EASO₂) (Figura 1.7). Sua solubilidade independe do pH e a reatividade é maior que o valor β para todos os valores de pH. Ademais possui alta estabilidade (até 120°C) e pode ser facilmente detectado por HPLC e por espectrometria se massas (McCall, 1984 ; Di Mascio e Sies, 1989).

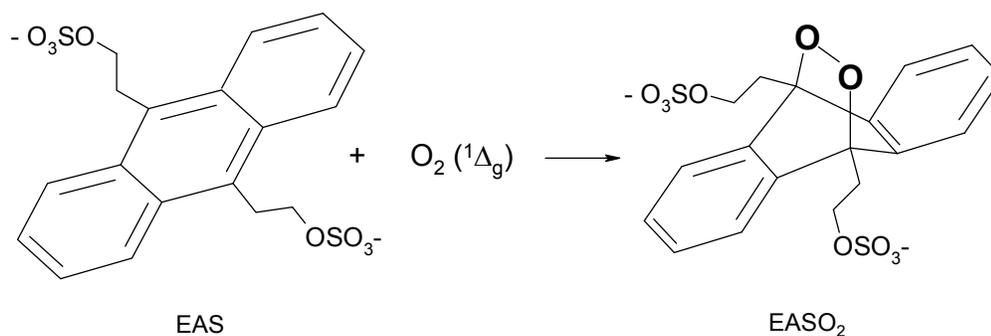


Figura 1.7 - Reação de um derivado de antraceno EAS com $O_2 (^1\Delta_g)$ gerando o respectivo endoperóxido EASO₂.

1.3 Geração de oxigênio molecular singlete em sistema biológico.

A formação do $O_2 (^1\Delta_g)$ foi proposta em sistemas biológicos pela foto-oxidação de uma variedade de compostos biológicos, xenobióticos, peroxidação lipídica e também por reações enzimáticas.

Em detrimento dos efeitos deletérios causados em biomoléculas o $O_2 (^1\Delta_g)$ vem sendo utilizado para o combate de tumores através da terapia fotodinâmica

(PDT). Atualmente a PDT está sendo usada para tratar algumas formas de: câncer, tumores, micoses, melanomas, carcinomas e na inativação de bactérias, fungos e vírus. O tratamento consiste na utilização de fotossensibilizadores, os mesmos devem possuir características especiais, tais como: alta absorção ótica na região espectral 500 a 600 nm (janela terapêutica), onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes; ser foto-ativo (ter a capacidade de induzir a foto-reação que destroem as células doentes); ser foto-estáveis; não possuir toxicidade no seu estado fundamental (não excitado). Esta terapia resulta em uma sequência de processos fotodinâmicos e fotoquímicos envolvendo oxigênio molecular cujos produtos de oxidação levam à sua destruição (Bonnett, 1995; Sharman *et. al.*, 2000).

Porfirias são doenças relacionadas à deficiência de certas enzimas participantes do processo de síntese do grupo heme, que resultam na produção excessiva das porfirinas, que por sua vez, a exposição à luz do sol há a geram O_2 ($^1\Delta_g$) proveniente da fotossensibilização. Vários sintomas dessa doença podem estar associados aos comportamentos estranhos atribuídos ao famoso Conde Drácula (Onuky *et. al.*, 2002).

Atualmente, são conhecidas diversas reações enzimáticas capazes de gerar O_2 ($^1\Delta_g$) como as peroxidases, tais como lactoperoxidase, mieloperoxidase e cloroperoxidase (Kanofsky, 1983, 1984 e 1985, 1989). A quimiluminescência monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) foi detectada em 1270 nm e, comparou-se a mudança da intensidade de emissão trocando o solvente pelo respectivo deuterado (H_2O para óxido de deutério). A obtenção de um espectro na faixa de 1100 a 1500 nm, evidenciou de forma inequívoca a presença de O_2 ($^1\Delta_g$). Ademais, a utilização de um supressor físico denotou uma diminuição da fração da intensidade de emissão (Kanofsky J., 2000).

A peroxidação lipídica pode ser gerada pela auto-oxidação (processo radicalar) ou pela reação com o $O_2 (^1\Delta_g)$. Este processo é considerado um evento chave importante na química do estresse oxidativo associado a diversas patologias, (Esterbauer, 1992). Os hidroperóxidos de lipídeos são os produtos primários da peroxidação lipídica, e supõe-se que a sua decomposição está envolvida na geração de produtos tóxicos e na indução de lesões em tecidos (Girotti, 1998 e Esterbauer, 1993). Apesar da sua relativa estabilidade em soluções orgânicas, hidroperóxidos de lipídeos são facilmente decompostos por íons metálicos, gerando radicais peroxila e ou radicais alcóxila, que são responsáveis na propagação da peroxidação lipídica e na formação de compostos tóxicos.

A formação de $O_2 (^1\Delta_g)$ na lipoperoxidação ocorre principalmente por meio do mecanismo proposto por Russell, no qual radicais peroxila interagem entre si, gerando um tetraóxido intermediário linear que se decompõe via um mecanismo cíclico, gerando como produtos um álcool, uma cetona e $O_2 (^1\Delta_g)$, figura 1.8. Esta reação pode gerar tanto oxigênio eletronicamente excitado ou cetona no estado excitado.

Hidroperóxidos de lipídeos envolvendo o mecanismo proposto por Russell foi demonstrado por Miyamoto (2003) utilizando hidroperóxidos de ácido linoleico isotopicamente marcado com oxigênio (^{18}O) na presença de metais, ferro e cério. A evidência da geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ foi demonstrada por quimiluminescência tanto na região vermelha do espectro (decaimento bimolecular) e no infravermelho (decaimento monomolecular) e por captação química caracterizada por espectrometria de massas.

Recentemente foi demonstrado que os hidroperóxidos de timidina no DNA reagem com íons metálicos ou HOCl gerando $O_2 (^1\Delta_g)$. Essa evidência foi constatada

empregando medidas espectroscópicas da emissão da região vermelha do espectro e na região do infravermelho próximo. Observou-se também o aumento da intensidade da emissão e o efeito da supressão física do $O_2(^1\Delta_g)$ utilizando D_2O e NaN_3 , respectivamente. Além disso, a presença da espécie emissora foi demonstrada inequivocamente pela caracterização do espectro de emissão do infravermelho próximo. Ademais, utilizando um captador químico derivado de antraceno foi constatada a formação do endoperóxido correspondente. Baseado na compreensão destas evidências o mecanismo de Russell foi proposto na decomposição de hidroperóxidos de timidina em radicais peroxilas, aos quais se combinam para gerar $O_2(^1\Delta_g)$, álcool e cetona, (Prado *et. al.*, 2009).

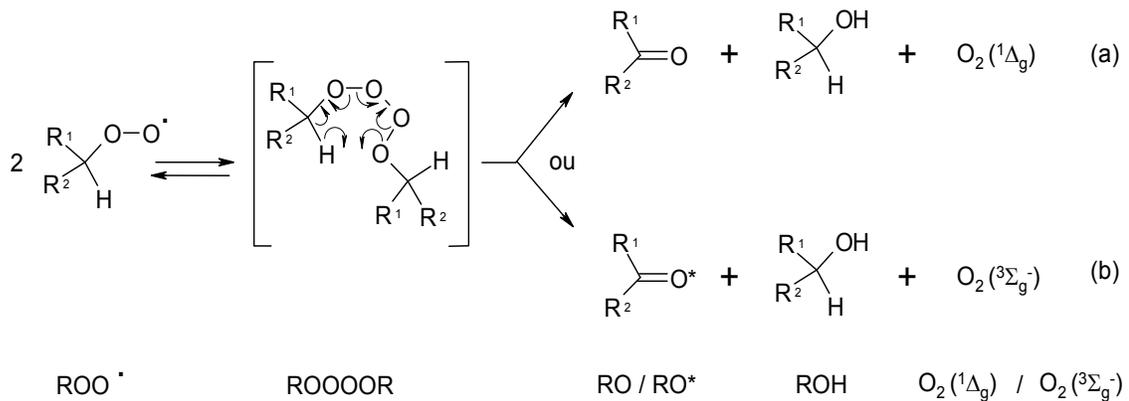


Figura - 1.8 - Mecanismo de Russell: formação do intermediário tetraóxido que se decompõe gerando um álcool, cetona e oxigênio molecular, sendo que a cetona ou a molécula de oxigênio podem estar na forma eletronicamente excitada.

A explosão "burst" respiratório é uma característica de neutrófilos e de macrófagos, os quais são essenciais para a defesa celular contra a invasão de microrganismos. Sua função é a morte de bactérias e fungos, em parte, pelo

desencadeamento de um estresse oxidativo, que é composto por um conjunto de reações enzimáticas e químicas, levando à formação de espécies reativas (Babior, 2000).

O primeiro evento na cascata consiste na redução do oxigênio molecular, iniciada pela enzima NADPH oxidase, a qual produz o $O_2^{\cdot-}$. Embora este seja pouco reativo, sua função parece originar uma série de espécies reativas mais potentes. A partir da dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ gera o H_2O_2 , que por sua vez é precursor de outras espécies reativas, como, sua conversão ao radical hidroxila via reação de Fenton. Ainda, origina ácido hipocloroso (HOCl) através da oxidação do íon cloreto catalisado pela mieloperoxidase, que também é utilizada para formar cloroaminas, (Babior, 2003). Dado que as concentrações H_2O_2 e HOCl estão presentes no interior do fagossomo, existe a possibilidade da formação $O_2 (^1\Delta_g)$ (Krinsky, 1974; Rosen e Klebanoff, 1979) figura 1.9. Da mesma forma, para determinar se o $O_2 (^1\Delta_g)$ é produzido por neutrófilos durante o processo de fagocitose bolinhas de vidro foram revestidas com um captador químico, 9,10-difenilantraceno, DPA, gerando o endoperóxido correspondente, DPAO₂. A termólise do DPAO₂ foi medida pelo decréscimo da absorbância do DPA ($\lambda = 355$ nm) por espectroscopia ultravioleta-visível. Os resultados indicaram que a mieloperoxidase tem um papel fundamental, pois, a geração de HOCl na presença de H_2O_2 levou à formação de $O_2 (^1\Delta_g)$ (Steinbeck *et. al.*, 1992).

Estudos de luminescência confirmaram a formação de $O_2 (^1\Delta_g)$ através de medidas diretas de emissão de luz no infravermelho (Khan, 1984). Posteriormente, reforçando a importância biológica desta via durante a fagocitose, Kiryu (1999) demonstrou a produção de $O_2 (^1\Delta_g)$ através da detecção da emissão de luz em 1270 nm, utilizando concentrações fisiológicas de MPO/ H_2O_2 /Cl⁻.

Ainda há evidências da geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ na reação de ozônio com biomoléculas (Kanofsky e Sima, 1991), que será discutida posteriormente.

Recentemente propõe-se que os anticorpos possam catalisar a geração de oxidantes na defesa celular, incluindo o hidróxido-hidrotrióxido (H_2O_3) e O_3 provenientes da reação do $O_2 (^1\Delta_g)$ e H_2O . A abordagem experimental consistiu na utilização de uma sonda sensível, porém não seletiva. Este fato foi apontado para as espécies $O_2 (^1\Delta_g)$, HOCl, H_2O_3 e O_3 , entretanto não para o H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. Essa evidência é baseada na descoloração do índigo carmim, deste modo, a sonda foi analisada por espectroscopia do UV-Visível ($\lambda = 610 \text{ nm}$) e o produto correspondente foi analisado por HPLC (Babior, 2003). Um estudo adequado da formação de ozônio em sistemas biológicos é difícil, porém uma assinatura da química do O_3 foi demonstrada com abordagens experimentais envolvendo a clivagem da dupla ligação da sonda juntamente com a participação da água isotopicamente marcada no átomo de oxigênio-18. Dentre as espécies reativas geradas pelos neutrófilos somente o O_3 possui essa característica (Lerner, 2003).

A especificidade, e, sobretudo a reatividade do ozônio com o índigo carmim para gerar como produto o ácido isatino sulfônico foi questionado como uma inequívoca evidência de produção de ozônio por neutrófilos. Deste modo, a reação da xantina oxidase realizada na presença de $H_2^{18}O$ mostrou que a proporção de átomos de ^{18}O incorporada no ácido isatino sulfônico foi à mesma que a encontrada para o ozônio. Assim, as reações de ozônio e de $O_2^{\cdot-}$ com índigo carmim são indistinguíveis com relação à formação do ácido isatino sulfônico (Kettle A. J, *et. a./*, 2004).

Babior (2003) evidenciou novamente a formação de ozônio em meio biológico em placas arteroscleróticas através da identificação do produto 3 β -hidroxi-5-oxo-

5,6secocolestano-5-al (CSec) proveniente da reação do colesterol com O_3 . Anteriormente foi apontado *in vivo* o CSec como produto específico do ozônio e a sua presença em sistema biológico foi detectado através da exposição de ratos ao O_3 (Pryor *et. al.*, 1992). Contudo inequivocamente foi demonstrado por espectroscopia de RMN, massas e quimiluminescência a presença do produto CSec proveniente da reação do O_2 ($^1\Delta_g$) com o colesterol, além dos hidroperóxidos de colesterol (Uemi *et. al.*, 2009).

A geração endógena do O_3 ainda existe controvérsias e é complexa. Existem questões ainda para serem abordadas perante a complexidade da química do ozônio.

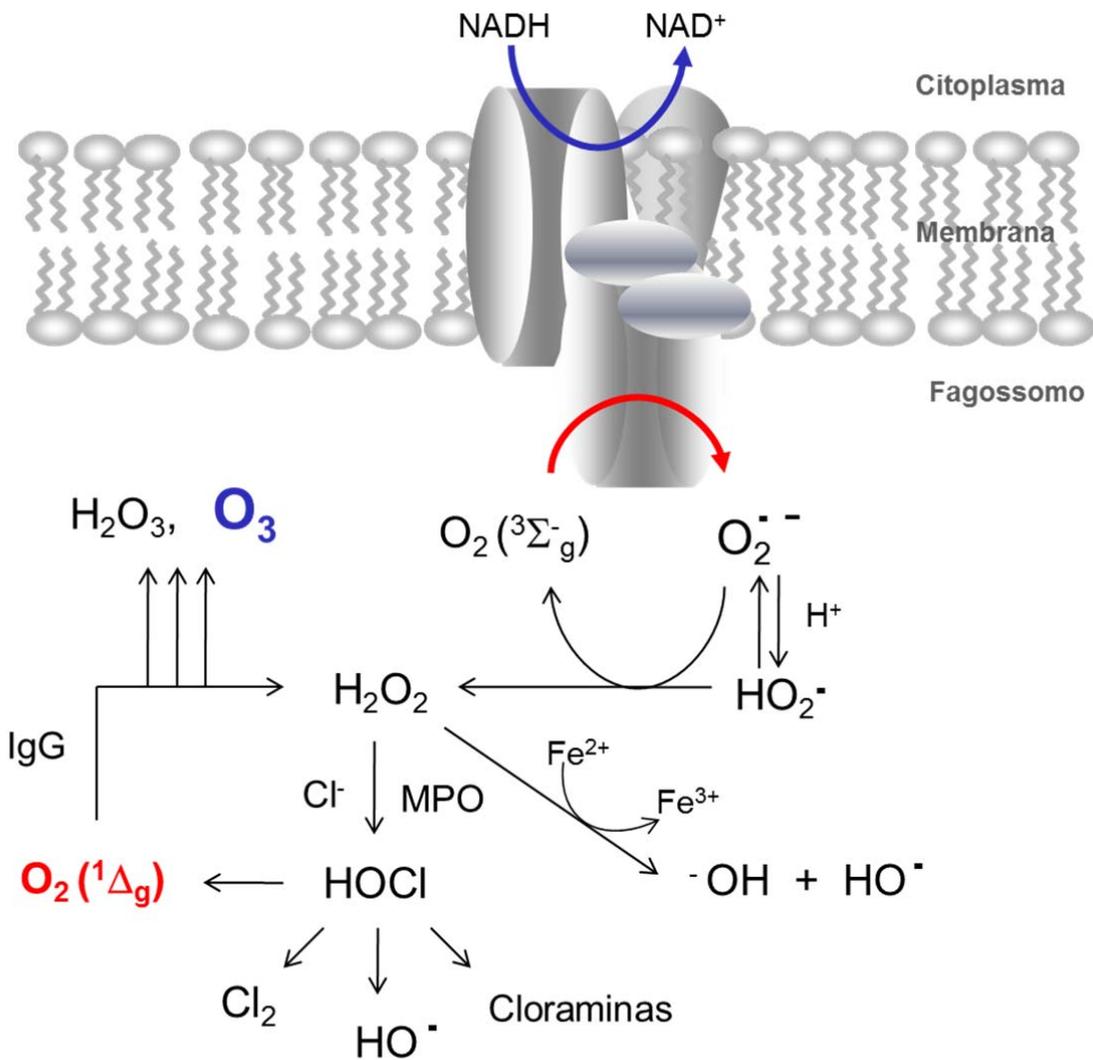


Figura 1.9 - Esquema da cascata de geração das espécies reativas de oxigênio em neutrófilos essenciais na defesa celular. Adaptado Babior (2003).

1.4 Reações do oxigênio molecular singlete com DNA

O DNA está sujeito a inúmeras alterações de natureza química e física resultantes de fontes endógenas e exógenas. Embora a ligação fosfodiéster do DNA seja bastante estável em virtude da ausência do grupo hidroxila do carbono 2 da 2-desoxirribose, isto lhe confere uma estabilidade na ligação *N*-glicosídica. A ligação química da base com açúcar é menos suscetível a hidrólise nos ribonucleotídeos do que nos desoxirribonucleotídeos. A instabilidade da ligação glicosídica do DNA em condições fisiológicas tem sido investigada durante 30 anos, utilizando como ferramenta experimental o carbono-13 isotopicamente, ^{13}C , e medindo a velocidade de quebra das purinas e pirimidinas, gerando sítios abásicos, em função do pH, temperatura e força iônica (Lindah, 1993). As purinas são liberadas mais facilmente do que pirimidinas. Estima-se que cada célula humana sofre 10^4 vezes despurinação por dia com subsequente reparo de DNA (Lindah, 1993). Além dessa instabilidade conferida à ligação glicosídica, as bases do DNA estão suscetíveis a sofrerem hidrólise da função amina, desaminação. A citosina e a 5 - metilcitosina são alvos mais frequente para esse tipo de reação e geram uracila e timina, respectivamente. As purinas também perdem o grupo amina, adenina desamina a hipoxantina e guanina a xantina.

A oxidação dos componentes do DNA é uma das principais fontes de indução de danos ao DNA e podem ser gerados por uma variedade de fatores, incluindo o metabolismo endógeno das células, produtos químicos, xenobióticos, radiações ionizantes, e da radiação solar (Cadet, J. *et. et.*, 2010).

Processos de oxidação podem envolver radical hidroxila, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, e oxidação por um elétron, levando a vários tipos de

modificações no DNA. Estes processos implicam efeitos deletérios biológicos os quais incluem quebra da fita, ligações cruzadas DNA-proteína, sítios abásicos, adutos de aldeído, bases oxidadas, morte celular, envelhecimento, mutagênese e carcinogênese (Cadet J. *et. et.*, 1994). Também estão envolvidos na etiologia de outras doenças incluindo a arteriosclerose, artrite, catarata e diabetes.

Entre as bases do DNA, guanina é um alvo preferencial de oxidação no DNA por vários oxidantes, pois possui o menor potencial de redução entre as diferentes bases nitrogenadas, purina e pirimidina (Cadet, 1997). Atualmente, sabe-se que a 2'-desoxiguanosina é a única base que reage significativamente com o $O_2 (^1\Delta_g)$ em pH neutro (Cadet J. *et. al.*, 2005). A determinação das constantes de desativação total das bases nitrogenadas em DNA e RNA em solvente orgânico foi estabelecida na seguinte ordem de reatividade relativa: guanina >> citosina > adenina > uracila > timina (Tabela 1.3) (Prat *et. al.*, 1997).

Tabela 1.3 – Constante de desativação do $O_2 (^1\Delta_g)$ pelas bases nitrogenadas.

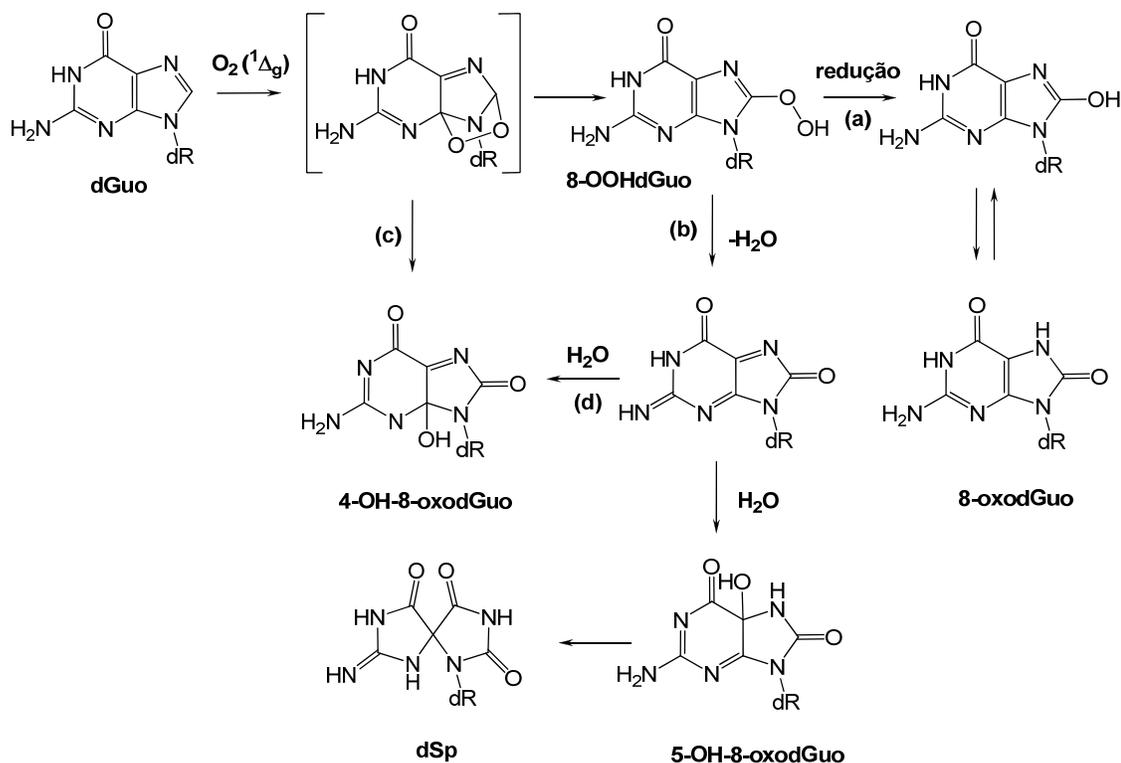
Base nitrogenada	Constantes de desativação total ($10^6 M^{-1}s^{-1}$)
Guanina	$3,0 \pm 0,2$
Citosina	$0,058 \pm 0,001$
Adenina	$0,018 \pm 0,001$
Uracila	$0,011 \pm 0,001$
Timina	$0,0069 \pm 0,0003$

(Prat *et. al.*, 1997)

Os primeiros experimentos demonstraram que a guanina e seus derivados foram altamente suscetíveis à oxidação proveniente do $O_2 (^1\Delta_g)$ gerado pelas seguintes fontes químicas: fotossensibilizadores tipo II, na reação com $H_2O_2/HOCl$ e descarga elétrica de micro-ondas (Simon, 1962 e 1964; Waskell, 1966, Cadet, 1978 e 1981).

A reação principal envolve a formação de um 4,8-endoperóxido instável, através do mecanismo de ciclo adição $[4\pi+2\pi]$ Diels - Alder do anel imidazolóico. O endoperóxido formado se decompõe resultando na 8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina (8-OOHdGuo), a qual através da redução do grupo hidroperóxido dá origem a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), figura 1.10 rota (a). Através do intermediário 8-OOHdGuo com subsequente perda de H_2O , o intermediário formado sofre um ataque nucleofílico da H_2O no carbono-5 resultando na 5-OH-8-oxodGuo seguindo do rearranjo do grupo acila dando origem as espiroiminodihidantoínas diastereoisiméricas dSp, figura 1.10 (b), demonstrados por RMN (Ravanat e Cadet, 1995 ; Niles *et. al.*, 2001; Kang e Foote, 2002b e Adam *et. al.*, 2002).

Anteriormente os diastereoisômeros da dSp foram atribuídos como a 4-OH-8-oxodGuo, contudo atualmente sabe-se que a reação da dGuo pelo $O_2 (^1\Delta_g)$ forma a dSp, 8-oxodGuo e os diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo. A última é formada a partir da clivagem da ligação do endoperóxido, esse intermediário é minoritário com relação ao predominante rearranjo a hidroperóxido (Ravanat *et. al.*, 2006), figura 1.10 rota (c) e (d). A 8-oxodGuo foi detectada com baixo rendimento, quando comparada as dSp (Cadet *et. al.*, 1997).

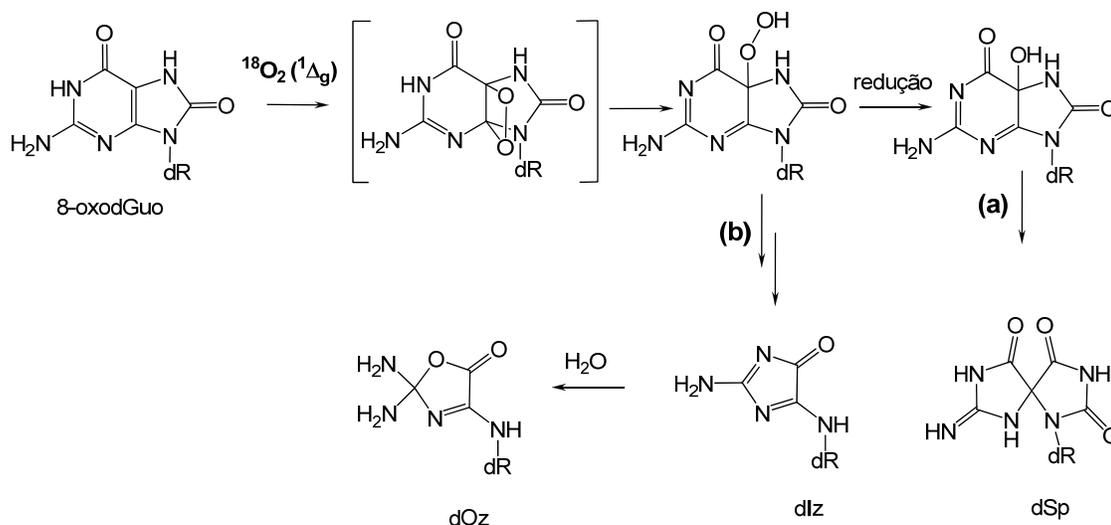


dR = 2-desoxirribose

Figura 1.10 – Esquema da reação de oxidação da dGuo isolada por $O_2 (^1\Delta_g)$ em meio aquoso (Ravanat e Cadet, 1995 e Kang e Foote, 2002b).

A 8-oxodGuo é o produto mais abundante de dano oxidativo no DNA, a qual também é caracterizada pela sua alta susceptibilidade a oxidação por vários processos e espécies reativas, incluindo $O_2 (^1\Delta_g)$, transferência de elétrons, radical hidroxila e peroxinitrito, (Floyd *et. al.*, 1988; Cadet *et. al.*, 1997; Burrows e Muller, 1998). O seus produtos secundários de oxidação foram caracterizados em diversas condições. Estudos apontaram que a 8-oxodGuo, cujo potencial de redução é aproximadamente 0,5 eV menor que da dGuo, torna-se o alvo preferencial (Bernstein R. e Foote C.S, 1999). Por essa razão a 8-oxodGuo é utilizada como biomarcador de estresse oxidativo.

Em reações de fotossensibilização a 8-oxodGuo é considerada um substrato duas vezes mais reativo do que a guanina (Buchko *et. al.*, 1995 e Cadet, 2006). Portanto, propõe-se que para oxidação da 8-oxodGuo pelo $O_2 (^1\Delta_g)$ ocorra a ciclo adição $[2\pi + 2\pi]$ do $O_2 (^1\Delta_g)$ na ligação entre os carbonos 4 e 5 resultando em um intermediário 4,5-dioxetano que rearranja-se formando derivados de hidroperóxidos em C4 (Sheu e Foote, 1995b) e C5 (Raoul e Cadet, 1996). O intermediário formado no carbono-5 a 5-hidroxiperoxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (5-OOH-8-oxodGuo) sofre uma redução no hidroperóxido dando origem a 5-hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (5-OH-8-oxodGuo) formando a dSp Figura 1.11 rota (a). O mesmo intermediário 5-OOH-8-oxodGuo também dá origem a 2,2-diamino-4[-2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosil) amina]-5-(2H)-oxazolona (dOz), sua precursora 2-diamino-5[-2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosil)amina]-4-2H-imidazol-4-ona(dIz), Raoul e Cadet, 1996; Martinez *et. al.*, 2003 e Cadet, 2006), figura 1.11 rota (b). Um segundo rearranjo pode explicar a origem ao ácido cianúrico (dCya). Que é formado a partir do intermediário 4,5-dioxetano que evolve a clivagem da ligação 1,2 do dioxetano resultando em um anel intermediário de 9 membros, o qual após uma ciclização intramolecular é convertido em um anel de 6 membros que sofre hidrólise gerando o ácido cianúrico (Raoul e Cadet, 1996).



dR = 2- desoxirribose

Figura 1.11 – Esquema da reação de oxidação da 8-oxodGuo isolada por O_2 ($^1\Delta_g$) em meio aquoso, (Raoul e Cadet, 1996; Martinez *et al.*, 2003 e Cadet, 2006).

Diferentemente da oxidação da 8-oxodGuo (nucleosídeo isolado) resultar nos produtos relacionados acima, quando a 8-oxodGuo é inserida em um DNA de fita simples resulta em um padrão de degradação completamente diferente, o qual é mais específica, uma vez que, o ácido oxalúrico foi predominantemente gerado (Duarte *et al.*, 2000). Em termos de mecanismo a adição do O_2 ($^1\Delta_g$) leva a formação do 1,4-dioxetano (Sheu e Foote, 1995b), seguido de um rearranjo resultando no intermediário 5-OOH-8-oxodGuo, que é clivado na ligação do carbono 5,6, este intermediário sofre uma descarboxilação gerando dehidroguanidinohidantoina (Gh^{Ox}). Este composto é posteriormente hidratado na base de Schiff, levando a mais uma hidrólise, liberando guanidina e formação de ácido oxalúrico (dOxa) figura 1.12 (Duarte *et al.*, 2000).

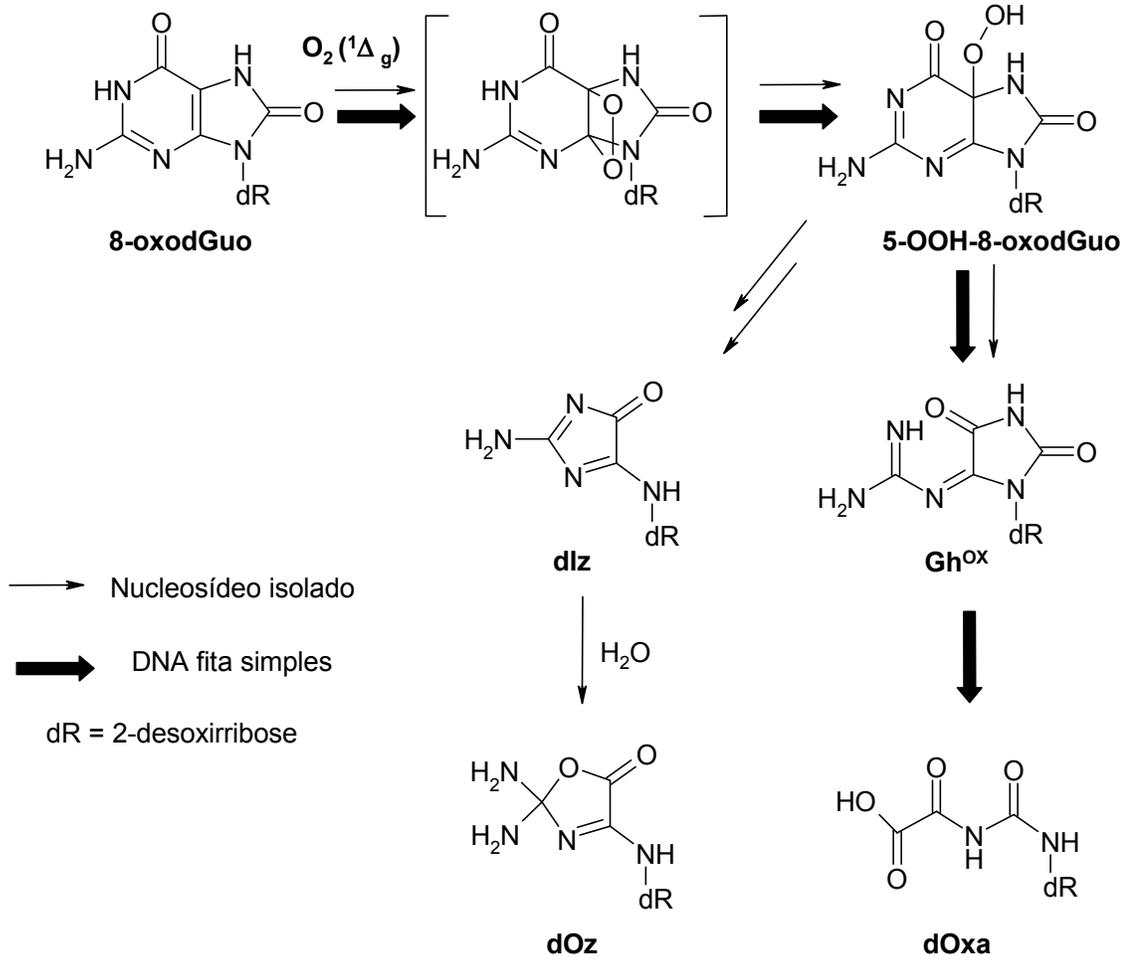


Figura 1.12 – Principais produtos de oxidação gerados pelo $O_2(^1\Delta_g)$ com a 8-oxodGuo. Formando um intermediário 5-OOH-8-oxodGuo, no qual se decompõe a dlz, dOz e dGh^{ox}. Entretanto no DNA de fita simples, forma dOxa através de dGh^{ox} como um intermediário, Adaptado Martinez, 2003.

1.5 Ozônio

Christian Friedrich Schönbein (1839) observou o aparecimento de um gás picante com odor levemente adocicado, seu odor pode ser percebido em concentrações entre 0.0076 e 0.036 ppm. O O_3 é um gás instável, diamagnético, de cor azul intensa e seu odor característico é frequentemente associado a equipamentos elétricos que produzem faíscas.

O ozônio é um componente natural da alta atmosfera, conhecida por estratosfera, a parte que abrange aproximadamente dos 15–50 km da superfície da Terra, que previne a penetração dos raios UV-C ($\lambda = 230 - 320$ nm) à superfície da terra, formando uma região da atmosfera que constitui um “escudo solar natural da terra”. Qualquer redução substancial na quantidade de ozônio estratosférico pode causar um aumento na incidência de câncer de pele, uma vez que os raios ultravioletas são mutagênicos.

O ozônio está sendo constantemente produzido pela fotodissociação do oxigênio molecular através da absorção de energia dos fótons provenientes da luz solar (UV-C) em dois átomos de oxigênio altamente reativos, os quais subsequentemente reagem com outra molécula de O_2 ($^3\Sigma_g^-$) desencadeando a formação do ozônio liberando calor. Deste modo, protegendo assim os organismos vivos da terra (Colin Baird, 2004).

Embora o ozônio atue como uma proteção à superfície da terra, grandes quantidades podem ser formadas na parte inferior da atmosfera, ou seja, no ambiente urbano. Ele é um poluente secundário formado através de reações entre poluentes primários, aqueles emitidos diretamente no ar, principalmente os óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre, óxidos de carbono e hidrocarbonetos,

catalisados pelos raios solares (raios ultravioletas). Essas reações tem como resultado uma série de reações fotoquímicas complexas ("smog" fotoquímica).

Portanto, essas condições ambientais tornam o ozônio o maior componente da poluição do ar, trazendo inúmeros efeitos sobre a saúde humana. Visto que essa espécie é produzida nos dias com alta radiação UV, ou seja, em dias ensolarados e áreas com intensa poluição primária.

Condições meteorológicas podem deslocar o ozônio ou os seus precursores, poluentes primários, destas áreas mais propensas à formação de ozônio em direção as áreas menos poluídas, como zonas rurais, acarretando danos nas espécies de plantas cultivadas. Novamente, em condições meteorológicas pode agravar a velocidade de formação do O₃, particularmente a inversão atmosférica (Baumbach e Voght, 1999, 2003).

Ainda no panorama urbano, o O₃ é motivo de preocupação em muitos centros, como na região metropolitana da cidade de São Paulo, dado o grande aumento da frota de automóveis movidos a óleo diesel e a álcool. Em um trabalho publicado recentemente, Abrantes e colaboradores relataram a relevância da emissão de aldeídos (formaldeídos e acetaldeídos) no aumento da concentração de O₃ na atmosfera da cidade de São Paulo (Abrantes *et. al.*, 2005).

A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) monitora a qualidade do ar em várias cidades da Grande São Paulo, regiões da capital Paulista e interior. Na tabela 1.4 podemos acompanhar os critérios da qualificação do ar através de um índice, o qual é utilizado desde 1981, e foi criado usando como base longa experiências desenvolvidas no Canadá e EUA, CETESB.

Tabela - 1. 4 - Índice de qualidade do Ar.

Qualidade	Índice	MP ₁₀ (µg/m ³)	O ₃ (µg/m ³)	CO (ppm)	NO ₂ (µg/m ³)	SO ₂ (µg/m ³)
Boa	0 - 50	0 - 50	0 - 80	0 - 4,5	0 - 100	0 - 80
Regular	51 - 100	50 - 150	80 - 160	4,5 - 9	100 - 320	80 - 365
Inadequada	101 - 199	150 - 250	160 - 200	9 - 15	320 - 1130	365 - 800
Má	200 - 299	250 - 420	200 - 800	15 - 30	1130 - 2260	800 - 1600
Péssima	>299	>420	>800	>30	>2260	>1600

Os padrões nacionais foram estabelecidos pelo IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e aprovados pelo CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente, por meio da Resolução CONAMA 03/90, CETESB.

O limite para a poluição do ar, o poluente ozônio, está fixado a uma concentração de níveis máximos tolerados de 160 µg/m³ (média de uma hora). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um limite máximo de 100 µg/m³ (média de 8 horas).

Podemos comparar o monitoramento da qualidade do Ar (tabela 1.5), na região da Universidade de São Paulo (USP) na Capital Paulista. A estação de monitoramento fica localizada no Instituto de Pesquisas Nucleares – IPEN (Estação IPEN-USP). O dia 06 de outubro de 2009 foi selecionado devido à alta temperatura, aproximadamente 30°C.

Tabela 1.5 - Monitoramento do Ar na capital paulista, região da USP, no dia 06/10/2009.

Hora	CO ppm			NO ₂ µg/m ³		O ₃ µg/m ³	
	Média horária	Média 8 h	Índice / Qualidade	Média horária	Índice / Qualidade	Média horária	Índice / Qualidade
1:00	2,0	1,4	16	--	--	15	9
2:00	2,6	1,6	18	52	26	16	10
3:00	2,8	1,9	21	53	27	17	11
4:00	3,0	2,1	23	45	23	19	12
5:00	--	2,3	26	44	22	18	11
6:00	2,0	2,4	27	39	20	--	--
7:00	2,3	2,4	27	41	21	20	13
8:00	1,7	2,3	26	76	38	21	13
9:00	0,9	2,2	24	66	33	41	26
10:00	0,5	1,9	21	34	17	79	49
11:00	0,5	1,5	17	34	17	120	75
12:00	0,6	1,2	13	46	23	130	81
13:00	0,3	1,1	12	20	10	150	94
14:00	0,6	0,9	10	41	21	163	108
15:00	0,4	0,7	8	19	10	192	180
16:00	0,3	0,5	6	20	10	129	81
17:00	0,4	0,4	4	40	20	87	54
18:00	0,6	0,5	6	58	29	66	41
19:00	1,0	0,5	6	85	43	36	23
20:00	1,0	0,6	7	76	38	28	18
21:00	1,2	0,7	8	99	50	9	6
22:00	0,4	0,7	8	39	20	44	28
23:00	0,3	0,6	7	9	5	67	42
24:00	0,5	0,7	8	28	14	44	28

Fonte: CETESB, www.cetesb.sp.gov.br

Ressalvando que outras regiões na capital paulista como Ibirapuera, Santo Amaro e Mooca e no interior paulista como Americana, Araraquara, Paulínia, Piracicaba e Ribeirão Preto entre outras têm um índice elevado de ozônio poluente.

Este cenário da poluição atmosférica e a consequente formação de ozônio é motivo de preocupação, devido à variação diária de exposição ao O₃ ter sido

associada com uma causa de mortalidade específica em alguns países. Além disso, o tempo de exposição tem sido associado com um moderado aumento na incidência de câncer de pulmão em não fumantes em um período de sete dias em homens residentes na Califórnia (Palli D. *et. al.*, 2003).

Uma pesquisa em modelo animal o ozônio pode afetar o trato respiratório primário, causando tanto efeitos crônicos como agudos na saúde. O poluente produz diversos prejuízos tanto no nível celular como fisiológico (Bromberg and Koren 1995). Além disso, como um componente da poluição do ar é associado com o aumento da velocidade da mortalidade, devido a doenças cardiovasculares e respiratórias, tão bem como a diminuição da expectativa de vida.

Exposição aguda, entre 80 a 200 ppb durante 5 minutos a 6 horas, induz um conjunto de respostas pulmonares incluindo uma diminuição reversível na função respiratória. Essa ocorrência pode ser observada dentro das primeiras horas depois de iniciar a exposição e podendo persistir durante algumas horas ou dias depois de ter cessado a exposição ao poluente (Lippman e Schlessinger 2000).

Os efeitos da exposição crônica são devido à exposição repetitiva ou intermitente, no período de dias ou semanas. Isto pode prolongar ou agravar os efeitos transitórios na função respiratória basal ou alterar a estrutura pulmonar, resultando em danos acumulados ou implicação da resposta adaptativa (Frank *et al.*, 2001). Adicionalmente, ocorrem diferentes respostas ao poluente em distintos grupos de risco, estes grupos incluem: crianças e idosos; pessoas com doenças pulmonares severas, como asma e a doença obstrutiva crônica; aumento da velocidade respiratória e doenças cardiovasculares, atletas e trabalhadores externos, especialmente durante os dias quentes (Höppe *et al.*, 1995).

Alguns sintomas típicos a exposição ao O_3 em humanos, consiste na rápida e superficial respiração, acompanhada de uma irritação da traqueia pelo esforço da inspiração profunda e tosse. Perda da capacidade respiratória profunda e desconforto no peito.

Deste modo, há uma preocupação com a formação do ozônio poluente, cujo é um potente oxidante que pode causar danos severos aos tecidos celulares, particularmente no pulmão. Ainda, seus efeitos biológicos são atribuídos a sua habilidade de oxidar biomoléculas tanto via direta e ou indiretamente (reações envolvendo espécies reativas). Sendo assim, essa espécie química pode causar danos em importantes biomoléculas tais como, lipídios, proteínas e DNA.

1.6 Propriedades físico- químicas do O_3

A molécula de ozônio possui uma geometria angular, figura 1.13, onde o átomo de oxigênio central possui orbitais sp^2 para formar ligações sigma (σ) com os demais oxigênios. Os orbitais p_z dos três átomos de oxigênios são utilizados para formar uma ligação π deslocalizada. Sendo que as duas ligações desta molécula são equivalentes a $1,5 A^\circ$. Devido a este arranjo o ozônio é dipolar e pode reagir como um agente eletrofílico, nucleofílico ou por adição 1,3-dipolar (mecanismo de Criegee). Sua solubilidade é de 0,105 g por 100 mL de água aproximadamente dez vezes mais que o O_2 ($^3\Sigma_g^-$); tem densidade de 2, 144g. L^{-1} e é um poderoso oxidante. A tabela 1.6 apresenta alguns potenciais de redução para determinadas espécies reativas incluindo O_3 .

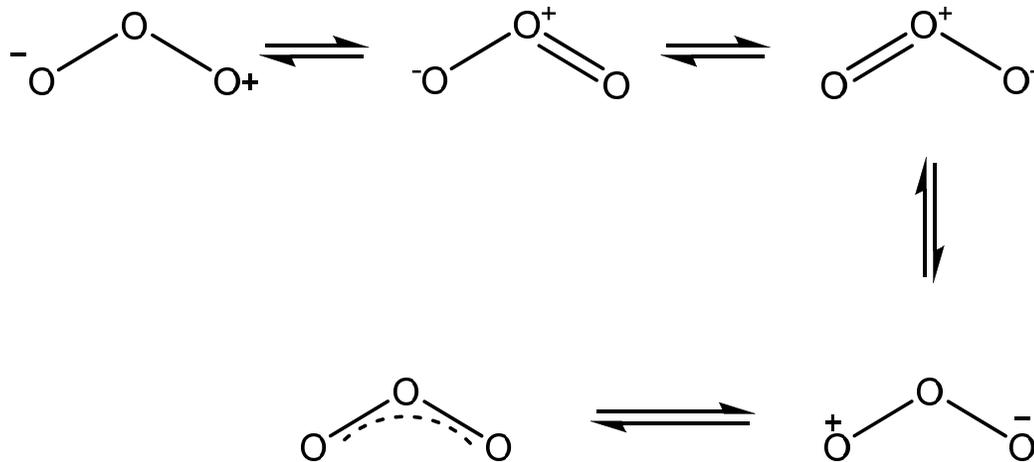


Figura 1.13 – O ozônio existe em alguns estados mesoméricos em equilíbrio dinâmico, híbrido de ressonância, (Tanaka *et. al.*, 1970)

A redução de um elétron do O_3 a O_2 ($^3\Sigma_g^-$) e radical hidroxila é altamente favorável, no entanto a redução de dois elétrons do O_3 formando O_2 ($^3\Sigma_g^-$) e H_2O é ainda mais favorável como mostrado nas reações 1.15 e 1.16, respectivamente, Kopczyński, 1971.



O ozônio é um gás termodinamicamente instável, decompondo-se a O_2 ($^3\Sigma_g^-$) a reação é exotérmica e é catalisada na presença de diversos materiais. A decomposição do O_3 pode ser acelerada pelo aumento do pH ou pela adição de peróxido de hidrogênio. Desta maneira, as oxidações aos substratos podem ocorrer

pela reação direta (predominante em meio ácido), ou pelas espécies secundárias reativas (reação indireta – predominante em meio alcalino), embora na prática haja a contribuição dos dois mecanismos.

Tabela 1.6 – Potenciais de redução de alguns agentes oxidantes.

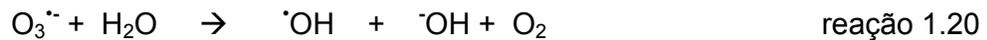
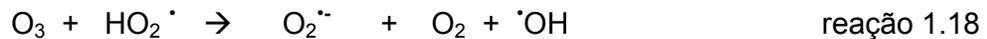
Espécies	Potencial de redução (Volts)
Radical hidroxila	2,80
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato de potássio	1,70
Cloro	1,36
Dióxido de cloro	1,27
Oxigênio	1,23

Gunten U. Von (2003).

A reação direta consiste em um ataque eletrofílico pelo ozônio molecular, isso é atribuída a compostos que contêm ligações do tipo C=C, grupos específicos tais como, OH, CH₃, OCH₃ e átomos que apresentam alta densidade eletrônica como nitrogênio, fósforo, oxigênio e enxofre, sendo assim uma reação seletiva. Estas reações diretas não costumam promover a oxidação completa dos compostos orgânicos até CO₂ e H₂O, sendo os principais produtos deste tipo de reação aldeídos, álcoois e ácidos carboxílicos. A reação indireta via [•]OH, não é seletiva, sendo capaz de promover um ataque a compostos orgânicos na ordem de 10⁶-10⁹ vezes mais rápido que os conhecidos agentes oxidantes, como peróxido de hidrogênio e o próprio ozônio (Almeida *et. al.*, 2004).

O ozônio é instável em solução aquosa, sua decomposição em água pura é caracterizada por uma cinética de primeira ordem.

Dependendo do meio pode haver uma variação do tempo de meia vida do ozônio de alguns segundos a horas. Sua estabilidade depende de diversos fatores, dentre eles, o pH merece maior atenção, uma vez que o principal desencadeador da decomposição do ozônio é o íon hidroxila. A reação entre estas duas espécies induz uma série de reações radicalares que levam a formação do $\cdot\text{OH}$. Alguns estudos com EPR demonstrou que há a formação do superóxido como um intermediário desencadeador, que por sua vez transfere um elétron para o ozônio formando então o íon ozonida ($\text{O}_3^{\cdot-}$), o qual será convertido à radical hidroxila, como pode ser visto nas reações 1.17 a 1.20 (Hoigné J, 1985).



1.7 Geração de oxigênio molecular singlete proveniente da reação de Ozônio com biomolécula, compostos orgânicos e inorgânicos.

Sabe-se que reações com ozônio produzem $O_2 (^1\Delta_g)$ com alto rendimento. Isto ocorre quando há predominantemente a reação de transferência de um átomo de oxigênio proveniente da molécula de O_3 adiciona-se ao substrato. Esse fato é explicado teoricamente pela regra de conservação do spin, a molécula de oxigênio resultante deverá estar no seu estado excitado.

Um exemplo destas reações são aminas terciárias, as quais geram em maiores proporções aminóxidos. A figura 1.14 mostram-se as possíveis rotas de reação: na rota 1 pode-se alcançar uma maior produção de $O_2 (^1\Delta_g)$, em meio orgânico. Na rota 2, há transferência de elétrons do substrato para ozônio, em meio aquoso, devido à alta constante dielétrica da água, não podendo ser alcançada em solventes orgânicos devido à baixa solvatação dos íons radicais. Todavia o rendimento da formação dos produtos por transferência de um átomo de O do O_3 , rota 3 e 4, pode ser menor. Difundindo da gaiola do solvente, reação 5, o radical ozonida, pode induzir a decomposição do ozônio, via reação em cadeia.

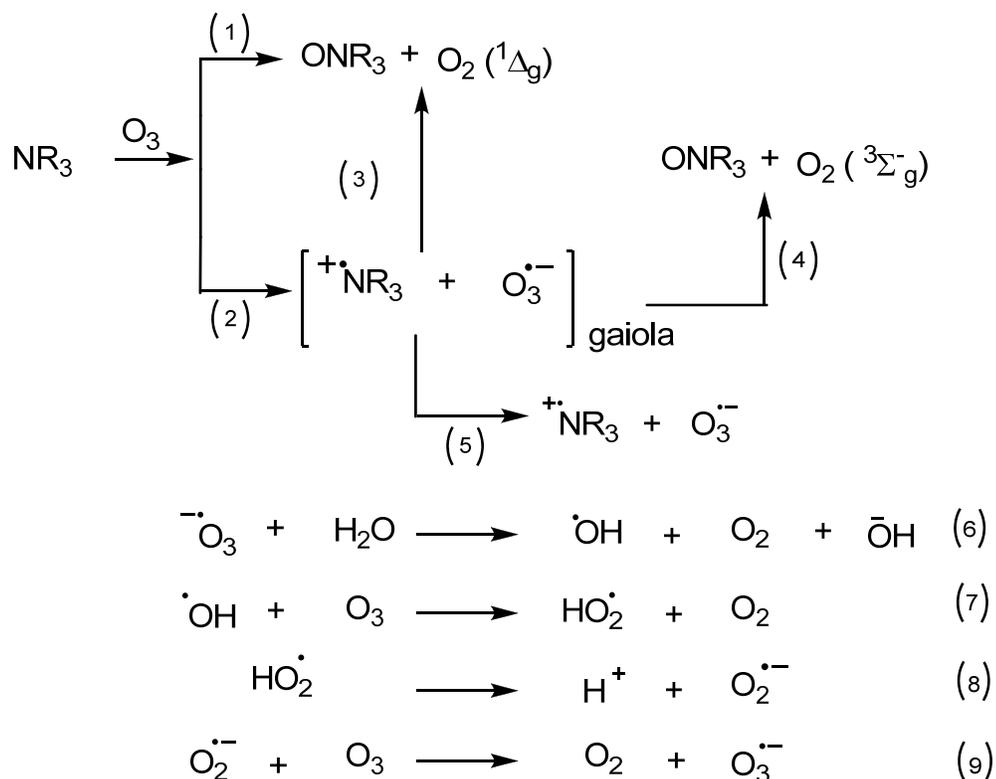


Figura 1.14 – Esquema de reação do ozônio com amina terciária, (Sonntag *et. al.*, 2001).

Evidências da geração de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a partir da reação do ozônio com alguns compostos como: aminas terciárias, bases nitrogenadas e nucleosídeos, que podem ser vistos na tabela 1.7 (Sonntag *et. al.*, 2001). Assim quando a maioria das aminas está protonada em pH 7,0 a velocidade de reação diminui. E como consequência as reações em cadeia induzida por radicais livres consomem tanto O_3 como as aminas e, portanto reduz a formação de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Somente as aminas livres reagem com ozônio em quanto que as aminas protonadas não apresentam reatividade.

No caso das aminas terciárias aromáticas a produção de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ é comparativamente baixa, pois estas aminas têm baixo potencial de redução

comparada às alifáticas, portanto, a rota de transferência de elétrons torna-se majoritária.

Outros compostos contendo enxofre, bromo, iodo também reagem com ozônio formando $O_2(^1\Delta_g)$. Importantes biomoléculas como glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), NADH, NADPH, albumina, ácido ascórbico e ácido úrico geram $O_2(^1\Delta_g)$ em grandes quantidades (Kanofsky e Sima, 1993).

A cafeína, um componente do café e de chás, sua estrutura molecular é uma purina, ou seja, um anel de pirimidina e um imidazol. Existe um interesse na sua rota de degradação devido ao tratamento de água, o qual é encontrado no sistema de tratamento da água de uso doméstico (Kolonko, *et. al.*, 1979). Sendo assim, as evidências dos produtos da cafeína ozonizada mostraram ser dependentes de alguns parâmetros experimentais como: solventes, íons metálicos e pH e outros parâmetros como temperatura e tempo de reação apresentou um efeito não significativo. Portanto, a ozonização da cafeína pode proceder por três mecanismos distintos: (i) Se o tipo de mecanismo ocorrer pelo intermediário de Criegee, sendo a adição 1,3-dipolar na dupla ligação do carbono C4=C5, como ocorre com as pirimidinas, um intermediário correspondente a um carbono quaternário pode ser formado. Estes estudos da química da cafeína com ozônio podem ajudar a explicar a reatividade do O_3 com os ácidos nucleicos.

(ii) Um mecanismo proposto (Rosal *et. al.*, 2009), demonstrou que em pH ácido e alcalino na faixa de 3,0 - 10,0, o ozônio se adiciona em N9=C8, no anel imidazol, ocorrendo a abertura do anel, com alguns transformação em seus intermediários sendo essa etapa dependente do pH, figura 1.15 e 1.16 e 1.17.

Tabela 1.7 – Porcentagem da emissão de $O_2(^1\Delta_g)$ em 1270 nm formado a partir do ozônio com os substratos listados abaixo, com variação do pH.

Substrato	pH	Rendimento $O_2(^1\Delta_g)$ %
Trimetiltilamina	7,0	63
Trietilamina	7,0	Sem sinal
	9,5	52
		78
DABCO	7,0	70
	9,0	90
Azida	7,0	11
Nitrito	7,0	96
Timina	3,5	Sem sinal
	7,0	7,0
	10	8,0
Timidina	7,0	Sem sinal
	10	Sem sinal
Citosina	7,0	Sem sinal
	11	10
2'-desoxicitidina	7,0	Sem sinal
Citidina	7,0	Sem sinal
2'-desoxiguanosina	7,0	40
Guanosina	7,0	39
2'-desoxiadenosina	7,0	16
Adenosina	7,0	10

100 % de $O_2(^1\Delta_g)$ = HOCl / H_2O_2 – (Sonntag *et. al.*, 2001).

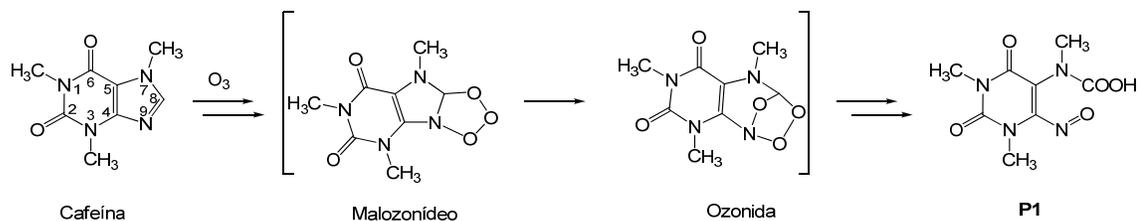


Figura 1.15 – Esquema de reação do ozônio com a cafeína em pH neutro e a geração do produto identificado por LC-TOF-MS, P1 (Rosal *et al.*, 2009).

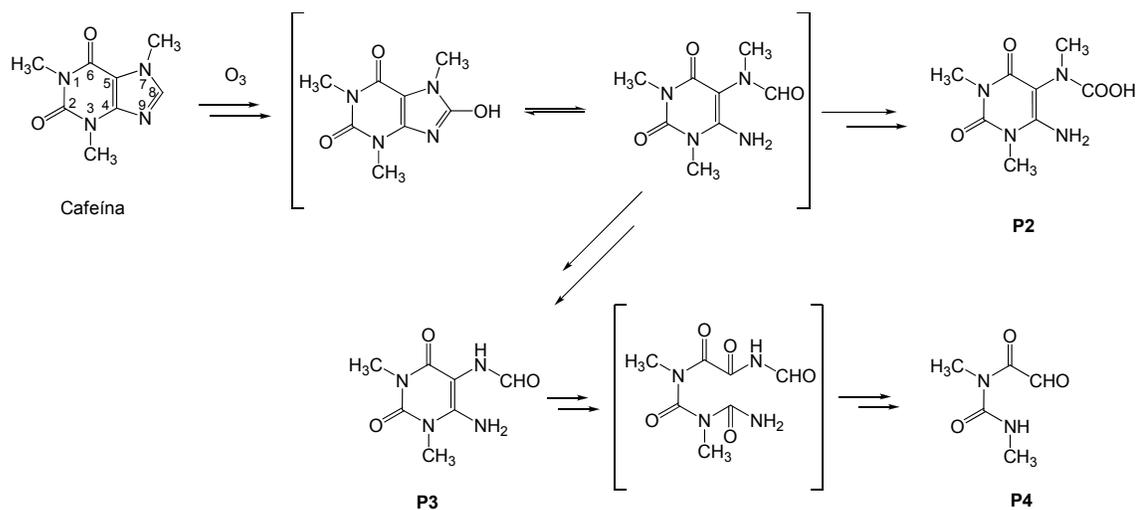


Figura 1.16 – Esquema de reação do ozônio com a cafeína em pH 3,0, outra rota de oxidação pelo O_3 , geração produtos identificados por LC-TOF-MS, P2, P3 e P4 (Rosal *et al.*, 2009).

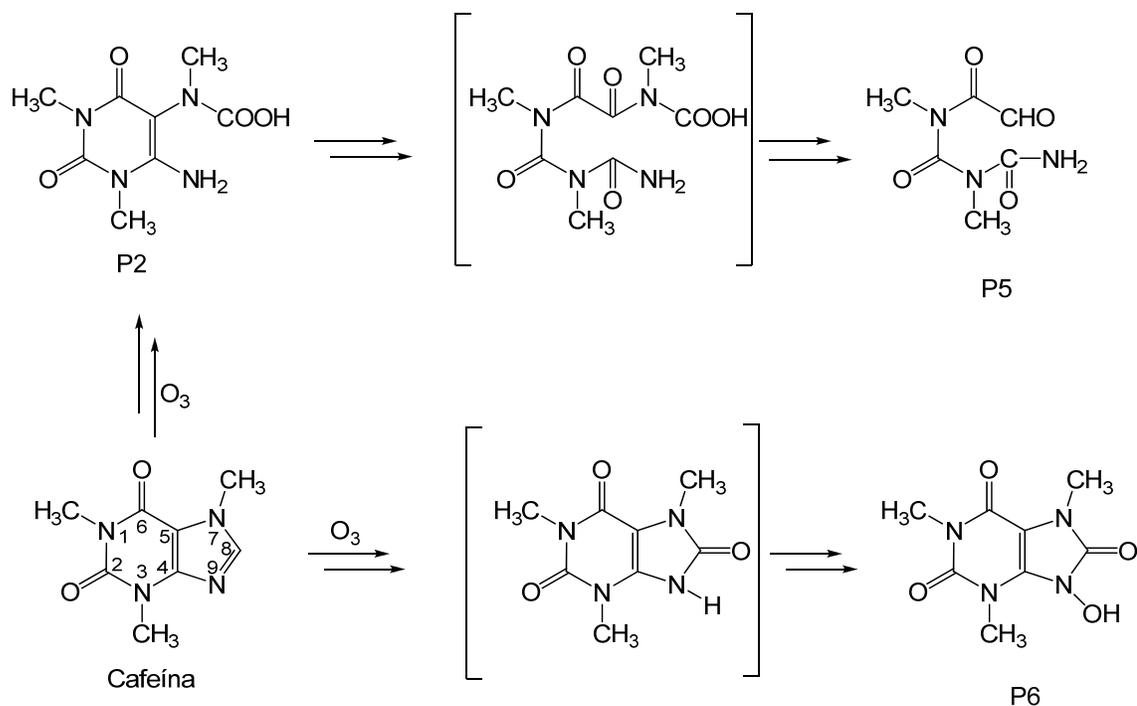


Figura 1.17 – Esquema de reação do ozônio com a cafeína em pH 8,0, outra rota de oxidação pelo O_3 , geração produtos identificados por LC-TOF-MS, P2, P5 e P6 (Rosal *et al.*, 2009).

Anteriormente descrito por Sary (1976) e comprovado em estudos recentes por Cerkovik (2002), a interação entre o O_3 e uma série de compostos orgânicos formam uma espécie química nominada como trióxido, $ROOOH$, a qual é atribuída pela liberação de O_2 ($^1\Delta_g$). Acredita-se que esta espécie transiente seja um dos intermediários importantes nos processos de ozonólise, seja na atmosfera poluída ou não poluída, ou em sistemas biológicos (Wentworth *et. al.*, 2001).

Novamente, houve confirmação das evidências apresentadas por Sary sobre a liberação do O_2 ($^1\Delta_g$) em reações do O_3 com substratos orgânicos. Desta forma, estudos demonstraram que $HOOOH$, $HOOO^*$, e $HOOO^-$ são importantes

intermediários formados durante a oxidação de biomoléculas por O_3 . Ainda, recentemente HOOOH mostrou ser um possível intermediário formado durante a produção de H_2O_2 a partir de $O_2(^1\Delta_g)$ e água, numa reação catalisada por anticorpos (Wentworth *et. al.*, 2000, 2002, 2003).

Considera-se, geralmente devido à sua alta reatividade, que o O_3 inalado seja prontamente consumido pelo fluido de revestimento epitelial pulmonar (ELF–*epithelial lining fluid*) ou pelas membranas das células pulmonares (Postlethwait *et al.*, 1998). Desse modo, seus efeitos genotóxicos não seriam exclusivos de sua ação direta, e sim da combinação dessas espécies reativas secundárias, considerando-se também a formação de radicais livres (Mehlman e Borek, 1987).

O fluido de revestimento epitelial pulmonar é composto pelos seguintes antioxidantes: ácido ascórbico, glutathiona reduzida e ácido úrico, os quais interceptam o O_3 impedindo que ele reaja com os tecidos.

A toxicidade do O_3 nos tecidos pode ter implicação das espécies reativas secundárias formadas nas reações com O_3 , as quais precisam de aproximadamente micro segundos para difundir no fluido epitelial pulmonar. A ozonólise do ácido ascórbico, $pK = 4,1$, produz cerca de 90% de $O_2(^1\Delta_g)$ em solução aquosa pH 7,0, implicando na oxidação de dois elétrons resultando na formação do ácido dehidroascórbico, DHA, reação 1.21, (Enami e Colussi A. J *et. al.*, 2007), esse mecanismo pode ocorrer em maiores proporções em pH fisiológico. Por outro lado, a ozonização do AH_2 em solvente orgânico, onde o AH_2 não está dissociado produz um ozonídeo estável, em água, entretanto o produto principal preferencialmente formado é o α -hidroxialquilhidroperóxido do que o ozonida, a figura 1.18, ilustra as reações do AH_2 e AH^- com O_3 .

A reação do ácido úrico com ozônio mostra a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ e a formação de um epóxido, produto proveniente da transferência de um átomo de oxigênio do O_3 para o AU e o ozonida que dá origem a outros produtos, figura 1.19.

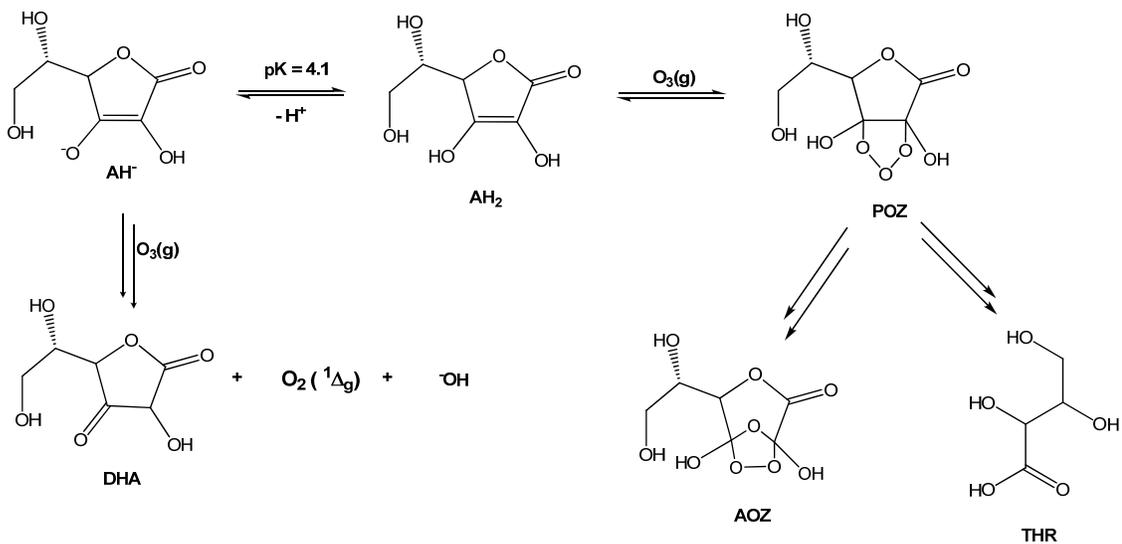


Figura 1.18 – Esquema de reação do ozônio com ácido ascórbico (AH₂) e ascorbato (AH⁻) em pH acima do pk = 4.1 e pH neutro, o produto DHA é produzido diretamente, enquanto THR (ácido 1,2,3 –trihidroxibutanóico) e o ozonida (AOZ) são formados via o instável malozonídeo (POZ), (Enami e Colussi, 2007).

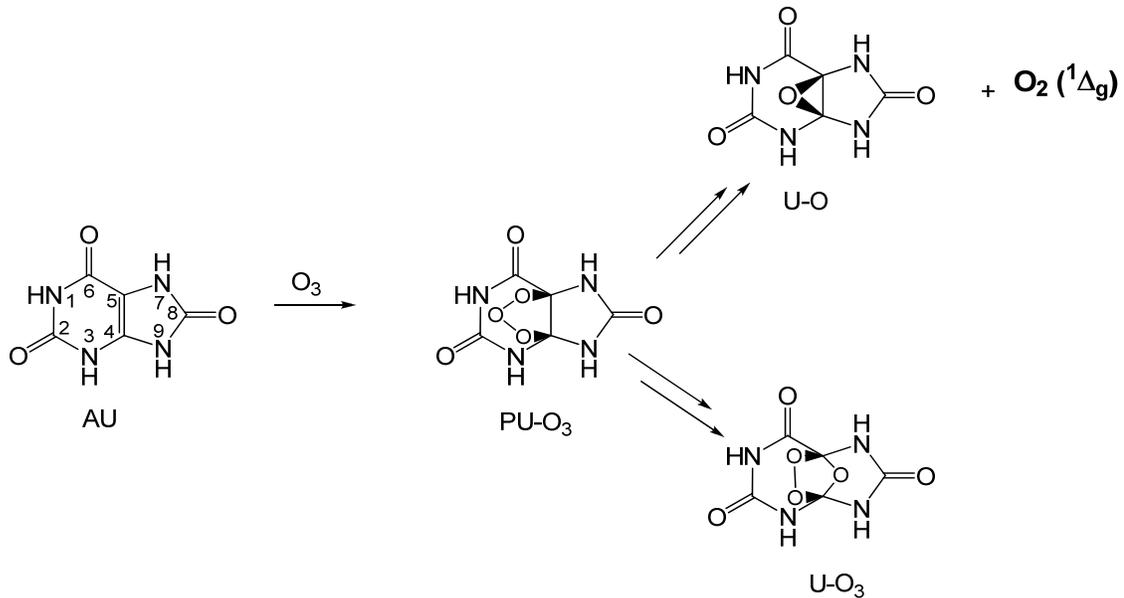


Figura 1.19 – Esquema de reação do ozônio com ácido úrico (AU) em pH neutro, os intermediários (PU- O_3) ozonídeo primário (malozonídeo) rapidamente transforma em (U- O_3) ozonídeo e com a abertura do PU- O_3 gera os produtos identificados como epóxido (U-O) e $O_2(^1\Delta_g)$ (Colussi A. J., *et. al.*, 2008).

A glutathiona reduzida é considerada ter um importante papel no contexto de defesa antioxidante do fluido pulmonar como um sequestrador de espécies reativas de oxigênio e sinalizador do potencial redox celular. A sua conversão a glutathiona oxidada ocorre por transferência de um elétron pela GSH redutase.

Os tióis são alvos versáteis devido a sua facilidade de doar hidrogênio para espécies reativas e acceptor de átomos de oxigênio. O ozônio é termodinamicamente um poderoso oxidante, possui uma cinética lenta para aceitar um elétron e muito reativo para transferência de um átomo de oxigênio, o que invariavelmente se inalado induz inflamação nas vias aéreas pulmonares e agrava sintomas da asma.

As reações de GSH com O_3 procedem via transferência de um átomo de oxigênio ao enxofre da cisteína. (Colussi A. J *et. al.*, 2008), figura 1.20. Os grupos tióis reagem mais lentamente com O_3 para gerar $O_2 (^1\Delta_g)$ do que os tiolatos (RS^-).

O α -tocoferol (vitamina E) também pode reagir com ozônio por transferência de um átomo de oxigênio com consequente liberação de $O_2 (^1\Delta_g)$ (Colussi A. J *et. al.*, 2009).

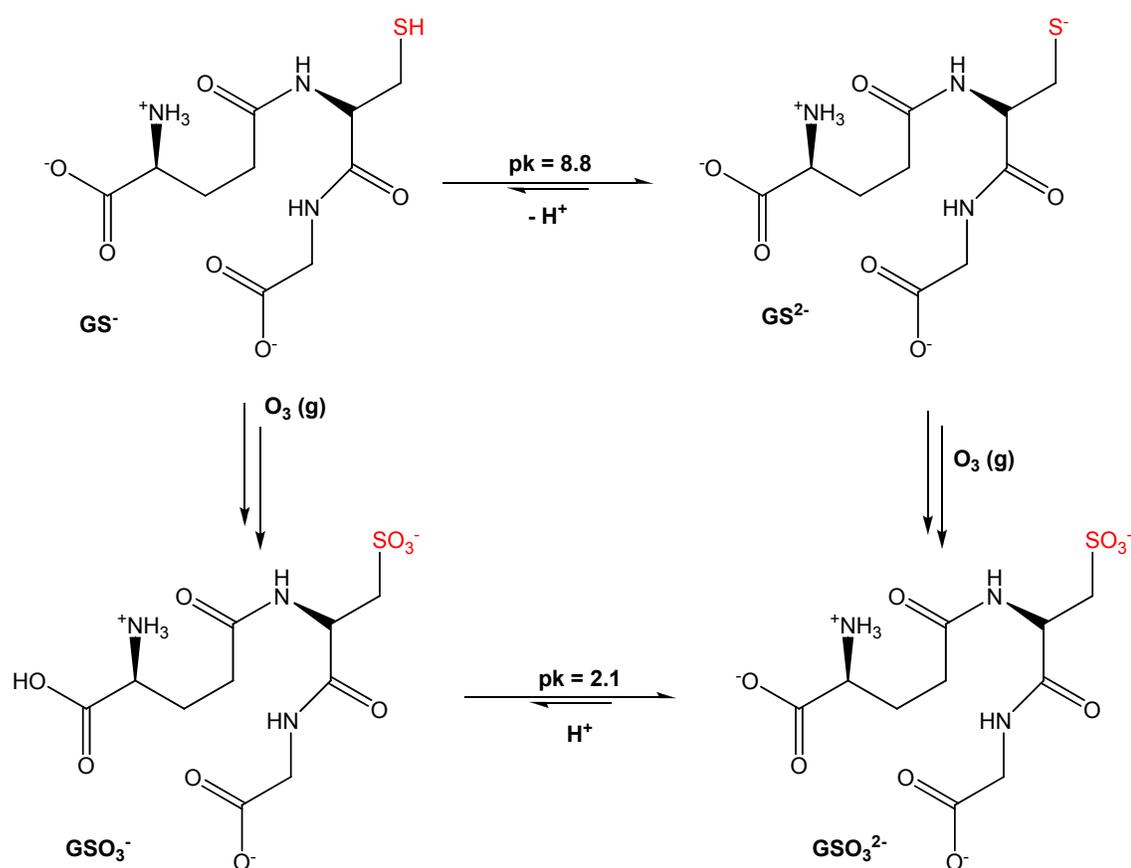


Figura 1.20 – Esquema de reação do ozônio com glutatona reduzida (GSH). GS⁻ e GS²⁻ representa as suas desprotonações no pka indicado, e GSO₃⁻ e GSO₃²⁻, suas formas desprotonadas, como ozonídeo primário, podendo decompor em $O_2 (^1\Delta_g)$ e seu sulfóxido correspondente, entre outros produtos

(Colussi A. J *et. al.*, 2008).

Acredita-se que o alvo primário do O₃ exógeno seja o sistema respiratório, como foi demonstrado em modelo animal, em que houve indução de câncer de pulmão por ação de O₃ (Hasset *et al.*, 1985). Ainda, foi observado que o O₃ não é capaz de penetrar além dos fluídos pulmonares e das membranas das células superficiais da interface ar pulmões, devido à sua alta reatividade e à sua neutralização por agentes antioxidantes como Vitamina E, ascorbato, etc. (Pryor *et al.*, 1995).

Uma consideração importante relacionada ao fato do ozônio em soluções aquosas gerar espécies reativas secundárias, como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e O₂ (¹Δ_g) esse fato suporta as hipóteses da sua toxicidade ser proveniente da ação dessas espécies secundárias, além dos próprios produtos gerados pela reação direta.

Finalmente, hoje é sabido que processos inflamatórios induzidos por fatores biológicos, químicos ou físicos estão intimamente associados ao desenvolvimento de câncer, considera-se que a alta produção de espécies reativas característica de tecidos inflamados podem induzir danos oxidativos ao DNA (Ohshima *et al.*, 2003). Desse modo, expõe-se o provável papel do O₃ no desenvolvimento de câncer associado a processos dessa natureza, uma vez que a exposição ao O₃ reconhecidamente resulta numa resposta inflamatória.

1.8 Reações do ozônio com Biomoléculas

1.8.1 DNA e Bases nitrogenadas

Apesar de ainda não haver estudos conclusivos sobre a relação entre O_3 e o desenvolvimento de uma variedade de câncer, suas propriedades mutagênicas foram parcialmente descritas, sendo que a substituição das bases constituintes do DNA corresponde à quase totalidade das mutações observadas. Ainda, constatou-se o elevado potencial mutagênico do O_3 sobre o DNA, levando, principalmente, à substituição de suas bases constituintes. Pela frequência das substituições das bases serem essencialmente localizada no par G:Cs (75%), uma característica das espécies reativas. As transversões G:C \rightarrow T:A (28%), são mais frequentes, assim como as substituições G:C \rightarrow C:G (23%) e G:C \rightarrow A:T (23%), sendo provavelmente a 8-oxodGuo responsável pelas transversões G:C \rightarrow T:A. Adicionalmente identificaram-se sequências preferenciais (*hotspots*) de ações específicas para o O_3 . Esses locais foram definidos após comparação dos efeitos de outras espécies oxidantes, como radicais hidroxila, O_2 ($^1\Delta_g$), e radiação ionizante (Jorge *et. al.*, 2002).

A reatividade do O_3 com DNA têm sido extensivamente estudadas, Ito em 2005 evidenciou a quebra da ligação fosfodiéster da fita dupla de DNA sem o tratamento com piperidina, e o aumento das quebras foi observado com o tratamento de piperidina, indicando modificação nas bases. Entretanto as quebras foram diminuídas (sem piperidina) a adição de etanol e dimetilsufóxido (DMSO) por ter propriedade de capturar o $\cdot OH$. Por outro lado a mesma abordagem foi feita sem a

piperidina as quebras do DNA foram inibidas, deste modo, sugeriu-se que a contribuição do $\cdot\text{OH}$ nas modificações da base foram pouco significativas. Ainda nesse contexto, experimento com *Calf thymus*, foi evidenciado a formação da 8-oxodGuo ser dependente da concentração de ozônio, ademais mostrou-se parcialmente inibida com o uso de captadores de $\cdot\text{OH}$. Os fragmentos de DNA foram sequenciados e os sítios clivados com piperidina resultaram em guanina e timina.

Apesar dos mecanismos de danos ao DNA por ação do O_3 permanecerem em grande parte desconhecidos, propõe-se que os produtos formados da reação do O_3 com ácidos graxos insaturados de membranas (derivados de aldeídos, hidroxihidroperóxidos, e outros como o ozonida), são notavelmente capazes de alcançar o núcleo de células intactas, possibilitando interação com o DNA (Pryor *et. al.*, 1995), levando assim a possíveis lesões.

Um estudo feito da degradação do DNA como ozônio, mostra que o DNA entra em colapso quando uma proporção molar de $\text{DNA}/\text{O}_3 = 2,3$ é alcançada, assim toda a timina e guanina (as mais reativas) são consumidas (Cataldo *et. al.*, 2006).

Cadet e colaboradores (1993 e 1996) identificaram e caracterizaram alguns principais produtos da oxidação das pirimidinas (2'-desoxicitidina e timidina) com o ozônio. Propõe-se o mecanismo de reação é via geração de um intermediário instável, o ozonida (Criegee), que leva a abertura da dupla ligação entre os carbonos 5 e 6, figura 1.21. Através da comparação entre a ozonólise e a ação do radical hidroxila, foi concluído que o ozônio age mais especificamente nas pirimidinas do que os radicais hidroxilas.

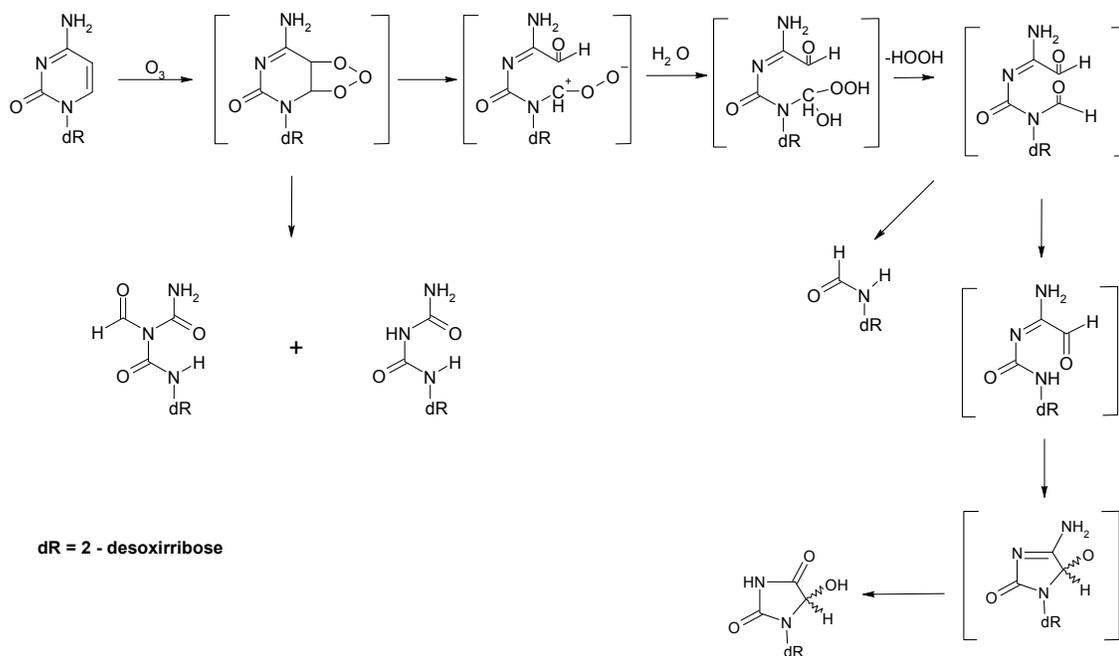


Figura 1.21 – Mecanismo de oxidação da 2'- desoxicitidina mediada por ozônio (Cadet *et. al.*, 1996).

1.8.2 Lipídios

Ácidos graxos insaturados constituem alvos de ataque de ERO's, dentre as quais está o O_3 . A reatividade dessas espécies com os lipídios induz a peroxidação lipídica, um processo auto catalítico de oxidação que gera uma ampla variedade de produtos cujas implicações biológicas têm sido motivo de estudos intensos. Dentre esses se destacam os hidroperóxidos de lipídios (LOOHs), os produtos primários dessa reação. Apesar desses compostos apresentarem estabilidade em solução, podem ser responsáveis por inúmeros danos *in vivo*, que podem variar desde simples perturbações físicas na bicamada lipídica, que podem colaborar com o

desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Ainda, estudos de luminescência mostram que a peroxidação lipídica é acompanhada por uma fraca emissão de luz (Cadenas *et al.*, 1980), que tem sido atribuída à formação de $O_2 (^1\Delta_g)$ como um dos produtos da decomposição do LOOH (Sugioka e Nakano, 1976; King *et al.*, 1975).

Após a verificação dos efeitos inflamatórios do O_3 em estudos realizados tanto com animais como em seres humanos foi formulada a hipótese de que alterações fisiológicas primárias são resultantes da ação de espécies secundárias, derivadas da reação inicial do O_3 com as biomoléculas alvos (Pryor *et al.*, 1995). Essa abordagem foi considerada devido à persistência dos efeitos do O_3 mesmo horas após o período de exposição. Desse modo, propôs-se que os efeitos tóxicos da exposição ao O_3 não seriam consequências de sua ação direta, e sim ocasionada, ao menos parcialmente, por uma “cascata” de produtos de ozonização lipídica (LOPs – *lipid ozonation products*). Devido ao fato dos fluidos pulmonares apresentarem uma composição que pode chegar a 90% em lipídios insaturados, e também dada a grande concentração dos mesmos nas regiões das membranas.

Essa hipótese foi então verificada quando alguns dos produtos de ozonização lipídica causaram efeitos similares, ou mesmo idênticos, aos observados por inalação direta (Pryor *et al.*, 1995). Ainda, as estruturas desses produtos podem ser previstas através do mecanismo de ozonização de Criegee. (Pryor *et al.*, 1995).

1.8.3 Aminoácidos, peptídeos e proteínas

Uma das propostas para a toxicidade do O₃ deve-se a sua ação oxidante em moléculas de baixo peso molecular contendo grupos como tióis, aldeídos, e aminas, e também por oxidação de proteínas (Mehlman e Borek, 1987).

Peptídeos e proteínas presentes na bicamada lipídica das membranas celulares constituem alvos potenciais para a ação dessa espécie química, de modo que a modificação de proteínas ocorre devido à oxidação das cadeias laterais de seus aminoácidos. (Mustafá *et. al.*, 1983).

Propõe-se que os aminoácidos mais susceptíveis quando expostos ao ozônio foram: cisteína, triptofano, metionina e histidina. Assim, a cisteína e os aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina são oxidados pelo ozônio. A metionina mostra-se altamente reativa. A histidina deveria reagir totalmente com o ozônio, contudo não há evidência desta reação. (Cataldo *et. al.*, 2005).

1.8.4 Poliaminas: Espermina e Spermidina

As espermidina e espermina são poliaminas conhecidas por desativarem o O₂ (¹Δ_g), desta forma foi proposto proteger o DNA contra danos causados por O₂ (¹Δ_g) (Wilson *et. al.*, 1992). Assim, também há evidências da proteção de danos oxidativos do DNA causados por superóxido e radical hidroxila. Além disso, as poliaminas (figura 1.22) são eficazes na diminuição da peroxidação lipídica (Misra *et. al.*, 2003).

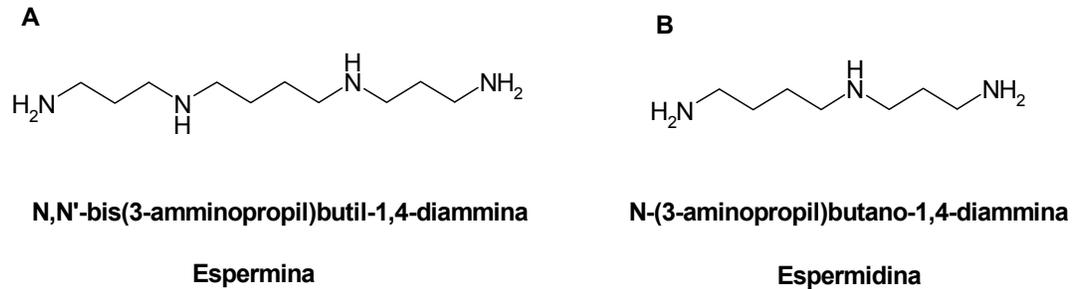


Figura 1.22 – Estruturas das poliaminas – (A) Espermina. (B) Espermidina.

1.9 Ozônio terapia, o O₃ possui propriedades terapêuticas?

A descoberta e uso medicinal do ozônio foram em 1840. O precursor do uso do ozônio foi Werner Von Siemens, que em 1857 construiu o primeiro tubo de indução para a destruição de microorganismos. O primeiro conceito: a característica de um poderoso agente oxidante descartaria a possibilidade que este gás poderia ter um papel terapêutico. Contudo no século XIX o O₃ foi identificado com um potente bactericida, e posteriormente foi utilizado na Primeira Grande Guerra Mundial em tratar soldados alemães com gangrena infectados com *Clostridium*.

A ozonioterapia pode ser realizada por via intravenosa, intramuscular, subcutânea e intra-articular. Pode ainda ser aplicado na forma de autohemotransfusão (extração e ozonização extracorpórea do sangue, que posteriormente é administrado ao paciente) e como tratamento tópico (com gás ou óleo ozonificado) (Veranes *et. al.*, 1999).

A técnica vem sendo aplicada há três décadas e desde então foi proposto que em dose apropriada de ozônio em contato com o sangue (*ex-vivo*) por alguns

minutos ativa diversas vias bioquímicas em eritrócitos, leucócitos e plaquetas sem provocar qualquer toxicidade aguda ou crônica, (Bocci V. A., 2006).

O mecanismo biológico da ação do ozônio: doses fisiológicas desencadeia um preciso estresse oxidativo capaz de ativar processos biológicos com propriedades terapêuticas. Compostos oxidados pelo ozônio são considerados mensageiros fisiológicos sinalizando um estresse oxidativo, o qual induz a resposta adaptativa (Bocci V. A., 2008 e 2009).

Atualmente, a técnica é reconhecida pelo Sistema de Saúde da Alemanha, da Suíça, da Itália, de Cuba, da Ucrânia, da Rússia, da Espanha, da Grécia, do Egito e da Austrália, além de ser praticada em 15 estados dos Estados Unidos. Embora seja pouco conhecida no Brasil, a Associação Brasileira de Ozonioterapia (Aboz) enviou documentos para o Conselho Federal de Medicina, para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e para o Ministério da Saúde, solicitando o reconhecimento da ozonioterapia como um procedimento médico (Ramos, R., 2011).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho tem a finalidade de contribuir com um modelo químico envolvendo a reação da 2'-desoxiguanosina com o ozônio com o objetivo de elucidar o mecanismo envolvidos na geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ e caracterizar os principais produtos formados desta reação.

2.2 Metas

- ✓ Desenvolver uma metodologia para a geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18 a partir do $^{18}O_2 (^3\Sigma_g^-)$.
 - ✓ Estudar a formação do oxigênio molecular singlete marcado [$^{18}O_2 (^1\Delta_g)$] a partir da decomposição do $^{18}O_3$ diretamente ou após a reação com as bases nitrogenadas do DNA e poliaminas.
 - ✓ Estudar os mecanismos e produtos formados na reação do $^{18}O_3$ com a 2'-desoxiguanosina, 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e 8-metóxi-oxodGuo.
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A água deuterada (99,9%) foi obtida junto a Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos).

O gás oxigênio 99,99, uso industrial, da Oxylumi

Azul de metileno, ácido fórmico e ácido sulfúrico foram adquiridos junto a Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

2'- desoxiguanosina, Adenina, Guanina, Timina, Citosina, Timidina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxiadenosina, formiato de amônio e resina chelex® foram obtidos da Sigma. [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina foi obtida da Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Água oxigenada 35 % foi adquirida da Peróxidos do Brasil (Paraná, Brasil).

As soluções foram preparadas em água ultrapura utilizada foi tratada pelo sistema de purificação da Water System Nanopure da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos).

Colunas para HPLC, LC-18 Luna (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm), coluna LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 µm) e coluna semi-preparativa NH₂, Luna, (250 x 10 mm, tamanho de partícula 10 µm) foram obtidas junto à Phenomenex® (Califórnia, Estados Unidos).

Todos os solventes utilizados classificados como grau HPLC (acetonitrila e metanol) e foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

O sal dissódico do captador químico hidrossolúvel, antraceno-9,10-diildietano-2,1-diil disulfato (EAS) foi sintetizado por Paolo Di Mascio.

3.2 Equipamentos

- O O₃ gerado foi obtido a partir do uso de um aparelho ozonizador com capacidade de gerar 200mg/h de O₃ (AquaZone – Red Sea Fish pHarm Ltd. – Eilat, Israel).

- Fluxometro – AALBORG INSTRUMENTS & CONTROLS, INC.

- Balanças da Denver Instrument Company (Estados Unidos) modelos XE-310 e AA-200.

- Espectrofotômetro da Hitachi (Tóquio, Japão) modelo U-3000.

- pHmetro da Corning (Estados Unidos) modelo 320

- Liofilizador Savant (Nova Iorque, Estados Unidos), modelo RVT 4104.

- Agitador Thermomixer Confort da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) modelo 5355.

- Sistema de HPLC da Shimadzu (Tóquio, Japão): 2 bombas LC-20AT, injetor automático SIL-20A, detector de absorvância UV SPD-20AV, detector de fluorescência RF-10AXL, detector de fotodiodos em série SPD-M20A, controlador de Sistema CBM-20A conectado a um computador e software LC-REAL TIME ANALYSIS.

- Sistema de MS composto por espectrômetro de massas Quattro II da Micromass (Manchester, reino Unido), com fonte API z-spray e software Masslynx versão 3.2.

- As medidas de quimiluminescência do O₂ (¹Δ_g) no infravermelho (que ocorre em λ= 1270 nm) serão monitoradas utilizando-se uma fotomultiplicadora, composta por um tubo fotomultiplicador (R5509 – Hamamatsu Photoniks KK – Shizuoka, Japão) sensível à região do infravermelho (800-1400nm), refrigerada a –80°C por

um sistema de refrigeração de N₂ líquido (S600 PHOTOCOOL™, PC176TSCE005 cooler – Products for Research Inc. – MA, EUA). Este sistema encontra-se conectado a uma fonte de alta tensão (High Voltage DC Power Supply Model C3360 – Hamamatsu Photonics KK – Shizuoka, Japão) e um monocromador capaz de varrer as regiões do UV, visível e infravermelho (M300 – Edinburgh Analytical Instruments – Reino Unido).

- Sistema contador de fótons que consiste em um tubo fotomultiplicador sensível na região do vermelho (9203 BM Thor EMI Electron Tubes), refrigerado termoeletricamente a - 20 °C (FACT 50 MKIII). Foi aplicado um potencial de 1150V, e o tubo fotomultiplicador foi conectado a um amplificador (model 1121; Princeton Instruments), o qual transmite o sinal ao computador.

3.3 Geração do O₃

O ozônio foi gerado a partir do uso de ozonizadores, descrito no item 3.2, aparelhos que geram O₃ por meio de descargas elétricas em um fluxo de oxigênio.

3.4 Quantificação do ozônio

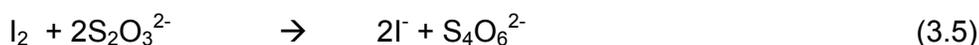
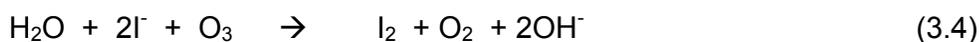
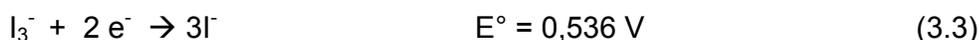
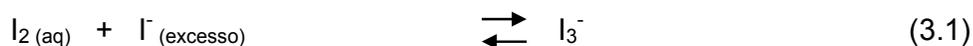
3.4.1 Iodometria

A quantificação foi realizada através da titulação iodométrica, que tem sido usada por muitos anos como uma ferramenta para determinação de soluções aquosas de ozônio, (Gordon *et. al.*, 2000).

O método consiste na oxidação do íon iodeto (I^-) a iodo (I_2) e titulado com tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), onde o I_2 será reduzido a iodeto, o indicador apropriado é uma solução de amido, onde este formará um complexo com iodo, apresentando uma coloração azul. O ponto de viragem pode ser observado quando todo iodo reagir com os íons tiosulfato, a solução passará ser incolor.

A variável deste método consiste na variação do pH, onde a estequiometria depende desta condição e, igualmente, as impurezas podem catalisar as reações com o ozônio interferindo na estequiometria da reação. Outra fonte de erro é a perda do iodo, por volatilidade, onde pode ser contornado adicionando um excesso de íons iodeto, pois estes ficam em equilíbrio formando os íons triiodeto (I_3^-), reação (3.1). Na formação destas espécies (I_3^-) não se altera nem introduz erros mensuráveis no método, porque os potenciais padrões das reações são equivalentes, reações 3.2 e 3.3.

Outra possibilidade é a oxidação de I^- pelo oxigênio do ar, onde pode ser acelerada pela luz. As reações do ozônio com iodeto serão mostradas na reação (3.4) e a seguir com o titulante, reação (3.5).



Com o aumento do pH há a formação do hipiodeto (IO^-), como mostrado na reação (3.6). Estes íons sofrem desproporcionamento para os íons iodato (IO_3^-) e iodeto (reação 3.7), estas reações são extremamente rápidas e favoráveis, sendo assim a espécie iodeto é encontrada em menor quantidade, havendo então um erro na estequiometria da reação.



As soluções a seguir foram preparadas em água Mille-Q, em temperatura ambiente.

a) *Solução de tiosulfato de sódio 0,01M*

Pesou-se 6,00 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e adicionou-se 1 litro de água. Deixou-se a solução em repouso por um dia antes de padronizar, esta solução devido a sua natureza higroscópica é necessário utilizar um padrão primário.

b) *Solução de amido 1% m/v – indicador*

Triturou-se 0,50 g de amido solúvel em 3 mL de água e adicionou-se a suspensão 50 mL de água quente, com agitação constante. Prosseguiu-se o aquecimento até obter uma solução clara. A solução foi filtrada por apresentar uma

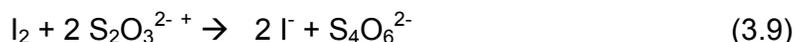
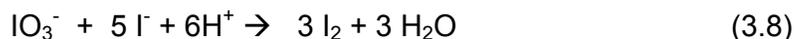
turbidez. Após seu resfriamento foi transferida para um recipiente adequado. A solução foi preparada no mesmo dia de seu uso.

c) Solução de Iodeto de potássio 4% m/v

Pesou-se 8 g de KI e dissolveu-se o sal em 200 mL de água. A solução preparada foi armazenada em um frasco âmbar e guardada sob abrigo da luz. O pH encontrado da solução foi 6,0.

d) Solução de Iodato de potássio (KIO₃) – Padrão primário

Pesou-se 0,11 mg de KIO₃ (MM = 214 g.mol⁻¹), seguiu-se secando-o em estufa a 120°C por duas horas e meia. Transferiu-se a massa pesada para um erlenmayer de 250 mL e dissolveu-se a massa pesada em 50 mL de água, agitou-se a solução até total dissolução. Após a dissolução adicionou-se 2 g de iodeto de potássio e 5 mL de ácido sulfúrico 4 % v/v. Este procedimento foi seguido para cada replicata, imediatamente antes da titulação com o tiossulfato de sódio (reações 3.8 e 3.9).



De acordo com a estequiometria das reações 8 e 9, temos: o número de mol de I₂ (n_{I₂}) é três vezes o número de mols de IO₃⁻ (n_{KIO₃}) e o número de mols de S₂O₃²⁻ é duas vezes o número de mols de I₂.

3.4.2 Análise espectrofotométrica do UV- visível

Para as medidas da concentração de ozônio por espectrometria do UV-visível. Primeiramente adquiriu-se um espectro no intervalo de 190 a 450nm, assim verificou-se o comprimento de onda em máxima absorbância, e a absorvidade molar da espécie. Utilizou-se cubeta de 1 cm de quartzo, 1 mL de solução contendo ozônio a 25°C. Como é estabelecida pela Lei de Beer, a absorbância é proporcional à concentração da espécie absorvente. As concentrações das soluções de ozônio foram aferidas utilizando $\epsilon = 2900 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $\lambda = 259 \text{ nm}$.

3.4.3 Método utilizado para a quantificação do ozônio no fluxo de 6 e 8 mL a 25 e 50% do potencial de redução do ozonizador.

Utilizou-se 4 mL da solução de KI 4%, borbulhou-se N_2 para retirada do oxigênio da solução em um frasco com um septo envolto em papel alumínio. A solução de O_3 foi preparada borbulhando O_3 por um minuto em água a baixa temperatura ($\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$). Transferiu-se 3 mL da solução contendo ozônio para um erlenmeyer de 50 mL, seguiu juntando 4 mL da solução de KI e por fim adicionou-se 1 mL de indicador (amido) e titulou-se com uma bureta de 5 mL (1/20). Os experimentos foram feitos em quadruplicata.

Da solução preparada acima foi transferido 1 mL da solução contendo ozônio e mediu-se a absorbância em 259 nm, possuindo uma absorvidade molar de $2900 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Utilizou-se o mesmo procedimento para todas as medidas de

concentração, variando somente o fluxo de gás e a capacidade do potencial do ozonizador.

3.5 Decomposição do ozônio por espectrometria UV-Visível

O ozônio por ser uma espécie instável e com um elevado potencial padrão o torna um poderoso agente oxidante, sendo assim sua decomposição acontece em solução aquosa e qualquer impureza pode catalisar a sua decomposição. Devido a essas características foi avaliada a sua decomposição durante 15 minutos em temperatura ambiente utilizando um espectrofotômetro.

As soluções saturadas avaliadas consistem nos seguintes experimentos:

- i. Ozônio em solução aquosa 1 mL de volume.
- ii. Ozônio em solução em 0,9 mL de H₂O com adição de 0,1mL de H₂SO₄ - pH 2,0
- iii. Ozônio em solução em 1,0 mL de água deuterada (D₂O)
- iv. Ozônio em solução em 0,9 mL D₂O com adição de 0,1 mL de H₂SO₄ - pH 2,0.
- v. Ozônio em solução em 0,9 mL de H₂O com adição de 0,1 mL de álcool *tert* – butílico.

As soluções saturadas de ozônio foram preparadas utilizando 100% da capacidade do ozonizador durante 20 minutos em baixa temperatura (aproximadamente 4°C – banho de gelo) para permitir uma maior solubilidade do

gás, o O₃ segue a lei de Henry. Utilizou-se cubeta de 1 cm de quartzo com tampa, 1mL de solução. As medidas espectrofotométricas utilizadas estão relacionadas no item 3.4.2.

3.6. Sínteses: Endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno; 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e Diastereoisômeros da Espiroiminodihidantoína.

3.6.1 Foto-oxidação do 1,4-dimetilnaftaleno

A síntese do endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno foi preparada baseada nos procedimentos experimentais descritos por Wassernan e Larsen, 1972 e Di Macio, 1992, com algumas modificações. O intuito da síntese é utilizá-lo como padrão da fonte química da geração de O₂ (¹Δ_g) nas análises de luminescência e oxidação de compostos, a reação da formação do endoperóxido pode ser vista na figura 3.1.

A foto-oxigenação foi conduzida em um Dewar encamisado que possui uma lâmpada de halogênio. Preparou-se uma solução com concentração de 1 mg.mL⁻¹ de azul de metileno em diclorometano com volume total de 60 mL, seguiu-se adicionado 4.0mL de 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) com constante agitação e mantendo a reação resfriada a -15°C e mantendo um constante fluxo de oxigênio molecular. A reação de fotossensibilização foi acompanhada por TLC de modo que seis horas de reação foram suficientes para um bom rendimento. A partir da síntese completa o volume da reação foi rotaevaporada. O azul de metileno foi separado em uma coluna de sílica empacotada a baixa temperatura com diclorometano. Depois secou-se produto final, DMNO₂, por rotaevaporação.

Por fim o produto foi recristalizado em pentano e éter etílico na proporção 1:1.

A concentração das soluções de DMNO₂ foi determinada por espectrofotometria no UV, através da cinética de termólise a 37°C, sendo a absorvância medida da solução a 288 nm é equivalente à absorção do anel naftaleno ($\epsilon = 7780 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$). Assim, no início espera-se que não haja absorção, pois teríamos 100 % de conversão em endoperóxido. Ao decorrer da termodecomposição, mede-se a absorção do anel naftalênico, pois o endoperóxido foi destruído (Pierlot *et. al.*, 2000a).

Foi acompanhada a emissão de luz da transição monomolecular ($\lambda = 1274 \text{ nm}$) do O₂ (¹ Δ_g) para a termólise do endoperóxidos de naftaleno. As cinéticas de termólise do DMNO₂ foram obtidas durante a incubação da solução 40 mM do endoperóxido a 37°C e 60°C.

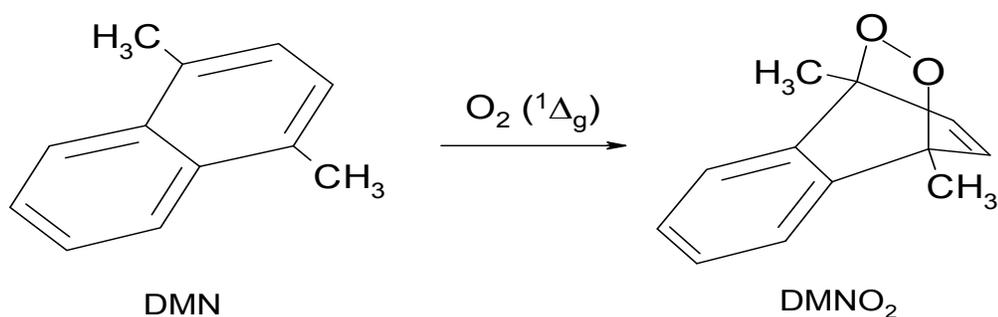


Figura 3.1 – Foto-oxidação do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) para gerar o endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO₂).

3.6.2 Sínteses da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

A síntese da 8-oxoGuo foi feita com a finalidade de se obter quantidades maiores do produto para o estudo da quimiluminescência e caracterização dos produtos de oxidação nas reações com ozônio. O procedimento adotado foi baseado nos trabalhos de Lin e Sartorelli (1984), Ravanat (1992) e Martinez G.R (2003).

A síntese foi realizada em três etapas, a 8-bromo-2'-desoxiguanosina (8-BrdGuo) é um produto intermediário para a síntese da 8-(benziloxi)-2'-desoxiguanosina que por sua vez é o produto intermediário da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, o produto final. A figura 3.2 mostra a rota e os principais reagentes envolvido nessa síntese.

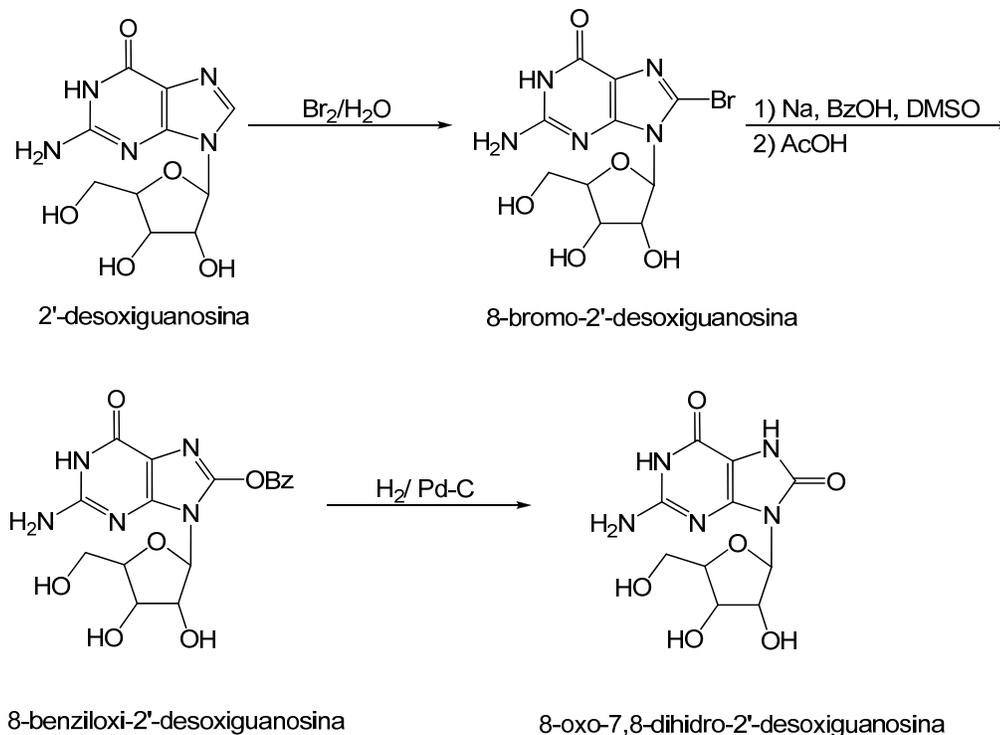


Figura 3.2 – Rota da síntese da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.

3.6.2.1 Síntese da 8-Bromo-2'-desoxiguanosina

O procedimento adotado foi baseado nos trabalhos de Lin e Sartorelli (1984), Ravanat (1992) ; Martinez G.R (2003) com algumas modificações. Dissolveram-se 3,9 g de dGuo (14,6 mmol) em 100 mL de água, em seguida foram adicionados 20 mL de água saturada de bromo (Br_2) em alíquotas de 2 mL sob agitação, foi feita checagem do pH , uma vez que este deveria ficar em torno de 7. A seguir foram adicionados 800 μL de Br_2 em alíquota de 100 μL , após 15 minutos de cada adição o pH foi neutralizado com NaOH 2,5 M e aguardavam-se mais 30 min para a próxima adição. Ao término das adições foram acrescentados 2,5 mL de uma solução 2 M de bissulfito de sódio. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com água fria e acetona fria, após recristalizou-se com água quente.

A identificação e a formação da BrdGuo foi acompanhada utilizando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda 260 nm e monitorado por PDA programado para a detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm. A coluna utilizada foi LC-C18 (250 x 5 mm, 5 μm) Luna da *Phenomenex*® com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. A separação foi feita de modo isocrático com fase móvel constituída de 10% ACN e 90 % H₂O.

3.6.2.2 Síntese da 8- (benziloxi)-2'-desoxiguanosina

Em um balão de 100 mL, equipado com condensador de refluxo, adicionou-se DMSO seco e 8 mL de álcool benzílico (BzOH), seguiu-se adicionando 0,22 g de sódio metálico. A partir deste ponto esperou-se por algumas horas a formação do

benzoato de sódio e continuou-se adicionando 1,0 g de BrdGuo, obtida na primeira etapa da síntese. Após atingir a temperatura de 65 °C deixou-se refluxando durante 20 horas. O aquecimento foi feito com banho de silicone.

Depois do término do refluxo esperou-se resfriar a solução a temperatura ambiente e adicionou ácido acético glacial. Acrescentou-se lentamente a solução obtida em 500 mL de éter etílico gelado, observou-se a formação de um óleo. Conservou-se em 6° C por um dia, após filtrou-se e secou-se o produto a vácuo e recristalizou em metanol quente, a seguir filtrou e secou a vácuo.

3.6.2.3 Síntese da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

O produto sintetizado na etapa anterior foi utilizado para prosseguir com as próximas etapas. A massa obtida foi de 0,48 g de 8-(benziloxi)-2'-desoxiguanosina que foi dissolvida em 20 mL de MeOH e 20 mL de H₂O, foi hidrogenada a 50 psi em temperatura ambiente na presença de 0,72 g de 10 % Pd/C (catalisador) por 20 horas. O catalisador foi eliminado por filtração a vácuo com celite. O solvente foi seco em um rotaevaporador.

A identificação e a formação da 8-oxo-2'-desoxiguanosina foi acompanhada utilizando o equipamento de HPLC com o detector UV programando para detecção em comprimentos de onda 260 nm e monitorado por PDA programado para a detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm. A coluna utilizada foi LC-C18 (250 x 5 mm, 5µm) da *Phenomenex*® com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹. A separação foi feita de modo isocrático com fase móvel constituída de 10 % ACN e 90 % H₂O.

3.6.2.4 Purificação da 8-oxodGuo por HPLC.

Para a obtenção do produto final obtido na síntese foi feita uma separação por HPLC com o detector UV programando para detecção em comprimentos de onda 230 e 254 nm e monitorado por PDA programado para a detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400nm.

Posteriormente utilizou-se uma coluna semi - preparativa LC-NH₂ luna (250 x 10 mm, 5 µm) da *Phenomenex*®. A separação foi feita com um fluxo de 3,8 mL.min⁻¹ de forma isocrática, sendo a fase móvel constituída de 70 % de metanol em H₂O.

As frações coletadas, correspondentes ao produto purificado foi rotoevaporado, com adições sucessivas de MeOH com a intuito de arrastar a H₂O contida no sistema de purificação. Após este procedimento obteve-se um sólido branco.

As amostras coletadas foram dissolvidas na fase móvel e analisadas em HPLC num sistema, nos mesmos parâmetros de detecção citados acima, mudando a coluna para LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Phenomenex*®, analítica. A identificação foi feita com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, com um gradiente partindo de 0,5 % de MeOH e formiato de amônio 10 mM a 10 % de MeOH em 16 min, 20 % em 20 min e 50 % de MeOH em 25 min permanecendo 10 min em 50 % MeOH, em 35 minutos a 20 % de MeOH e retornando a 0,5 % em 40 minutos e mantendo por mais 7 minutos para estabilização da coluna para que a próxima injeção fosse realizada.

3.6.2.5 Análise da 8-oxodGuo por HPLC acoplado ao espectrômetro de massa.

A 8-oxodGuo purificada e rotoevaporada, além de confirmar a sua identidade por HPLC, posteriormente foi analisada pelo sistema de HPLC-MS/MS, espectrômetro de massas Quattro II da Micromass, descrito no item 3.2, no modo electrospray positivo (ESP+) com temperaturas da fonte e de dessolvatação respectivamente de 100 e 200 °C. A voltagens do cone e energia de colisão eram de 20 V e 10 eV, no modo SRM m/z 284 \rightarrow 168. O sistema HPLC foi utilizado detector UV/Vis em $\lambda = 254$ nm, com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, com um gradiente partindo de 0,5% de MeOH e formiato de amônio 10 mM a 10% de MeOH em 16 min, 20 % em 20 min e 50% de ACN em 25 min permanecendo 10 min em 50 % MeOH, em 35 minutos a 20 % de MeOH e retornando a 0,5 % em 40 minutos e mantendo por mais 7 minutos.

3.6.3. Síntese, purificação e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína-2'-desoxirribose.

A solução padrão dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) foi obtida pela fotossensibilização da dGuo com azul de metileno (AM) (RAVANAT e CADET, 1995; NILES *et. al.*, 2001; Martinez, 2003). A reação foi conduzida a temperatura constante a 15°C, utilizando um banho. Em um balão, 5 mL de solução 10 mM de dGuo contendo 10 μ L de uma solução 10 mg.mL⁻¹ de MB é irradiada com uma lâmpada de 500 W com filtro “cut-off” 590 nm, sob fluxo de oxigênio constante

por 5 horas. Nesse sistema manteve a lâmpada a uma distância de aproximadamente 15 cm do balão contendo a solução. A cada hora retirou-se uma alíquota de 10 μL , diluindo-a para 100 μL e injetou-se no HPLC para o monitoramento do consumo de dGuo e a formação de dSp tão bem como outros produtos formados pela fotossensibilização do tipo I.

Portanto, a detecção dos diastereoisômeros da dSp foi feita por HPLC como descrito por Martinez *et. al.*, 2002, com algumas modificações, usando o equipamento de HPLC e detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm para a dSp e 254 nm para a dGuo. A coluna usada foi a LC-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da Phenomenex®. Utilizou-se um padrão dSp para comparação.

Por fim, a purificação foi feita por HPLC, como descrito acima, mudando apenas a coluna para LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μm) da Phenomenex®, de forma isocrática com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel constituída por 0,5 % de ACN e H₂O.

As frações coletadas, correspondentes aos diastereoisômeros da dSp, foram rotoevaporadas e liofilizadas.

A concentração foi aferida por medida no espectrofotômetro usando, nesse caso, o coeficiente de extinção em $\lambda = 230 \text{ nm}$ (5240 L. cm⁻¹.mol⁻¹) publicado para os diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo (Ravanat e Cadet, 1995).

A dSp liofilizada foi analisada por espectrometria de massas no modo *electrospray* positivo com detecção no modo SRM m/z 300 \rightarrow 184. Os parâmetros utilizados como temperaturas da fonte e de dessolvatação 100 e 150°C, respectivamente e voltagem do cone energia de colisão de 12V e 12eV respectivamente acoplado HPLC com as seguintes especificações: coluna LC-18 (250

x 4,6 mm, 5 μm) da Phenomenex®. A separação foi feita com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ de forma isocrática com fase móvel de 85% ACN e formiato de amônio 25 mM.

3.7 Medidas da emissão monomolecular do O₂ (¹ Δ_g) na reação de O₃ com 2'-desoxiguanosina.

As medidas de emissão de luz no infravermelho próximo foram realizadas com o equipamento descrito no item 3.2.

As primeiras investigações foram obtidas utilizando o seguinte sistema: uma solução de ozônio 0,15 mM com volume de 1,35 mL em água deuterada foi colocada em uma cubeta, e 150 μL de solução de 2'-desoxiguanosina 10 mM em D₂O, volume inicial, foi injetada manualmente através de um tubo de polietileno a 25°C, com constante agitação.

O composto azida de sódio (NaN₃), supressor físico do oxigênio singlete, foi misturado 5 μL de N₃⁻ 10mM, com concentração final de 1mM, na solução de dGuo 10 mM, essa mistura foi injetada manualmente a solução de ozônio contida na cubeta. Com o intuito de verificar o mesmo efeito de supressão física, a água foi utilizada como solvente.

Para controle, injetou-se 150 μL de N₃⁻ 10 mM, com concentração final de 1 mM em uma solução de ozônio de 0,15 mM.

Posteriormente as análises foram realizadas variando a concentração de dGuo para verificar se a geração de O₂ (¹ Δ_g) é dependente da concentração do reagente. Com este propósito os experimentos foram realizados da seguinte forma:

uma solução com volume de 1,8 mL 0,15mM de O₃ contida na cubeta juntamente com a adição de 0,2 mL de dGuo nas seguintes concentrações finais: 0,15; 1,5; 3,0; 4,5 ; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5 μM, as análises foram conduzidas em água deuterada.

Todas as soluções nestes procedimentos exceto quando mencionado o solvente foi utilizado D₂O. As medidas de emissão foram realizadas em uma cubeta de quartzo para fluorescência (1×1 cm, Sigma).

As soluções saturadas de ozônio foram obtidas utilizando 100 % da capacidade do ozonizador durante 20 minutos em baixas temperaturas (aproximadamente 0° C). As concentrações de O₃ foram aferidas por espectroscopia do UV-Visível.

- i. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 1,35 mL e manualmente injetou-se 0,150 mL de dGuo 10 mM.
- ii. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 1,35 mL e manualmente injetou-se uma mistura de 0,150 mL de dGuo 10 mM com 15 μL N₃⁻ 10mM.
- iii. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 0,90 mL e manualmente injetou-se 0,10mL de dGuo 1,5 mM; 0,75 mM; 0,5 mM; 0,375 mM; 3,0 mM; 4,5 mM ou 6,0 mM.

3.8 Efeito do pH nas medidas da emissão monomolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação de O₃ com os nucleosídeos isolados e seus derivados e poliaminas.

Esta sequência de experimentos foi efetuada utilizando o seguinte sistema: uma solução de ozônio 0,15 mM (7,2 ppm) em D₂O com volume de 0,9 mL foi

adicionada em uma cubeta e 100 μ L da solução de um substrato 5 mM em D₂O, volume inicial, foi injetada manualmente através de tubo de polietileno a 25° C, com agitação constante.

O Efeito do pH (2,0, 6,0 e 9,0) na intensidade da emissão do O₂ (¹ Δ_g) foi testado, as soluções utilizadas para acidificar e basificar o meio reacional, H₂SO₄ (0,1M) e NaOH (0,1M).

As soluções saturadas de ozônio foram obtidas utilizando 100 %, (200 mg/h) da capacidade do ozonizador durante 20 minutos em baixas temperaturas (aproximadamente 4° C). As medidas de emissão foram realizadas em uma cubeta de quartzo para fluorescência (1×1 cm, Sigma).

3.8.1 Medidas da emissão monomolecular do O₂ (¹ Δ_g) na reação de O₃ com nucleosídeos.

- i. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,10 mL de timidina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxiadenosina ou 2'-desoxiguanosina 5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0.
-

3.8.2 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com bases nitrogenadas.

- ii. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,10 mL de timina, citosina, adenina ou guanina 5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0.

3.8.3 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com xantina.

- iii. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,10 mL de xantina 5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0.

3.8.4 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com a 8-oxodGuo.

- iv. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,10 mL de 8-oxodGuo 5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0.
-

3.8.5 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com as poliaminas: espermina e espermidina.

As medidas de luminescência das poliaminas seguem o mesmo modelo experimental já mencionado no item acima. Partiu-se de 2,5 mM de concentração das poliaminas de modo que a concentração final seja 0,125 mM.

O efeito do pH também foi estudado na intensidade de emissão para a espermina (2,0; 6,0 e 13) e espermidina (2,0; 8,0 e 13), as soluções utilizadas para acidificar e basificar foram H_2SO_4 e $NaOH$. Como supressor físico do O_2 ($^1\Delta_g$), utilizamos água.

- i. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,1 mL de espermina 2,5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 13,0 em H_2O ou D_2O .
- ii. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,1 mL de espermidina 2,5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 8,0; (iii) pH 13,0 em H_2O ou D_2O .

3.9 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) da reação da dGuo ozonizada após a injeção de com Ce^{4+} .

As medidas de emissão de luz foram adquiridas com o equipamento descrito no item 3.2. A cinética foi monitorada durante a injeção de 0,150 ml de uma solução de Ce^{4+} 100 mM em D_2O por outro tubo de polietileno, em uma cubeta com solução de dGuo 5mM em D_2O , ozonizada.

As soluções contidas na cubeta de dGuo foram ozonizadas por 5 minutos, em fluxo de 6,0 mL / min com 118 mg/h de ozônio.

Avaliou-se a emissão de luz com a injeção do Ce^{4+} em diferentes pH 2,0, 6,0 e 9,0 das soluções ozonizadas de dGuo como descrito acima. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Soluções de H_2SO_4 0,1M e NaOH 0,1M em D_2O .

- i. A solução da reação de dGuo ozonizada por 5 minutos foi adicionada na cubeta com volume de 1,35 mL e manualmente injetou-se 0,150 mL de dGuo Ce^{4+} 100 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0.
- ii. A solução da reação de dGuo ozonizada por 5 minutos foi adicionada na cubeta com volume de 1,35 mL e manualmente injetou-se 0,350 mL de dGuo Ce^{4+} 100 mM.

3.10 Quimiluminescência da decomposição do ozônio

Estudo da quimiluminescência foi realizado utilizando uma fotomultiplicadora com detecção no infravermelho próximo, 1270 nm, item 3.2. As medidas do decaimento foram evidenciadas na decomposição do ozônio em D_2O .

O espectro de emissão de luz monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) foi registrado em uma fotomultiplicadora sensível a região do infravermelho (800-1400 nm). O espectro de emissão de luz no infravermelho foi adquirido durante a decomposição do ozônio em D_2O a temperatura ambiente.

As medidas de emissão de luz no visível foram realizadas com o equipamento descrito no item 3.2. A emissão de luz foi determinada com filtros “cut-off” 570 nm (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA) colocados entre a cubeta e a fotomultiplicadora.

As soluções de ozônio foram feitas utilizando H₂O e D₂O e colocadas na cubeta com volume de 1 mL, a cubeta foi revestida com papel alumínio para aumentar a focalização dos fótons gerados na reação de decomposição. As medidas de emissão foram realizadas em uma cubeta de quartzo para fluorescência (1×1 cm, Sigma).

3.11 Medidas da emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação de O₃ com 2'-desoxiguanosina

As medidas de emissão de luz no visível foram realizadas com o equipamento descrito no item 3.2. A emissão de luz de determinados comprimento de onda foi obtido com filtro “cut-off” (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA) colocados entre a cubeta e a fotomultiplicadora.

Como padrão de emissão do O₂ (¹Δ_g), utilizou-se uma fonte química, peróxido de hidrogênio e hipoclorito. As concentrações de H₂O₂ e hipoclorito foram determinados através da medida de absorvância 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 reação 1.13.

As soluções de ozônio foram colocadas em uma cubeta em frente à fotomultiplicadora, a porta foi aberta e em seguida uma solução de dGuo foi injetada na cubeta, sob agitação constante. As soluções de ozônio foram preparadas como já descrito nos itens anteriores com concentração de 0,15 mM.

Experimentos com uma cubeta de 1 mL e com filtro de “cut-off” 570nm

- i. Na cubeta foi adicionado H_2O_2 com concentração inicial de 50 mM com um volume de 0,90 mL e manualmente injetou-se 0,1 mL OCl^- com concentração final de 50mM.
- ii. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,1 mL de dGuo 10 mM.

Experimentos com uma cubeta de 1 mL e sem filtro “cut-off”.

- iii. Na cubeta foi adicionado H_2O_2 com concentração inicial de 50 mM com um volume de 0,90 mL e manualmente injetou-se 0,1 mL OCl^- com concentração final 50 mM.
- iv. A solução de O_3 foi adicionada na cubeta com volume de 0,9 mL e manualmente injetou-se 0,1mL de dGuo 10 mM.

Analizou-se também a quimiluminescência na região vermelha do espectro, por meio de uma cubeta 39 mm x 10 mm x 58 mm. Proporcionando um maior volume de aproximadamente 6 mL, a mesma foi envolta em papel alumínio com a superfície reflexiva voltada para dentro da cubeta, assim obtemos um maior rendimento da emissão dos fótons.

As soluções de O_3 foram adicionadas no interior da cubeta com concentração de 0,15 mM e volume de 4 mL e 1 mL de dGuo 10 mM foi injetada manualmente na

cubeta com constante agitação. O pH da solução do substrato foi variado entre 2,0 e 9,0 com adição de H₂SO₄ e NaOH. Todos os experimentos foram feitos em H₂O exceto quando mencionado foi utilizado D₂O.

- i. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 4,0 mL e manualmente injetou-se 1,0 mL de dGuo 10 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 9,0 em H₂O ou D₂O.

3.12 Medidas da emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação de O₃ com as poliaminas espermina e espermidina.

As medidas de emissão de luz na região do visível foram realizadas com a espermina e espermidina. A cinética de emissão foi realizada através da injeção de 1 mL de solução 2,5 mM das poliaminas em H₂O através de um tubo de polietileno em 4 mL de uma solução de ozônio (concentração 0,15 mM) em uma cubeta de quartzo de 35mm x 5mm x 56 mm, com agitação. O efeito do pH e do solvente também foi monitorado, utilizando o mesmo procedimento. Todos os experimentos foram feitos em H₂O exceto quando mencionado foi utilizado D₂O.

- i. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 4,0 mL e manualmente injetou-se 1mL de espermina 2,5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 6,0; (iii) pH 13,0 em H₂O ou D₂O.
-

- ii. A solução de O₃ foi adicionada na cubeta com volume de 4,0 mL e manualmente injetou-se 1mL de espermidina 2,5 mM em (i) pH 2,0; (ii) pH 8,0; (iii) pH 13,0 em H₂O ou D₂O.

3.13 Análise dos produtos formados da oxidação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com o ¹⁶O₃.

Os experimentos foram primeiramente realizados em uma solução de dGuo ou 8-oxodGuo 5mM em H₂O ou D₂O.

Posteriormente estudou-se o efeito do pH (2,0 ; 6,0 e 9,0), uma solução de dGuo ou 8-oxodGuo 5mM em H₂O e D₂O e em seguida ozonizou por 5 minutos com fluxo de 6 mL por minuto a 140 mg de O₃ por hora.

Finalmente avaliamos a contribuição de alguns solventes orgânicos na medida em que foi possível a solubilização da dGuo e 8-oxodGuo. Assim sendo as soluções foram feitas em metanol e a partir destas soluções preparou-se uma mistura com outros solventes respeitando sempre as mesmas proporções, as seguintes composições foram analisadas:

Metanol 100%; Metanol 25% em 75% ACN deuterada e H₂O 50% ou D₂O em 50% álcool *tert* - butílico. Estes arranjos experimentais foram submetidos à ozonização por 5 minutos em um fluxo de 6 mL por minuto com 140 mg por hora de O₃ a temperatura ambiente.

Analisamos a formação dos produtos gerados das reações de dGuo e 8-oxodGuo 5 mM pelo tempo de ozonização, deste modo a cinética foi realizada

retirando alíquotas nos seguintes tempos: 30 segundos, 1, 2,3,4,5,8,10,15,20,e 25 minutos.

Os produtos oxidados gerados das reações com ozônio foram analisados utilizando um sistema de HPLC Agilent constituído por um autoinjeter Agilente 1200 High performance resfriado a 4 °C, Bomba Agilent 1200 Binary Pump SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 24° C e um *software* Analyst 1.4.2. Acoplado em um espectrômetro de massas triplo *quadrupolo* sendo o terceiro *quadrupolo* uma câmara híbrida *ion trap* linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems).

Os parâmetros foram otimizados para a fonte *eletrospray* no modo positivo, sendo que, *curtain gas* (fluxo de gás que impede entrada de gotículas de solvente) foi de 15 psi, temperatura 600° C, gás de nebulização e gás auxiliar 50 psi, voltagem aplicada no spray de íons na fonte *Turbo Ion Spray* 5000 V, gás de colisão médio.

Para a detecção específica das diferentes espécies moleculares utilizou-se o modo SRM no espectrômetro de massas. O qual é feita a detecção de uma transição específica da molécula, selecionando o íon precursor no primeiro analisador (Q1) e após fragmentação provocada na câmara de colisão, o íon produto é monitorado no segundo analisador (Q3).

A metodologia de separação por HPLC foi desenvolvida de forma diferente para modificações estudadas, as quais serão relacionadas nos próximos itens, lembrado que as condições do espectrômetro de massas só serão citadas novamente se houver modificação.

3.13.1. Caracterização e detecção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina gerada na reação a 2'-desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$.

A 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina foi analisada utilizando o sistema HPLC acoplado ao espectrômetro de massas. Para as análises da 8-oxodGuo o sistema HPLC foi composto por uma coluna de fase reversa Luna LC-18 (150 mm 4.6 mm, tamanho de partícula 5 μm , Phenomenex®, CA), com fase móvel acetonitrila (ACN) e formiato de amônio 25 mM, utilizando um gradiente partindo de 3 % MeOH mantendo linear por 10 min, indo a 15 % em 6 min, a 25 % em 4 min e a 50 % em 5 min, mantendo a 50 % por 5 min e retornando a 15 % em 5 min e finalmente a 3% em 3 min e mantendo a 3 % por 7 min para estabilizar a coluna. Com fluxo de 0,6 mL por minuto com temperatura do forno de coluna a 24° C.

As amostras foram monitoradas no modo SRM e a transição m/z escolhidas para $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi $284 \rightarrow 168$ e o espectro de massas do íon precursor foi adquirido na faixa de 40 a 400 m/z , com os seguintes parâmetros: potencial de entrada foi fixado a 10 V, energia de colisão (CE) foi de 18 V, o potencial de colisão na saída (CXP) de Q2 foi de 10 V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate*, *declustering potencial (DP)* em 50 V.

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados de forma a se ter a melhor aquisição, esses parâmetros encontrados foram os mesmos para todas a modificações analisadas.

3.13.1.1 Análise da fragmentação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina gerada na reação de 2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Os fragmentos do íon produto gerado pela clivagem da ligação *N*-glicosídica após a fragmentação provocada do íon precursor m/z 284 foi analisado no sistema HPLC/MS/MS com os seguintes parâmetros de fragmentação do íon produto: EP foi mantida em 10 V, CE 25 V, CXP 12 V e DP 50 V, para m/z 168. Desta forma 10 μL foi injetado neste sistema.

3.13.2. Caracterização e Detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína gerados na reação de 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Os produtos foram inicialmente separados em uma coluna analítica Luna NH_2 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Phenomenex*® de forma isocrática com fluxo de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, sendo a fase móvel constituída por 80 % de MeOH em uma solução 10 mM de formiato de amônio, com detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm.

A dSp foi analisada no espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo e detectada por SRM. A transição m/z escolhida para $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi $300 \rightarrow 184$ e o espectro de massas do íon precursor foi adquirido na faixa de 40 a 400 m/z .

3.13.2.1 Análise da fragmentação de espiroiminodihidantoína gerada na reação de 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Para o estudo das fragmentações dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína utilizou-se o sistema HPLC/MS/MS descrito no item 3.13.2, com os mesmos parâmetros para a fragmentação do íon precursor das transições analisadas. Para as fragmentações do íon produto gerado pela perda de 116 unidades de massas equivalente à quebra da ligação *N*-glicosídica.

3.13.3 Caracterização e detecção de imidazolona e oxazolona geradas na reação a 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Para análises dos produtos de oxidação gerado, inicialmente foram separados em uma coluna analítica Luna NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Phenomenex*® de forma isocrática com fluxo de 0.8 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel constituída por 75 % de ACN em uma solução 10 mM de formiato de amônio, com detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. Desta forma 5 μL foi injetado no sistema HPLC/MS.

As transições específicas para cada íon precursor [M + H]⁺ foram monitoradas no modo SRM com m/z 229 → 113 para imidazolona e 247 → 131.

3.13.4 Caracterização e detecção de X_1 e X_2 gerados na reação de 2'-desoxiquanosina e $^{15}\text{N}_5$ -2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Os produtos X_1 e X_2 (isômeros ainda não identificados) foram analisados através de um espectrômetro de massas com ionização *eletrospary* no modo positivo e detectada por SRM. A transição m/z escolhida para $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi $300 \rightarrow 184$ e o espectro de massas do íon precursor foi adquirido na faixa de 40 a 400 m/z .

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados de forma a se ter a melhor aquisição, para o potencial de entrada (EP) foi fixado a 10V, energia de colisão (CE) foi de 17 V, o potencial de colisão na saída (CXP) de Q2 foi de 12V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate, declustering potencial* (DP) em 50 V.

3.13.4.1 Análise da fragmentação da X_1 e X_2 gerados na reação a 2'-desoxiquanosina e $^{15}\text{N}_5$ -2'-desoxiquanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Os parâmetros utilizados para as fragmentações do íon produto referentes à clivagem da ligação *N*-glicosídica de X_1 e X_2 foram EP 10 V, CE 20 V, CXP 12 V e DP 50 V, para m/z 184. Desta forma 30 μL foi injetado no sistema HPLC acoplado a espectrometria de massas.

3.14 Análise dos produtos formados na reação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina (MeOdGuo) com $^{16}\text{O}_3$.

A ozonização da 8-MeOdGuo em D_2O ou H_2O por 5 minutos com fluxo de 6 mL por minuto a 140mg por hora de O_3 a temperatura ambiente levou à formação dos produtos dlz, dOz e os diastereoisômeros da dSp contendo o grupo metoxi (8-MeOdSp). A presença desses produtos foi detectada pelas análises de HPLC-MS/MS, usando a função perda neutra de 116 unidades com as transições com $m/z = 229, 247$ e 314 .

As amostras foram injetadas no equipamento de HPLC Agilent, com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 230 nm. A detecção no espectrômetro de massas foi feita no modo *eletronspray* positivo em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems).

Para separação foi usada a coluna LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) da Phenomenex® e um gradiente linear partindo de 3 % MeOH em solução 10 mM de formiato de amônio por 10 min e indo a 15 % MeOH em 6 min, a 25 % em 4 min e a 50 % em 5 min, mantendo a 50 % por 5 min e retornando a 15 % em 5 min e finalmente a 3% em 3 min e mantendo a 3% por 7 min para estabilizar a coluna com fluxo de fase móvel de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A MeOdGuo foi incubada com DHPNO_2 como padrão da formação dos produtos gerados pelo oxigênio singlete e analisada da mesma forma.

3.15 Geração do ozônio isotopicamente marcado no átomo de oxigênio molecular-18.

Esse sistema foi desenvolvido com a finalidade de gerar ozônio isotopicamente marcado a partir do $^{18}\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$, em um sistema fechado baseado em um sistema proposto por (Subke *et. al.*, 2009). Este sistema é composto por: cilindro de $^{18}\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$, bomba peristáltica, ozonizador, agitador bomba a vácuo e conexões. A figura 3.2 ilustra a montagem do sistema desenvolvido, figura 3.2.

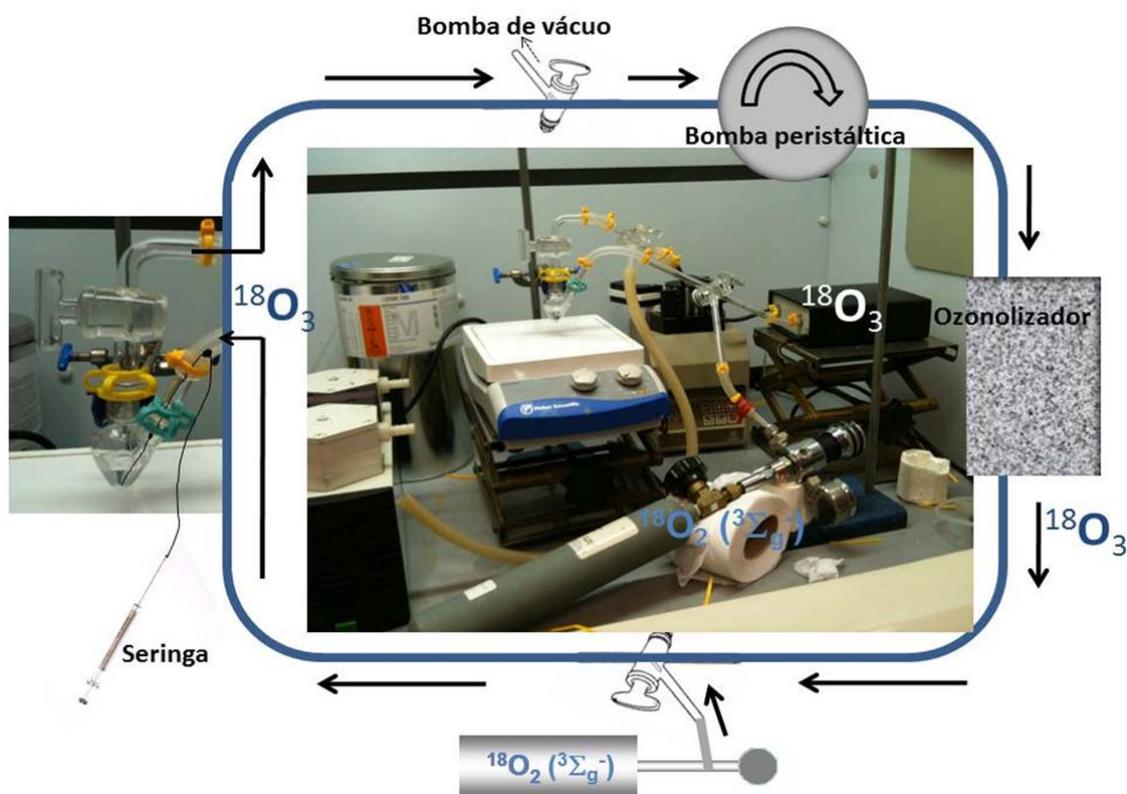


Figura 3.2 - Sistema de geração de ozônio marcado isotopicamente com átomo de $^{18}\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$.

3.15.1. Captação química do $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) gerado na reação da 2'-desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$ utilizando EAS e gerando EAS $^{18}\text{O}_2$.

O $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) gerado durante a reação da dGuo com $^{18}\text{O}_3$ ($^3\Sigma_g^-$) foi monitorado utilizando-se o captador antracênico químico hidrossolúvel EAS.

Uma solução de 3 mL de EAS 8 mM em D_2O foi misturado a 1 mL de uma solução de dGuo 5 mM em D_2O , a mistura foi transferida para um balão de 10 mL com duas bocas, sendo que uma delas é um borbulhador. O oxigênio molecular dissolvido na solução foi removido através de 5 etapas sucessivas de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento após vácuo. Após essa etapa o sistema foi alimentado por $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$) de forma que a pressão igualou se aproximadamente a 1 atmosfera. Desta forma o fluxo de $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$) passou através do ozonizador com auxílio de uma bomba peristáltica, assim gerando $^{18}\text{O}_3$, a reação prosseguiu-se por 1 hora com constante agitação. O balão foi revestido com papel alumínio, pois o EAS é fotossensível. A reação foi realizada em temperatura ambiente.

Ao decorrer da reação uma alíquota de 20 μl da mistura de reação foi injetada em um sistema composto por HPLC Agilent, com o sistema cromatográfico descrito acima acoplado em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap linear (API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems) no modo *electrospray* negativo. Sendo que, curtain gas foi de 15 psi, temperatura 600° C, gás de nebulização e gás auxiliar 50 psi, voltagem aplicada no spray de íons na fonte *Turbo Ion Spray* - 4500 V, gás de colisão médio, o potencial de entrada (EP) foi fixado a - 10 V, energia de colisão foi de - 13 V, o potencial de

colisão na saída de Q2 foi de -7 V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate*, *declustering* potencial em 50 V.

A detecção do EASO₂ foi realizada como uma coluna de fase reversa Luna LC-18 (150 mm 4.6 mm, tamanho de partícula 5 µm, Phenomenex®, CA), com fase móvel acetonitrila (solvente B) e formiato de amônio 25 mM (solvente A), partindo de um gradiente linear: 12 % B a 15 % 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. O fluxo utilizado foi de 0.8 mL.min⁻¹. O eluente foi monitorado pelo detector UV em 215 nm e com o espectrômetro de massas utilizando o modo de ionização electrospray negativo (ESI-). A aquisição dos dados foi no modo scan total na região de massa de 100 – 500 m/z e foi detectada no modo SRM, selecionado a transição de massas (moléculas duplamente carregadas) 228, 229 e 230 para 212, referente ao EAS¹⁶O₂, EAS¹⁶O¹⁸O e EAS¹⁸O₂, respectivamente. Os dados foram processados pelo software *Analyst*.

Como controle da reação utilizou-se o mesmo sistema fechado mencionado acima, no entanto o sistema foi alimentado com ¹⁶O₂ (³Σ_g⁻) em uma solução de 4 mL de EAS 8 mM em D₂O ou H₂O, a reação prosseguiu-se por 1 hora. As alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos e prosseguiu-se analisando-as imediatamente, como descrito acima, porém a transição de massa selecionada foi de 228 → 212 equivalente ao EAS¹⁶O₂, não marcado.

3.15.2 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação de 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Para essa reação neste tipo de sistema seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, quanto às etapas de congelamento e descongelamento para remoção do $^{16}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$) dissolvido no sistema, o fluxo de $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$) de forma que a pressão do cilindro atingiu aproximadamente 1 atm.

Em um balão de 10 mL adicionou-se uma solução de dGuo 5mM ou 8-oxodGuo 5 mM em D_2O , a reação prosseguiu-se a temperatura ambiente, com agitação constante por 5 horas. Após o término da reação a solução foi transferida para um frasco âmbar e mantida a -20°C .

3.15.2.1. Caracterização e detecção de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina gerada na reação a 2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

As alíquotas de 5 μL foram injetadas e analisadas no espectrômetro de massas, API 4000 Q-TRAP, Applied Biosystems, como descrito no item 3.13.1, monitorada por SRM, as transições m/z escolhidas para $[\text{M} + \text{H}]^+$ e $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$ foram $284 \rightarrow 168$ e $286 \rightarrow 170$, respectivamente, com os seguintes parâmetros: potencial de entrada foi fixado a 10V, energia de colisão foi de 18 V, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 10V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate*, *declustering potencial* em 50 V.

3.15.2.1.1 Análise da fragmentação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada gerada na reação de 2'-desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Os fragmentos do íon produto gerado pela clivagem da ligação *N*-glicosídica após a fragmentação provocada do íon precursor m/z 284 ou 286 foram analisados no sistema HPLC/MS/MS descrito acima com os seguintes parâmetros de fragmentação do íon produto: EP foi mantida em 10 V, CE 25 V, CXP 12 V e DP 50 V, para m/z 168 e 170. Desta forma 30 μL foi injetado neste sistema.

3.15.2.2 Caracterização e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Uma alíquota de 5 μL da dSp foi analisada injetada no espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* no modo positivo e detectada por SRM. As transições m/z escolhidas para $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 4) + \text{H}]^+$ foram 300 \rightarrow 184; 302 \rightarrow 186 e 304 \rightarrow 188, respectivamente. Os parâmetros do espectrômetro de massas e as condições cromatográficas foram descritas no item 3.13.2

3.15.2.2.1 Análise da fragmentação de espiroiminodihidantoína isotopicamente marcada gerada na reação de 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Para o estudo das fragmentações dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína isotopicamente marcado utilizou-se o sistema HPLC/MS/MS descrito no item 3.13.2, com os mesmos parâmetros para a fragmentação do íon precursor das transições analisadas. Para as fragmentações do íon produto gerado pela perda neutra de 116 Da equivalente a quebra da ligação *N*-glicosídica utilizou-se os seguintes parâmetros: EP foi mantida em 10 V, CE 23 V, CXP 12 V e DP 50 V, para *m/z* 184, 186 e 190. Desta forma 30 μL foi injetado neste sistema.

3.15.2.3. Caracterização e Detecção de imidazolona e oxazolona isotopicamente marcadas geradas na reação a 2'-desoxiquanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Do mesmo modo 5 μL foram injetados no sistema HPLC/MS descrito no item 3.13.3. As transições específicas para cada íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ e $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$ foram monitoradas por SRM com *m/z* 229 \rightarrow 113 e 231 \rightarrow 115 para imidazolona e 247 \rightarrow 131 e 249 \rightarrow 133 para oxazolona, com os seguintes parâmetros: EP foi mantida em 10 V, CE 16 V, CXP 10 V e DP 50 V.

3.15.4 Caracterização e detecção de X_1 e X_2 gerados na reação a 2'-desoxiquanosina e $^{15}\text{N}_5$ -2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Os produtos X_1 e X_2 foram analisados através de um espectrômetro de massas com ionização *eletrospary* no modo positivo e detectada por SRM. A transição m/z escolhida para $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi $300 \rightarrow 184$ e o espectro de massas do íon precursor foi adquirido na faixa de 40 a 400 m/z .

Os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados de forma a se ter a melhor aquisição, para o potencial de entrada foi fixado a 10V, energia de colisão foi de 17 V, o potencial de colisão na saída de Q2 foi de 12V e a diferença de potencial entre Q0 e a *orifice plate*, *declustering* potencial em 50 V.

3.15.4.1 Análise da fragmentação da X_1 e X_2 gerados na reação a 2'-desoxiquanosina e $^{15}\text{N}_5$ -2'-desoxiquanosina com $^{18}\text{O}_3$.

Os parâmetros utilizados para as fragmentações do íon produto referentes à clivagem da ligação *N*-glicosídica de X_1 e X_2 foram: EP 10 V, CE 20 V, CXP 12 V e DP 50 V, para m/z 184. Desta forma 30 μL foi injetado no sistema HPLC acoplado a espectrometria de massas.

3.16 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação da [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina com ¹⁶O₃.

Com o intuito de auxiliar na proposta de mecanismo de reação da dGuo com ozônio foram feitos estudos na caracterização das modificações na base utilizando como ferramenta a dGuo isotopicamente marcada com átomos de nitrogênio-15. As soluções da [¹⁵N₅] dGuo foram preparadas 5 mM em D₂O em três pH's (2,0; 6,0 e 9,0) e ozonizadas por 5 minutos com fluxo de 6 mL por minuto com 140 mg por hora de ozônio a temperatura ambiente. Para a análise dos produtos de oxidação utilizou-se o sistema HPLC (com metodologias distintas para as diferentes modificações) acoplado ao espectrômetro de massas como descrito no item 3.13.2. As condições de ionização, fragmentação e otimização da fonte *electrospray* foram mantidas para todas as modificações estudadas e já relacionadas nos itens acima.

Desta forma as análises para a espiroiminodihidantoína foram obtidas como descrito no item 3.13.2.2 e detectada por SRM. A transição escolhida [(M + 5) + H]⁺ m/z 305 → 186 referente aos cinco nitrogênios contidos na estrutura. Posteriormente analisaram-se as fragmentações do íon produto [((M + 5) – 116) + H]⁺ indicativo da perda da ribose.

Sendo assim para a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, condições descritas no item 3.13.2.1, foi monitorado por SRM a transição do íon precursor com m/z 289 → 173 de tal modo à fragmentação do íon produto foi analisada m/z 173.

Finalmente para a imidazolona e oxazolona as condições utilizadas foram descritas no item 3.13.3. Para a detecção por SRM foi escolhida as transições [(M + 4) + H]⁺ com m/z 233 → 117 e 251 → 151, respectivamente. Para as análises da

fragmentação do íon produto selecionou-se 117 e 151 referente à perda de 116 Da, desoxiribose.

3.17 Caracterização dos produtos oxidados gerados na reação de 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$.

Para avaliar a incorporação de apenas um átomo de oxigênio-18 devido ao ataque nucleofílico da H_2^{18}O ou outro possível mecanismo de reação do ozônio envolvendo a formação de espécies radicalares utilizou-se mais essa ferramenta da marcação isotópica no oxigênio -18. Deste modo elegemos uma composição de solventes orgânicos a qual foi formada por 25 % de metanol, 50 % de acetonitrila deuterada e 25 % de água marcada. Deste modo uma solução 5 mM de dGuo ou 8-oxodGuo em metanol foi adicionada a outra parte da proporção do solventes. Apenas para a 8-oxodGuo foi feita uma solução somente em H_2^{18}O , ou seja, uma pequena quantidade foi dissolvida em 50 μL de água marcada. Estas soluções foram ozonizadas por 5 minutos a um fluxo de 6 mL por minuto a temperatura ambiente com 140 mg por hora de ozônio. Os produtos provenientes destas reações foram analisados pelo sistema HPLC acoplado a espectrometria de massas, as condições de detecção, SRM, fragmentação e otimização da fonte mantiveram-se as mesmas como já mencionado nos itens acima. As transições selecionadas foram acrescida de 2 ou 4 Da para a dSp, 8-oxodGuo, imidazolona e oxazolona.

4 RESULTADOS

4.1 Medidas de concentração de ozônio

4.1.1 Iodometria

A iodometria consiste em um método indireto na dosagem de espécies oxidantes pela adição de um excesso de iodeto. O iodeto é oxidado a iodo e posteriormente este é titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio, basicamente essa titulação se fundamenta na reação reversível de oxirredução. A princípio foi feita a padronização do tiosulfato de sódio hidratado, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pois não se tem certeza quanto ao seu conteúdo de água, devido à sua natureza higroscópica. Sendo assim, utilizou-se iodato de potássio (KIO_3) como padrão primário, os resultados dos volumes encontrados na titulação são mostrados na tabela 4.1 juntamente com a concentração do titulante.

Tabela 4.1 – Padronização do tiosulfato de sódio por titulação.

KIO_3 (g)	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (mL)	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (M)
0,0114	31,2	0,01024
0,0104	27,0	0,01079
0,0118	32,3	0,01024
0,0107	29,0	0,01034

A concentração padronizada de tiosulfato de sódio encontrado foi $0,0104 \pm 0,0003$, ou seja, 10,4 mM. Para as soluções com concentrações menores de ozônio utilizou-se $S_2O_3^{2-}$ 2,085 mM, ou seja, 5 vezes mais diluída.

Após a padronização determinou-se as concentrações de ozônio em solução a 25 e 50% do potencial de redução do ozonizador nos fluxos de gás dióxigênio de 6 mL e a 25%; fluxo de 8 mL, os resultados estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados da quantificação do ozônio por iodometria indireta.

	Iodometria					
	25% 6 mL.min ⁻¹		25% 8 mL.min ⁻¹		50% 6 mL.min ⁻¹	
	v S ₂ O ₃ ²⁻ mL	O ₃ ppm	v S ₂ O ₃ ²⁻ mL	O ₃ ppm	V S ₂ O ₃ ²⁻ mL	O ₃ ppm
1	0,100	1,668	0,125	2,085	0,200	3,36
2	0,100	1,668	0,125	2,085	0,180	3,00
3	0,100	1,668	0,145	2,418	0,185	3,08
4	0,100	1,750	0,150	2,502	0,190	3,17

A partir destes resultados calculou-se a média, o desvio padrão e o erro de cada sistema escolhido. Desta forma para o sistema a 25% a 6 mL por minuto obteve-se $1,69 \pm 0,04$ ppm de O₃, erro de 2,43%. Para o sistema a 50% a 6 mL por minuto obteve-se $3,15 \pm 0,15$ ppm com erro de 4,91%. Finalmente quantidade encontrada de O₃ no sistema de 25% a 8 mL por minuto foi de $2,27 \pm 0,22$ ppm com erro igual a 9,6%.

4.1.2 Avaliação da concentração de ozônio por Espectrofotometria UV-Visível.

Inicialmente foi avaliado o comprimento de onda de absorção máxima (λ) e a absortividade molar (ϵ) da solução saturada de ozônio em D₂O a 25°C em uma cubeta de quartzo. O espectro de absorção está apresentado na figura 4.1 (absortividade molar foi de 2900 mol⁻¹ L.cm⁻¹).

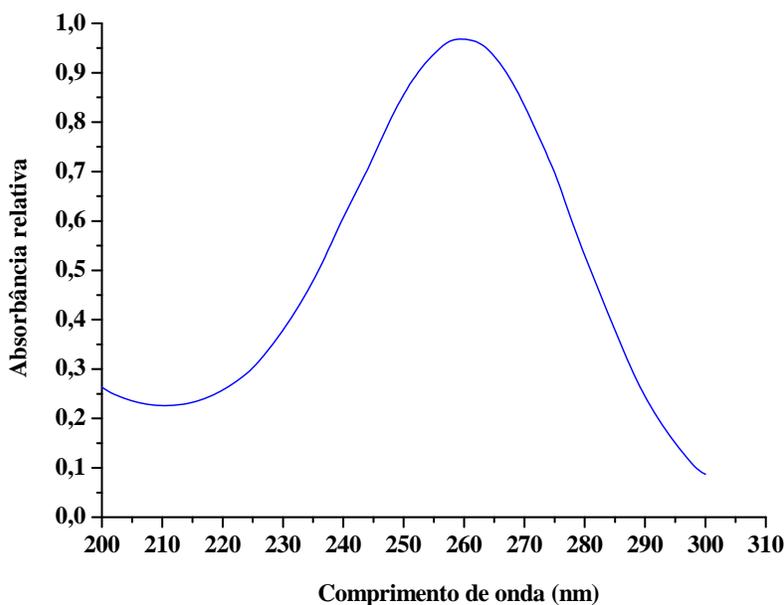


Figura 4.1 –Espectro de absorção do ozônio em solução (D₂O) na região ultravioleta.

A concentração de ozônio foi determinada espectrofotometricamente com λ e ϵ previamente determinado. Nos sistemas elegidos, os quais abrangem ao potencial do ozonizador em 25% e 50% e nos fluxos de gás oxigênio 6 e 8 mL por minuto, as

medidas foram feitas de acordo com o método descrito no item 3.4.3, os resultados estão apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Resultados da quantificação do ozônio por UV.

	Absorbância em $\lambda_{259\text{ nm}}$					
	$25\% 6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$		$25\% 8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$		$50\% 6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	
	A_{259}	$\text{O}_3\text{ ppm}$	A_{259}	$\text{O}_3\text{ ppm}$	A_{259}	$\text{O}_3\text{ ppm}$
1	0,1428	2,36	0,1900	3,14	0,1505	2,49
2	0,1437	2,38	0,1907	3,15	0,1648	2,73
3	0,1430	2,37	0,1861	3,08	0,1505	2,49
4	0,1428	2,36	0,1800	2,98	0,1688	2,79

A partir destes resultados calculou-se a média, o desvio padrão e o erro de cada experimento.

Sistema de 25% a $6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ = $(2,36 \pm 0,01)$ ppm erro = 0,40%.

Sistema de 50% a $6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ = $(3,08 \pm 0,08)$ ppm erro = 2,53%.

Sistema de 25% a $8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ = $(2,625 \pm 0,20)$ ppm erro = 6,01%.

Os fluxos e potencial de redução do ozonizador para os experimentos realizados acima foram escolhidos por gerar menores concentrações de ozônio em solução, sendo menos agressivo, permitindo amplas condições de análises dos produtos primários formados.

4.2 Sínteses: Do endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina - Diastereoisômeros da Espiroiminodihidantoína.

4.2.1 Endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno.

O endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno foi preparado através da reação de fotossensibilização utilizando azul de metileno como fotossensibilizador e um *Dewar* encamisado que possui uma lâmpada de halogênio. O endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) é hidrofóbico e termodecompõe-se gerando 70 % de O₂ (¹Δ_g) e DMN, a reação está representada na figura 4.2. (Pierlot *et. al.*, 2000).

A caracterização do DMNO₂ foi realizada acompanhando a termólise do endoperóxido, monitorada por espectrometria UV-Visível a 288 nm correspondente ao anel naftalênico em duas temperaturas a 37° C e a 60° C.

A figura 4.3.(A) exhibe a decomposição do DMNO₂ evidenciando a dependência da temperatura na termólise, desta forma a 60° C em 50 minutos todo endoperóxido foi destruído de forma linear o contrário é visto na curva a 37 °C , a qual levou 300 minutos, demonstrando um comportamento diferente na cinética.

A figura 4.3 (B) apresenta uma sobreposição dos espectros do endoperóxido adquiridos por 224 minutos a cada 10 minutos a 37 °C. Nota-se que a princípio no tempo zero a banda em 288 nm relativa ao anel é bem pequena e com o tempo de termólise há o surgimento da banda.

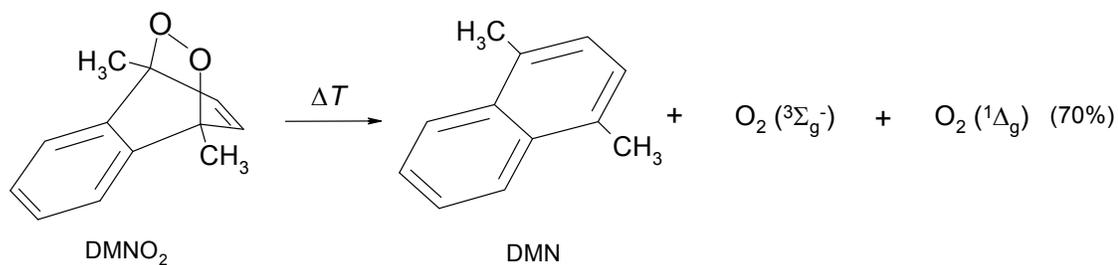


Figura 4.2 - Reação da termólise do DMNO_2 .

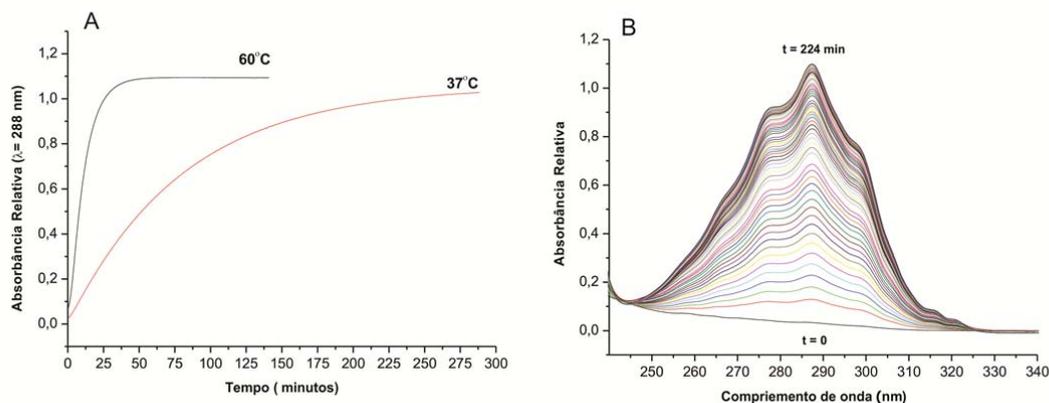


Figura 4.3 – (A) Cinética da termólise do endoperóxido DMNO_2 63 mM em metanol a 37°C e 60°C monitorando a absorção em 288 nm. (B) Sobreposição de espectros mostrando o surgimento da banda em 288 nm à medida que o endoperóxido é destruído a 37°C.

As medidas de luminescência no decaimento monomolecular na transição $\text{O}_2 (^1\Delta_g) \rightarrow \text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$ em $\lambda=1270$ nm da termólise do DMNO_2 a 37°C em metanol foram adquiridas utilizando uma fotomultiplicadora sensível na região do infravermelho (descrita no item 3.2). A figura 4.4 (A) mostra a emissão de luz, cuja intensidade aumenta até atingir o estado estacionário da concentração do $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ onde a

intensidade da emissão se torna constante. A partir desse patamar da luminescência um espectro de emissão de luz foi adquirido na faixa de 1200 a 1350 nm, com o intuito de obter uma clara evidência da formação $O_2 (^1\Delta_g)$ da termólise do $DMNO_2$, figura 4.4 (B).

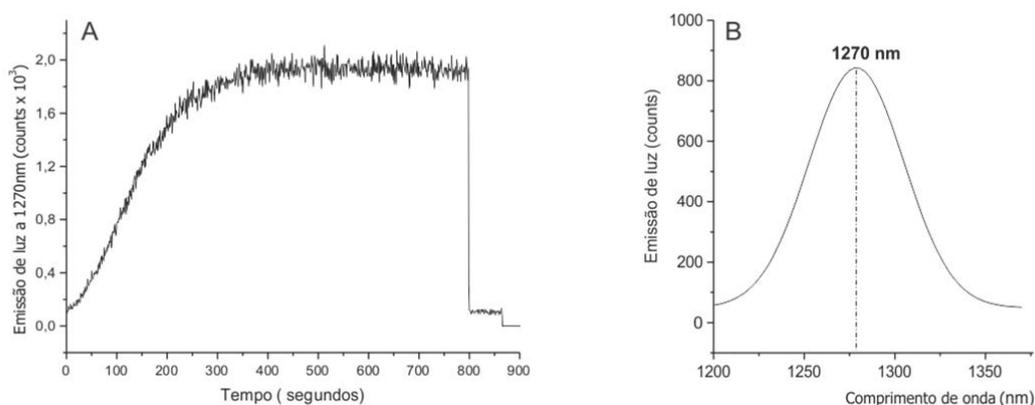


Figura 4.4 - (A) Emissão da quimiluminescência obtida da transição $O_2 (^1\Delta_g) \rightarrow O_2 (^3\Sigma_g^-)$ em $\lambda=1270$ nm da termólise do $DMNO_2$ 63mM a 37°C em metanol. (B) Espectro de emissão da quimiluminescência obtida da termólise do $DMNO_2$ 63 mM a 37°C em metanol.

4.2.2 Síntese da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiquanosina

A primeira etapa da síntese da 8-oxodGuo foi feita como descrito no item 3.6.2.2. A formação da 8-bromo-2'-desoxiquanosina (8-BrdGuo) foi acompanhada por HPLC com detecção UV programada em 260 nm utilizando um detector DAD. A figura 4.5, (A) mostra no cromatograma a formação da 8-BrdGuo o primeiro intermediário da rota de reação em função do consumo de dGuo a partir da adição

de bromo. Os espectros de absorção do produto de partida dGuo e o produto da reação 8-BrdGuo podem ser vistos na figura 4.5 (B).

Após a recristalização do produto, foi realizado um RMN de próton para confirmar a estrutura do produto intermediário de interesse para a continuação da rota sintética. Deste modo, os seguintes deslocamentos químicos de RMN de próton em DMSO₆ foram encontrados (2,5 ppm), apresenta os seguintes sinais δ (ppm), 2,10 - 2,39 (m, 2H, 2'-H), 3,40 - 3,62 (m, 2H, 5'-H), 3,63 - 3,84 (m, 1H - 3'-H), 4,18-4,52 (m 1H, 4' - H), 4,78 - 5,32 (m, 2H, 3' e 5'-OH) (Lin.,T. S., *et. al.*,1984).

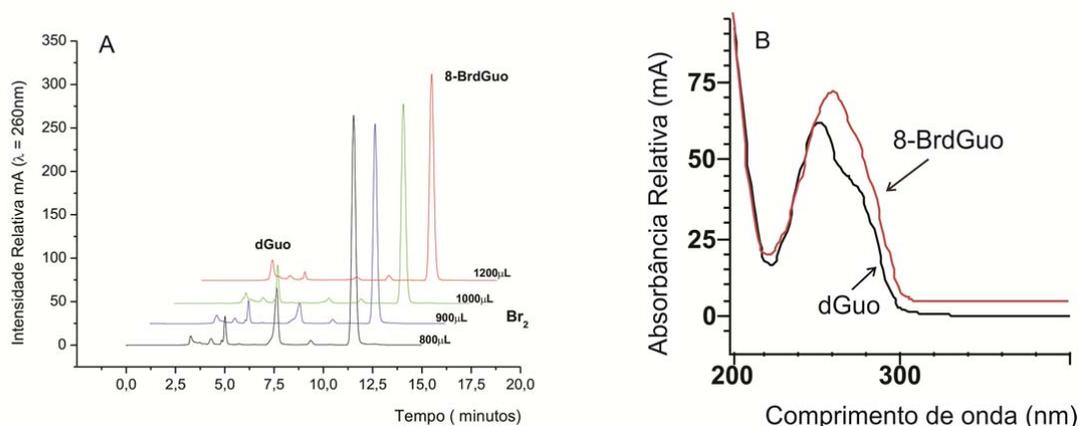


Figura 4.5 – (A) O cromatograma apresenta a formação de 8- BrdGuo a partir da adição de alíquotas de Br₂, em função do consumo de dGuo, monitorados por HPLC em uma coluna de fase reversa Luna C-18 (250 x 5 mm, 5 μ m) separados de modo isocrático, com fase móvel constituída 10% de ACN e água a um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ com detecção UV programado em 260 nm. (B) Espectro de absorção da 8-BrdGuo(λ = 260nm), e dGuo (λ = 254nm), monitorados durante as análise por HPLC.

A segunda etapa da síntese da 8-oxodGuo foi feita obtendo o produto 8-(benziloxi)-2'-desoxiguanosina como descrito no item 3.6.2.3. Após a recristalização do produto, foi realizado um RMN de próton para confirmar se realmente o produto obtido é a estrutura de interesse para a continuação da rota sintética. Assim o produto possui os seguintes deslocamentos químicos de RMN de próton em DMSOd₆ (2,5 ppm), apresenta os seguintes sinais δ (ppm), 2,05 -2,40 (m, 2H, 2'-H), 3,61 – 3,2 (m, 1H, 3'- H), 4,12 – 4,40 (m, 1H, 4'H) (Lin.,T. S.,*et. al.*,1984).

A última etapa da síntese prosseguiu-se de acordo com o descrito no item 3.6.2.3. Após a hidrogenação uma alíquota do meio reacional foi diluída e injetada no HPLC para ver se essa etapa foi satisfatória. O catalisador foi eliminado por filtração à vácuo com celite. O solvente foi seco com um rotaevaporador. O produto foi recristalizado com metanol e seco. O sólido final apresentou uma cor amarelo palha.

A 8-oxodGuo foi purificada e detectada através das análises por HPLC representada na figura 4.6 - (A) o cromatograma obtido da síntese final, (B) a ampliação do pico purificado e (C) o espectro de absorção do produto da 8-oxodGuo adquirido na faixa de 200 nm 350 nm no detector DAD.

Posterior à purificação, o produto foi rotoevaporado para remoção da fase móvel durante a purificação até obter se um sólido de cor branca. Este produto foi solubilizado em Metanol/ H₂O (9:1) analisado por HPLC, como ilustra a figura 4.7, o cromatograma e seu espectro de absorção, para a confirmação de um produto de interesse puro sem qualquer oxidação do mesmo.

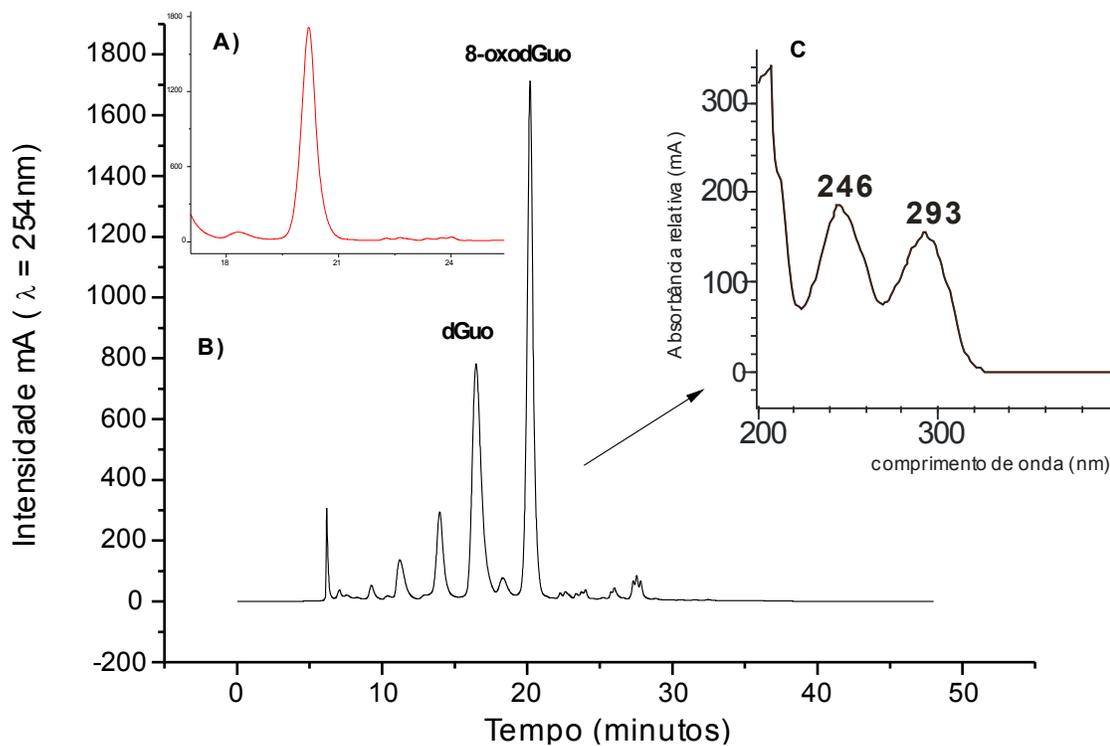


Figura 4.6 – (A) O cromatograma obtido na purificação da 8-oxodGuo por HPLC utilizando um coluna semi-preparativa LC-NH₂ Luna (250 x 10 mm, 5 μm) da Phenomenex®. A separação foi feita com um fluxo de 3,8 mL.mim⁻¹ de forma isocrática, sendo a fase móvel constituída de 70% de metanol e H₂O, com detecção em 254 nm. (B) A ampliação do sinal com tempo de retenção em 21 minutos. (C) Espectro de absorção da 8-oxodGuo obtido durante a corrida da purificação.

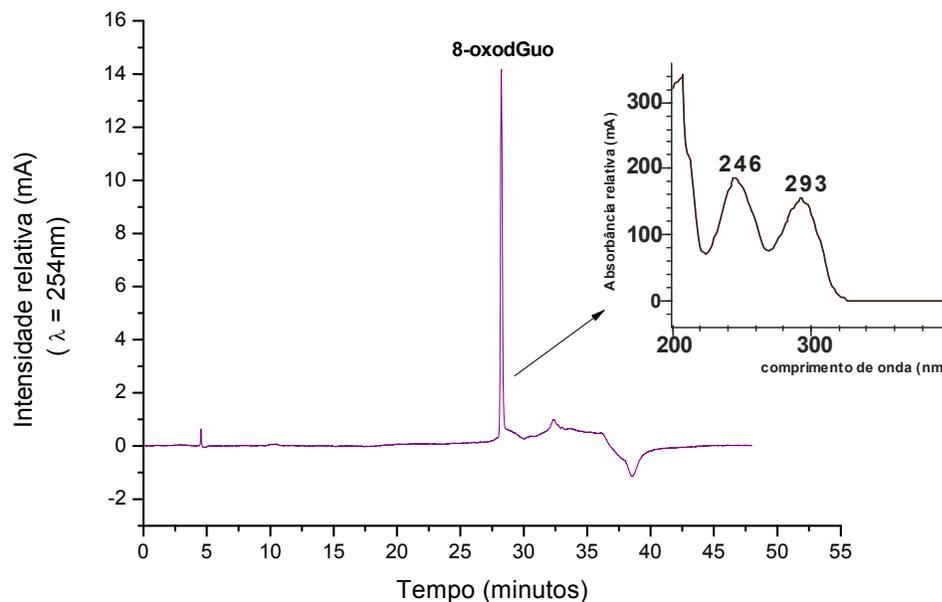


Figura 4.7 – Cromatograma da 8-oxodGuo purificada por HPLC com uma coluna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) da *Phenomenex*®, analítica. A identificação foi feita com um fluxo de 0,8mL.min⁻¹, a detecção foi feita no parâmetro utilizando UV programando para detecção em comprimento de onda de 254 nm e monitorado por PDA programado com detecção na faixa de 200 a 400nm, espectro de absorção no lado direito superior.

A 8-oxodGuo sintetizada foi analisada também por HPLC-MS no modo de ionização electrospray positivo (ESI⁺), com temperaturas da fonte e de dessolvatação de 100 e 200 °C, respectivamente e voltagem do cone em 15 V e com a energia de colisão de 15 eV. Observa-se na figura 4.8 (A) o cromatograma no modo SRM, selecionado a transição de massa m/z 284 \rightarrow 168, (B) o cromatograma monitorado em 254 nm, com o espectro de absorção em $\lambda = 254$ nm e (C) o

espectro de massas obtido no modo ESI+ com potencial de cone em 15 V e energia de colisão 10 eV, analisados em fase reversa.

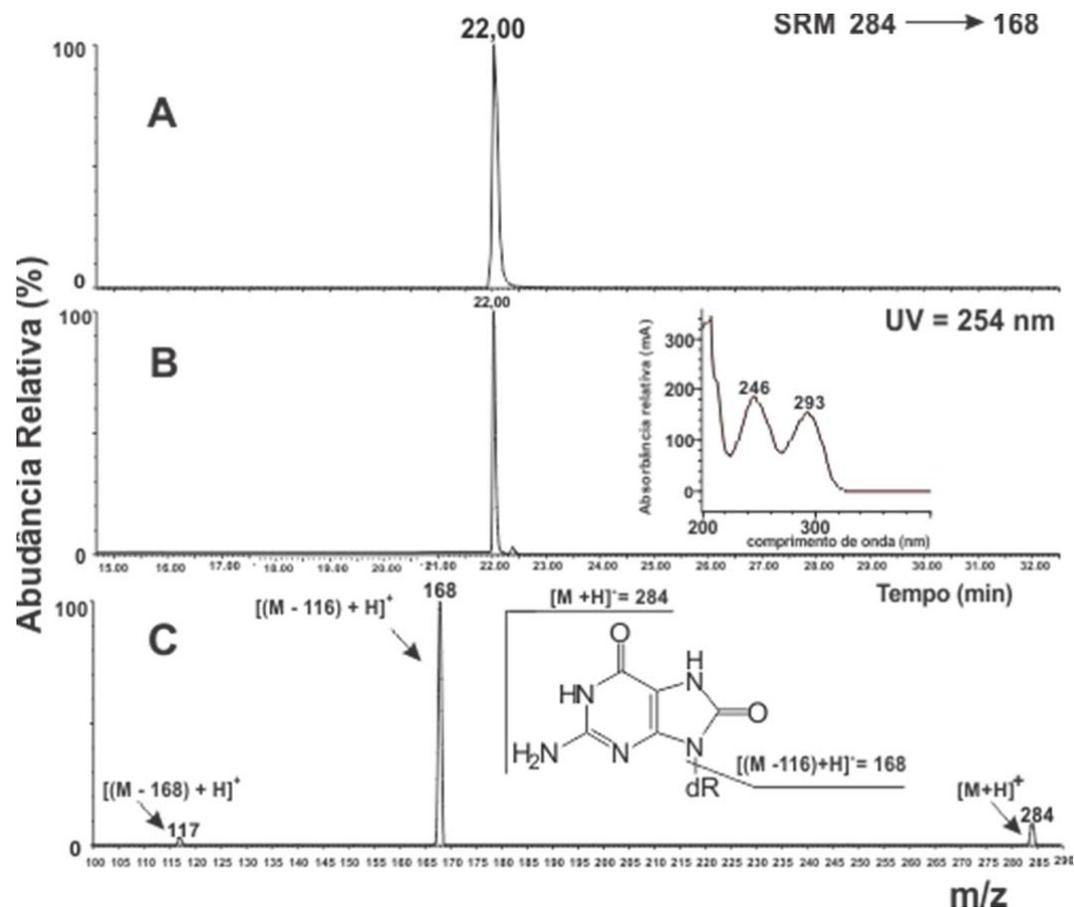


Figura 4.8 – Análise por HPLC-ESI/MS obtida após a purificação da 8-oxodGuo - (A) cromatograma no modo SRM (ESI⁺), m/z 284 \rightarrow 168, transição referente à clivagem da ligação *N*-glicosídica. (B) cromatograma com detecção UV-Vis ($\lambda = 254$ nm), a figura inserida corresponde ao espectro UV-Vis da 8-oxodGuo e (C) Eespectro de massas do sinal do produto que elui em 22 minutos.

dR corresponde a 2-desoxirribose.

4.2.3 Síntese e purificação dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína.

A dSp foi preparada pela foto-oxidação da dGuo por azul de metileno. A fotossensibilização tanto pode oxidar os substrato pela reação do tipo I ou II, a utilização do filtro “cut-off” 590 nm, favorece a rota do tipo II, ou seja, pelo $O_2 (^1\Delta_g)$ que reage com a dGuo formando como produtos principais os diastereoisômeros da dSp (Niles *et. al.*, 2001) e em concentrações menores a 8-oxodGuo (Buchko *et. al.*, 1995; Ravanat e Cadet; 1995; Martinez *et. al.*, 2003).

A purificação dos diastereoisômeros foi feita conforme descrito no item 3.6.3 A figura 4.9 - (A) mostra no cromatograma o sinal referente a dSp com tempo de eluição em 7,5 minutos e (B) exhibe a ampliação do pico coletado.

As frações coletadas, correspondentes aos diastereoisômeros da dSp, foram rotoevaporadas e liofilizadas e seus espectros de massas foram obtidos, no modo *electrospray* positivo SRM no modo SRM m/z 300 \rightarrow 184 acoplado HPLC com as seguintes especificações: coluna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) da Phenomenex®. A separação foi feita com um fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ de forma isocrática com fase móvel de 85% ACN e formiato de amônio 25 mM. A figura 4.10 resume em (A) Análise por HPLC-ESI/MS no modo SRM ESI+ m/z 300 \rightarrow 184, transição referente à perda da desoxirribose (dR) em (B) Cromatograma com detecção UV-Vis (λ = 230 nm), a figura inserida corresponde ao espectro UV-Vis da dSp e (C) Espectro de massas do sinal do produto que elui em 4 minutos. Nos cromatogramas é importante notar que os diastereoisômeros da dSp não separam na coluna C-18 e o tempo de retenção é próximo do volume morto em 4 minutos.

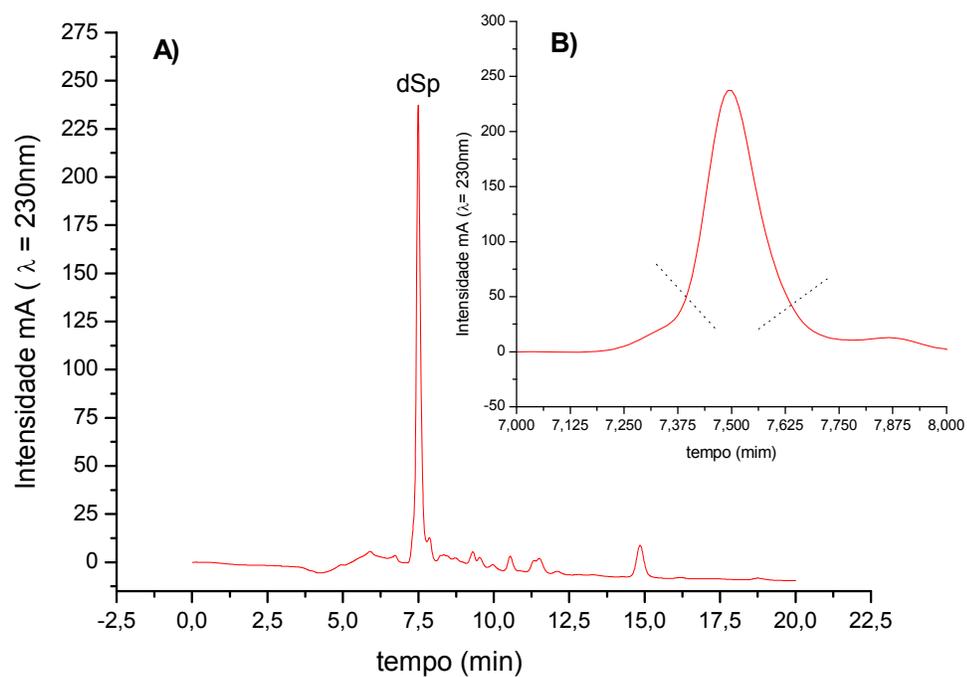


Figura 4.9 – (A) Purificação da dSp por HPLC e com detecção em $\lambda = 230\text{ nm}$ em fase normal com uma coluna para LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μm), de forma isocrática com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹, sendo a fase móvel constituída por 0,5 % de ACN e H₂O. (B) Ampliação da região exata da coleta, as setas indicam o preciso momento do início e o término da purificação.

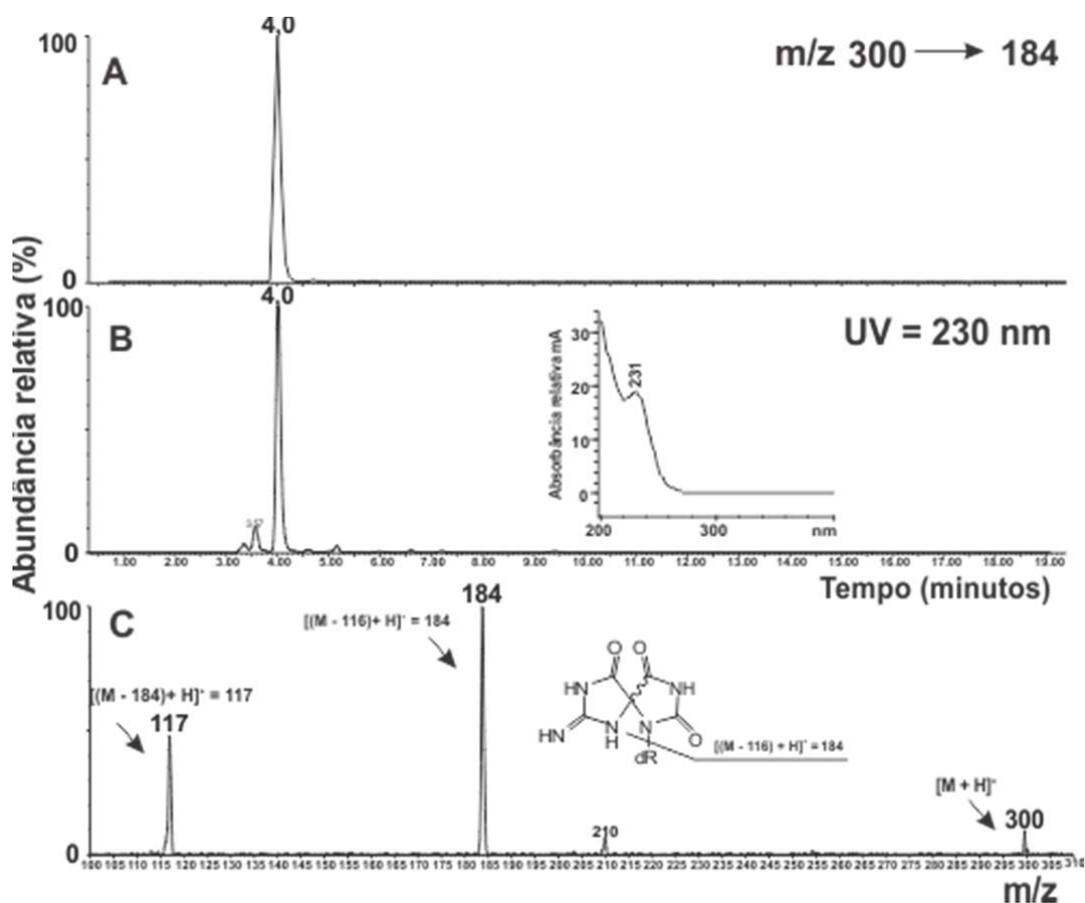


Figura 4.10 - (A) Análise por HPLC-ESI/MS obtido no modo ESI+ dos diastereoisômeros da dSp m/z 300 \rightarrow 184, transição referente da perda da desoxirribose (dR). (B) Cromatograma com detecção UV-Vis ($\lambda = 230$ nm), a figura inserida corresponde ao espectro UV-Vis da dSp e (C) Espectro de massas do sinal do produto que elui em 4 minutos.

4.3 Medidas da emissão monomolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ na reação de O_3 com 2'-desoxiguanosina.

Evidências da geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ na reação do ozônio com a 2'-desoxiguanosina (dGuo), foram obtidas através de medidas de emissão de luz monomolecular na região do infravermelho utilizando uma fotomultiplicadora bastante sensível a região espectral do infravermelho, entre 800 a 1350 nm. Na figura 4.11 observa-se um sinal bem intenso de emissão de luz obtido ao injetar dGuo 10 mM, concentração inicial, em uma solução de O_3 ambos em D_2O . Com o intuito de confirmar se o sinal de emissão de luz resultante é do decaimento monomolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ é comum utilizar azida (NaN_3) como supressor físico. Sendo assim NaN_3 10 mM foi adicionada a uma solução contendo dGuo 10 mM e em seguida essa mistura foi injetada em uma cubeta contendo uma solução de O_3 saturada. Desta forma observou-se uma diminuição de aproximadamente 90% da intensidade da quimiluminescência.

Na literatura é intensamente discutida a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ a partir das reações de ozônio com vários substratos que possuam alta densidade eletrônica, e uma delas são as aminas. De modo que Sonntag (2005) demonstrou que a azida gera $O_2 (^1\Delta_g)$ com 11% de rendimento em pH 7,0. Logo como controle do modelo experimental adotado foi injetado NaN_3 10 mM na mesma concentração usada no experimento de supressão física e com volume de 0,15 mL a uma solução de ozônio, em D_2O , notamos que não houve emissão de luz, Figura 4.12 (A). As reações foram feitas em D_2O para prolongar o tempo de vida da molécula no estado eletronicamente excitada em 10 vezes quando comparada a água. Outra forma de

supressão física é a utilização da água, então a solução de ozônio foi preparada em água e a solução de dGuo em D₂O, notamos a total supressão do O₂ (¹Δ_g) figura 4.12 (B).

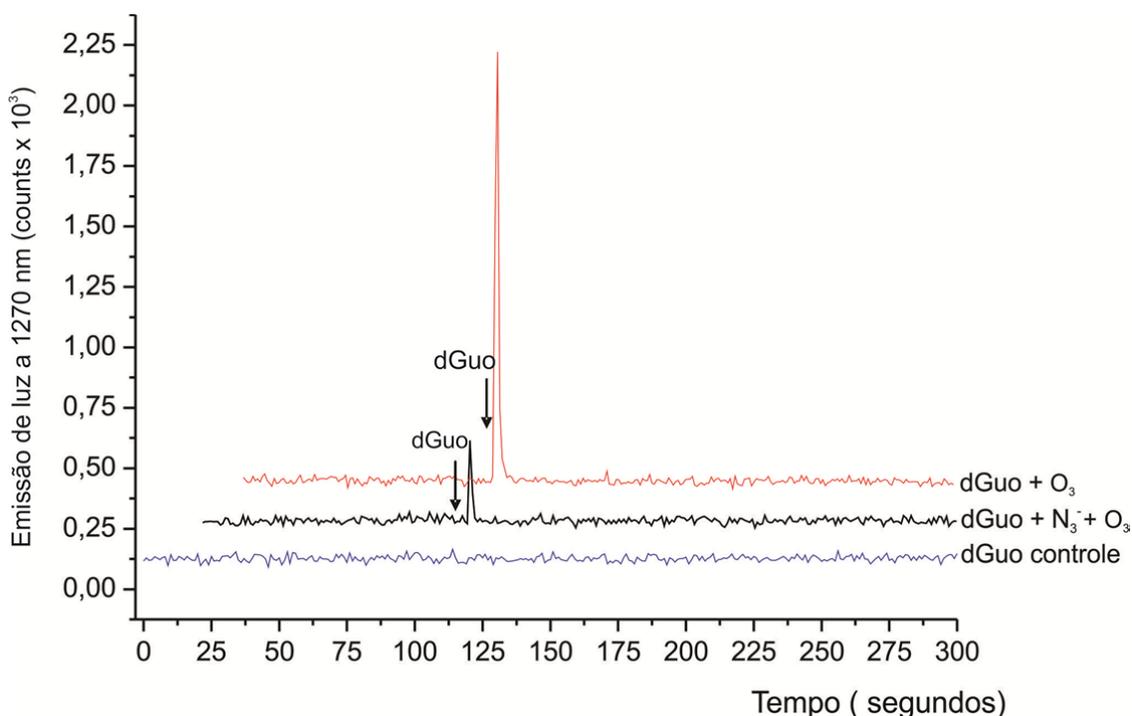


Figura 4.11 – A quimiluminescência foi detectada durante a injeção de 0,15 mL de dGuo (10 mM) em 0,135 mL de ozônio (0,15 mM) ambos em D₂O e em pH 6,0. Foi adicionado 5 μL de NaN₃ 10 mM na solução dGuo 10 mM 145 μL, e essa mistura foi injetada em uma solução de ozônio, nas mesmas condições da reação sem a supressão. O controle de dGuo 10 mM. As setas indicam o momento da injeção.

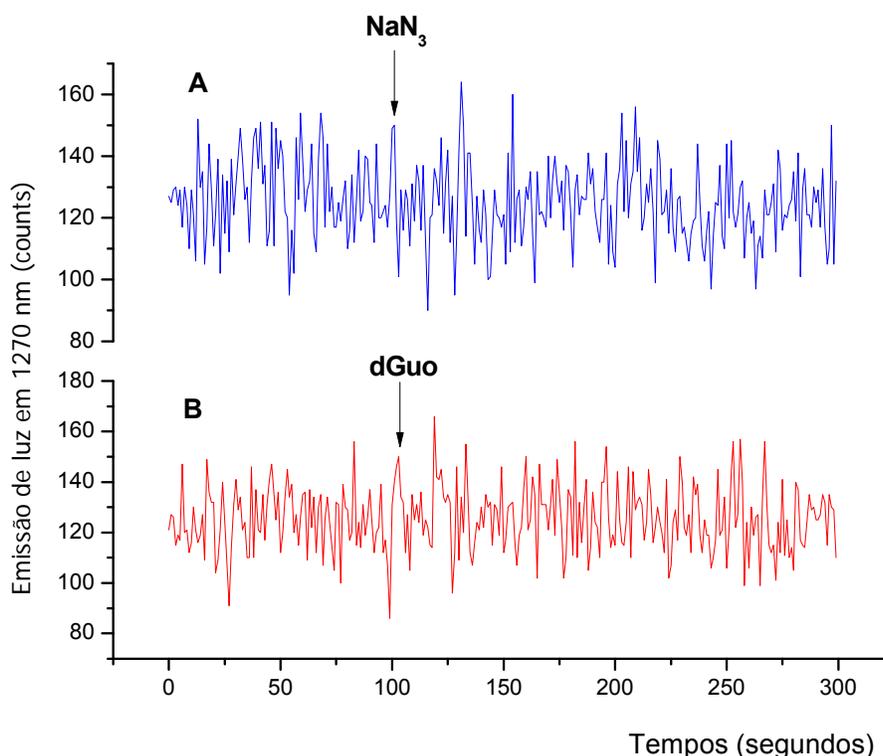


Figura 4.12 – (A) A emissão de luz na região do infravermelho próximo (1270 nm) não foi detectada para a reação de NaN_3 (10 mM em D_2O), a qual foi injetada 0,15mL em uma solução de ozônio 0,135mL (0,15 mM). B – Supressão física do O_2 ($^1\Delta_g$), utilizando H_2O nas mesmas condições, a dGuo 10 mM em D_2O foi injetada a uma solução de O_3 , em H_2O . As setas indicam o momento da injeção.

Com a finalidade de verificar efeito da geração de O_2 ($^1\Delta_g$) em função da concentração da 2'-desoxiguanosina na reação com ozônio, a concentração de ozônio foi mantida constante (0,15 mM) pela dificuldade de manipulá-lo. Portanto, somente a concentração de dGuo foi modificada. Para este propósito o arranjo experimental constituiu-se por uma solução com volume de 1,8 mL de O_3 0,15 mM contida na cubeta, juntamente com a adição de 0,2 mL de dGuo nas seguintes

concentrações finais: 0,15; 1,5; 3,0; 4,5 ; 6,0; 7,5; 9,0 e 10,5 μM , as análises foram conduzidas em água deuterada.

O efeito da concentração da dGuo na geração de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ mostrou um perfil linear à medida que aumenta a concentração excetuando em 7,5 μM , figura 4.13. Desta forma consta-se que geração de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ é proveniente da reação do nucleosídeo com o O_3 . Uma forte evidência foi constatada no momento da injeção da dGuo em baixa concentração, a qual foi possível observar uma emissão de luz proveniente de uma segunda injeção do nucleosídeo na mesma solução saturada de O_3 , ou seja, o ozônio ainda não tinha sido todo consumido na reação.

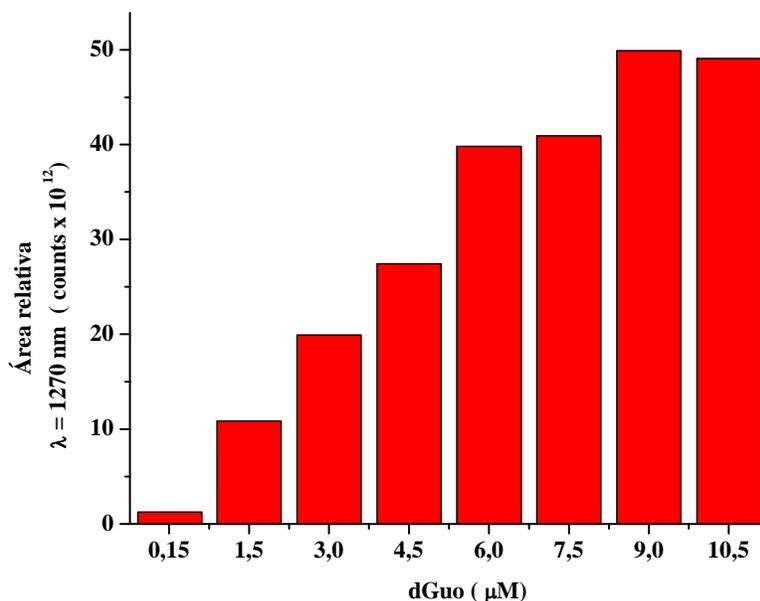
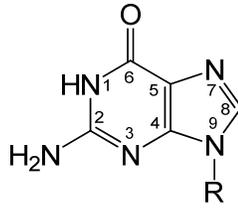


Figura 4.13 – Medida da quimiluminescência da emissão de luz em 1270 nm proveniente do efeito da dependência da concentração de dGuo na reação com O_3 , o qual foi mantido a concentração constante (0,15 mM).

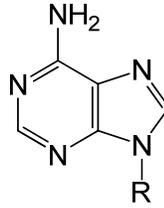
4.4 Efeito do pH nas medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação de O_3 com os nucleosídeos isolados e seus derivados e poliaminas.

Atualmente sabe-se da importância do pH nos mecanismos de reação com o ozônio. Dependendo do grau de protonação a constante de velocidade pode variar substancialmente, além disso, para certos substratos a desprotonação pode mudar o tipo de mecanismo de reação envolvendo o intermediário trióxido favorecendo a formação de O_2 ($^1\Delta_g$). Outro fator importante é a dependência do pH na decomposição do O_3 em meio aquoso, será discutido mais adiante. Com essa finalidade investigou-se a importância da espécie secundária, O_2 ($^1\Delta_g$), gerada e o tipo de mecanismo de reação em diferentes pH's (2,0, 6,0 e 9,0) a partir das reações do O_3 com os substratos escolhidos. A figura 4.14 destaca as estruturas químicas dos nucleosídeos e das bases nitrogenadas, os substratos utilizados para esse arranjo experimental. Os valores dos pKa's referentes aos nucleosídeos e suas bases nitrogenadas e as constantes de velocidade estão resumidas na tabela 4.4. Sendo assim as medidas de emissão de luz na região do infravermelho foram adquiridas com uma fotomultiplicadora, descrito no item 3.2.



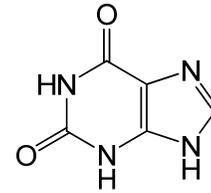
Guanina (Gua)

2'-desoxiguanosina (dGuo)

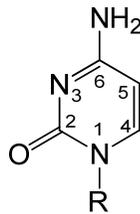


Adenina (Ade)

2'-desoxiadenosina (dAdo)

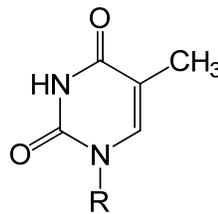


Xantina



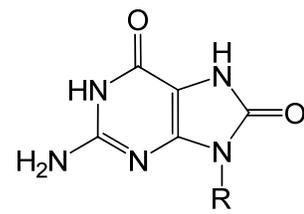
Citosina (Cyt)

2'-desoxicitidina (dCyd)



Timina (Thy)

Timidina (dThd)



8-oxodGua

R = H - base nitrogenada

R = 2'-desoxirribonucleotídeo

Figura 4.14 – Estrutura molecular dos nucleosídeos e das bases nitrogenadas.

Tabela 4.4 - Valores do pKa e a constante de velocidade (k) de reação com O₃ dos nucleosídeos e de seus derivados.

Substrato	pK _a **	k (L. mol ⁻¹ .s ⁻¹)*		
		protonada	desprotonada	neutra
Adenina	4,15 ; 9,8	5	1,3 x 10 ⁵	12
Citosina	4,6 ; 12,2	18	1,5 x 10 ⁶	1,4 x 10 ³
Guanina	2,5; 9,2			
Timina	9,9	-	~3,0 x 10 ⁶	4,2 x 10 ⁴
2'-Desoxiadenosina	3,8	5	14	
2'-Desoxicitidina	4,3	44		3,5 x 10 ³
2'-Desoxiguanosina	2,5 ; 9,2			1,9 X 10 ⁴
Timidina	9,8	-	1,2 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁴

* Theruvathu J. A., 2001. ** Fasman, G. D., 1975.

4.4.1 Medidas de emissão monomolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação das purinas: 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiadenosina e 8-oxodGuo e com as bases nitrogenadas Guanina, Adenina e Xantina com ozônio.

Investigamos o efeito do pH (2,0 ; 6,0 e 9,0) na geração do O₂ (¹Δ_g) a partir da reação do ozônio com a dGuo. O procedimento experimental foi semelhante ao descrito nos itens acima, com exceção da modificação do pH na solução da dGuo.

Observamos em pH 6,0 a emissão de luz é pouco mais intensa quando comparada a reação conduzida em pH 9,0. Interessantemente em pH 2,0 o sinal de emissão é muito intenso, contudo o perfil do decaimento é o mesmo para todos os

pH's estudados, sugerindo uma mudança do mecanismo de reação propiciado pela mudança da densidade eletrônica da dGuo mediante a protonação e a desprotonação. A figura 4.15 (A) ilustra a diferença na intensidade de emissão e a simetria do pico nas reações.

A reação da 2'-desoxiadenosina (dAdo) com ozônio, a figura 4.15 (B) apresenta um perfil da quimiluminescência no decaimento monomolecular igual ao da adenina, em pH 2,0, a qual não há emissão de luz. Diferentemente foi observado para dGuo, pois comparando o comportamento de emissão de luz em meio ácido há uma maior intensidade. Destacamos que todas as moléculas da dAdo estão protonadas, o valor de pka é 3.8, tabela 4.4. Para este nucleosídeo a emissão de luz é pouco mais intensa em pH 6,0 quando comparado ao pH 9,0. Dentre todas as bases a adenina e seus derivados é a única base que reage com ozônio pelo mecanismo radicalar, (Sonntag, 2001) determinou-se a constante de velocidade e evidenciou uma mudança no comportamento da velocidade quando adicionado álcool *tert* butílico, ou seja, indicando o envolvimento do radical hidroxila. Embora, não haja nenhum mecanismo proposto na literatura.

As bases nitrogenadas, as purinas, possuem comportamento distintos de emissão de luz nas reações conduzidas nos três pH's quando comparados aos seus respectivos nucleosídeos.

O resultado obtido da detecção de luminescência da guanina, figura 4.15 (C) ilustra em pH ácido a sua tendência e de seus derivados a favorecer uma maior emissão de luz em 1270 nm. Porém o tempo de decaimento da emissão da guanina tem uma duração de 10 segundos o contrário é visto para dGuo. Em pH 6,0 e 9,0 a intensidade de emissão de luz são semelhantes, não há uma diferença significativa. O mesmo perfil da quimiluminescência é visto para adenina e seus derivados, figura

4.15 (D), observa-se que em pH 9,0 a emissão é mais intensa, neste caso em pH alcalino a luminescência é favorecida, sugerindo a desprotonação do nitrogênio 1.

Um dos biomarcadores de estresse oxidativo mais estudados, a 8-oxodGuo pode ser formada pela reação direta da 2'-desoxiguanosina com radicais hidroxila, $O_2 (^1\Delta_g)$, O_3 e com outras espécies reativas.

Com o objetivo de compor o estudo mecanístico da geração $O_2 (^1\Delta_g)$ investigou-se a emissão de luz em 1270 nm da reação de 8-oxodGuo com O_3 . A figura 4.15 (E) evidencia claramente que apenas os derivados da Guanina apresentam luminescência em pH ácido, diferenciando somente na sua intensidade. No entanto para a 8-oxodGuo em pH 9,0 observa-se uma emissão de luz intensa comparada em pH ácido, ao contrário foi visto para guanina e 2'-desoxiguanosina. O perfil no decaimento da emissão apresenta cerca de 30 segundos em pH 6,0, o que não pode ser relatado em outros pH's, pois o tempo de emissão é cerca de 8 segundos, ou seja, quase instantânea.

A xantina é um produto de desaminação da guanina ou a 2'-desoxiguanosina, portanto suas estruturas são semelhantes exceto a função orgânica carbonila no Carbono 2. Como uma tentativa de elucidação dos mecanismos de reação, investigamos a quimiluminescência da xantina e a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$. Os experimentos foram realizados igualmente para os outros substratos. A figura 4.15 (F) - mostra visivelmente uma emissão de luz bem intensa em pH alcalino, 9,0.

Ao fazer o controle notamos uma emissão de luz a 1270 nm quando injetou se 150 μ L de solução de NaOH 0,1 M, sugerindo que os íons hidroxilas, ao catalisarem a decomposição do ozônio podem gerar $O_2 (^1\Delta_g)$, como apresentado na figura 4.16.

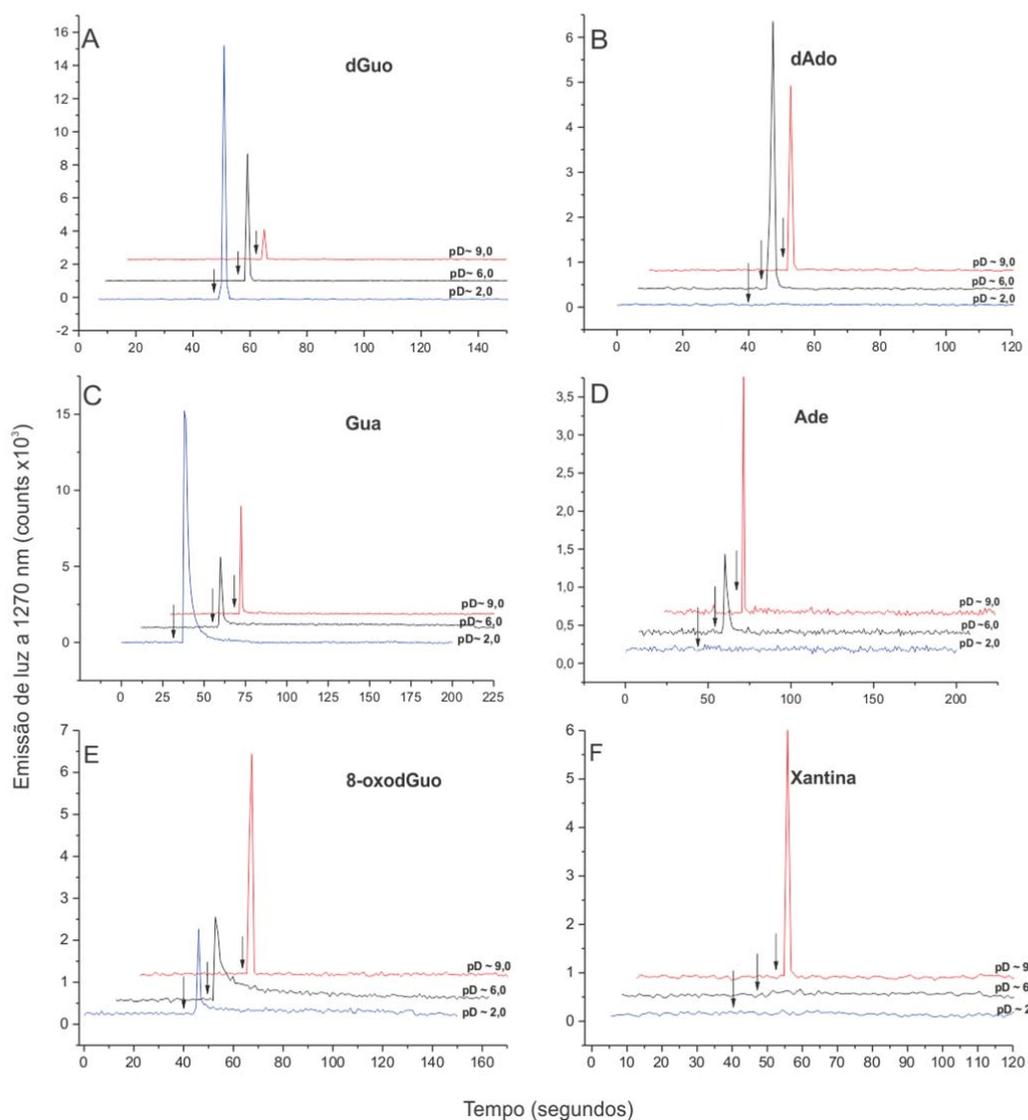


Figura 4.15 – Emissão de luz detectada na transição monomolecular $O_2 (^1\Delta_g) \rightarrow O_2 (^3\Sigma_g^-)$ em $\lambda=1270$ nm, nas reações com (A) 2'-desoxiguanosina (dGuo) 5 mM; (B) 2'-desoxiadenosina (dAdo) 5 mM ; (C) Guanina (Gua) 5 mM ; (D) Adenina (Ade) 5 mM ; (E) 8-oxodGuo 5 mM e (F) Xantina 5 mM em pH 2,0 , 6,0 e 9,0 quando injetadas na cubeta contendo uma solução 0,15 mM de O_3 em D_2O . As setas pretas indicam o momento da injeção.

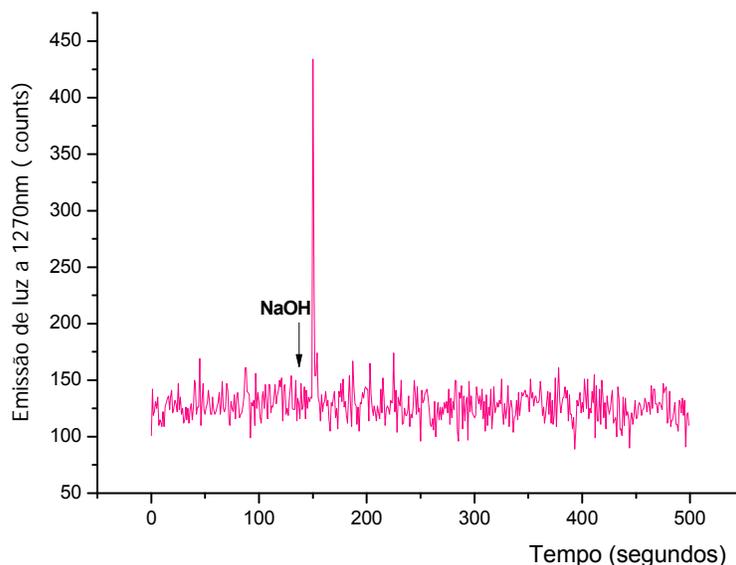


Figura 4.16 – Detecção da emissão de luz a 1270 nm ao injetar 150 μL de NaOH 0,1 M em 1350 μL de ozônio 0,15 mM em D_2O . A seta indica o momento da injeção manual do hidróxido de sódio.

4.4.2 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação das pirimidinas: 2'-desoxicitidina (dC), Timidina e suas bases nitrogenadas Citosina e Timina com O_3 .

A 2'-desoxicitidina quando adicionada a uma solução de ozônio apresenta um aspecto quimiluminescência (emissão no decaimento monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$), de forma clara, destaca-se a emissão mais intensa em pH alcalino (9,0). Na reação conduzida em pH 2,0 a emissão em 1270 nm é totalmente desfavorecida, figura 4.17 (A). De tal modo, as reações da citosina, base nitrogenada, em pH (2,0 , 6,0 e 9,0)

com o ozônio apresentaram os mesmos perfil e intensidade da luminescência na transição monomolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$, figura, 4.17 (C).

O estudo da luminescência da timidina, apresenta um comportamento diferente ao apresentado anteriormente para 2'-desoxicitidina, a emissão de luz é ultra fraca ou nula. Observamos na reação em pH 6,0 e 9,0 há um leve aumento da intensidade do sinal, entretanto não se pode concluir efetivamente uma emissão devido a pequena diferença entre o sinal e o ruído da fotomultiplicadora. E em pH ácido, 2,0, não há sinal, figura 4.17 (B). Esses resultados são compatíveis com a formação do ozonida como intermediário no mecanismo de Criegee rotas proposta por Cadet (1996) and Flynt (2002).

Contudo a luminescência da timina, figura 4.17 (D) exibe um perfil semelhante ao apresentado anteriormente para citosina, em pH alcalino e ácido, já para pH 6,0 não há emissão de luz. A grande diferença está na comparação da timidina e da timina, de forma que na primeira não há luminescência significativa, já na base nitrogenada a emissão intensa é apresentada em pH 9,0. Essa diferença está na desprotonação do Nitrogênio 1 para a timina e na timidina há a ligação *N*-glicosídica. (Flyunt, *et. al.*, 2002).

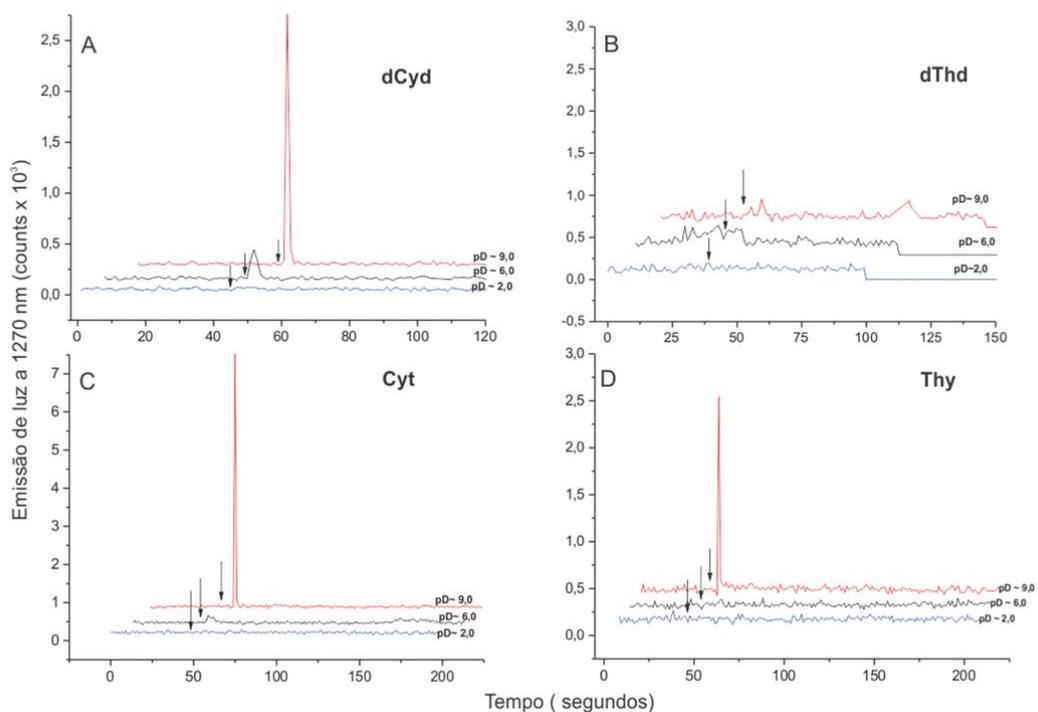
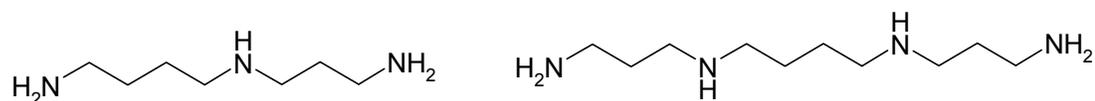


Figura 4.17 – Luminescência da emissão monomolecular em 1270 nm. Nas reações com (A) 2'-desoxicitidina (dCyd) 5 mM ; (B) Timidina (dThd) 5mM ; (C) Citosina (Cyt) 5 mM e (D) Timina (Thy) em pH 2,0 , 6,0 e 9,0 injetada em uma cubeta contendo uma solução O₃ 0,15 mM em D₂O. As setas pretas indicam o momento da injeção.

4.4.3 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação das poliaminas: Espermina e Espermidina com ozônio.

Em solução, as aminas terciárias reagem com ozônio formando principalmente aminóxido e O_2 ($^1\Delta_g$) e em menor grau formam as aminas secundárias e o aldeído correspondente. A constante de velocidade para as reações com ozônio são fortemente dependentes do pH da solução, uma vez que somente as aminas terciárias e secundárias livres em equilíbrio reagem com o O_3 com uma constante de velocidade de aproximadamente 10^6 L. mol⁻¹.s⁻¹, as primárias reagem mais lentamente enquanto que as aminas protonadas não reagem significativamente com o O_3 . Desta forma o nível de formação de O_2 ($^1\Delta_g$) é dependente do grau de protonação das aminas. Assim o O_3 tem uma velocidade de reação mais lenta, favorecendo a sua decomposição em meio aquoso ou pelo mecanismo por transferência de elétrons favorecendo a formação do radical hidroxila. A figura 4.18 (A) pode ser observado uma maior intensidade de emissão de luz em pH 13 e nenhuma emissão é notada em pH 2,0 para a espermina. O mesmo comportamento de emissão de luz é esperado para espermidina figura 4.18 (B), as reações foram realizadas em H₂O. Na figura 4.18 (C e D) apresenta a quimiluminescência D₂O sem alteração do pH tanto para espermina e espermidina, respectivamente, observa-se em D₂O há uma aumento na intensidade de emissão de luz como esperado, por aumentar o tempo de vida do O_2 ($^1\Delta_g$) em aproximadamente 10 vezes quando comparada a água, as figuras inseridas correspondem ao mesmo experimento em H₂O para um comparativo. Desta forma as medidas de luminescência (1270 nm) para as espermina e espermidina condizem com o esperado.



Spermidina

Spermina

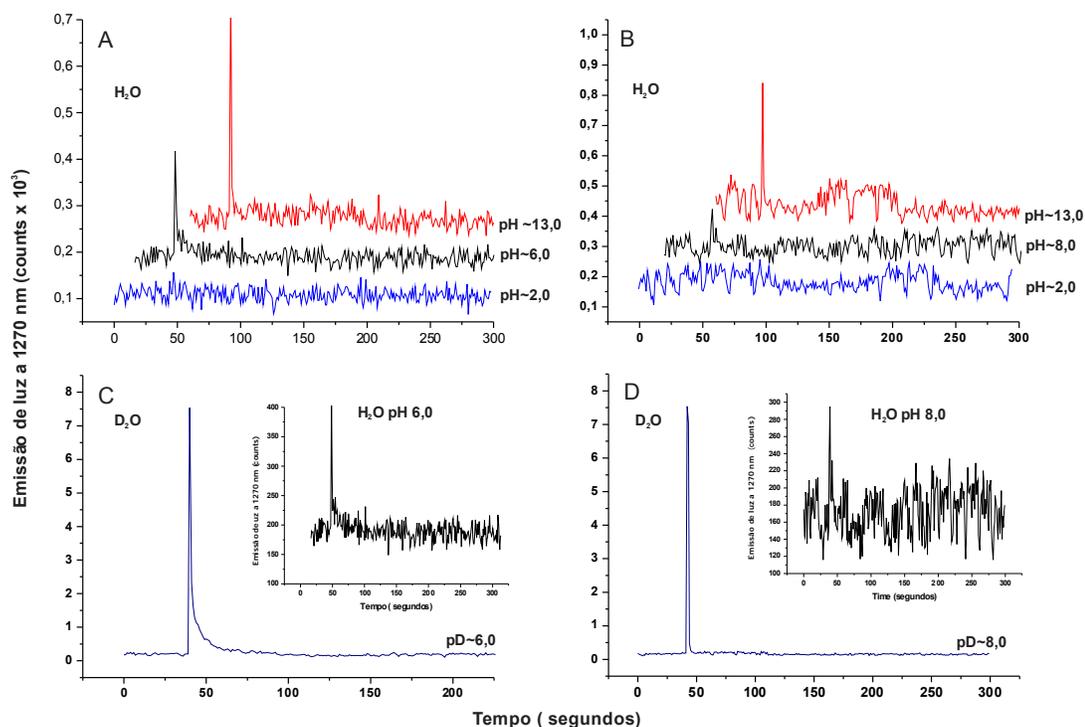


Figura 4.18 – Medidas de emissão luz em 1270 nm das poliaminas concentração final de 0,125 com O₃ com concentração 0,15mM, com adição de H₂SO₄ e NaOH para alterar o pH para 2,0 e 13, respectivamente. (A) Espermina em H₂O e (B) espermidina em H₂O. (C) e (D) apresenta a quimiluminescência em D₂O para espermina e espermidina, respectivamente. As figuras inseridas correspondem ao mesmo experimento em H₂O como comparativo.

4.5 Medidas da emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação dos produtos de reação de O_3 com a dGuo na presença de Ce^{4+} .

Realizou-se medidas de emissão de luz no infravermelho a fim de avaliar a possível formação de O_2 ($^1\Delta_g$) dos produtos da reação da dGuo com O_3 a partir da injeção de Ce^{4+} (cério IV). 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 O_2 ($^1\Delta_g$). O primeiro emite luz na região do azul-verde do visível e o segundo emite na região do vermelho e no infravermelho. A emissão do O_2 ($^1\Delta_g$) na região do vermelho resulta do decaimento bimolecular e a emissão na região do infravermelho resulta do decaimento monomolecular.

O experimento foi conduzido com a injeção de 150 μ L de íons Ce^{4+} 100 mM em uma cubeta com os produtos proveniente da oxidação da dGuo 5 mM pelo O_3 durante 4 minutos e em pH diferente (2,0, 6,0 e 9,0). A figura 4.19 retrata a ausência da emissão de luz em todos os ensaios que foram feito em D_2O .

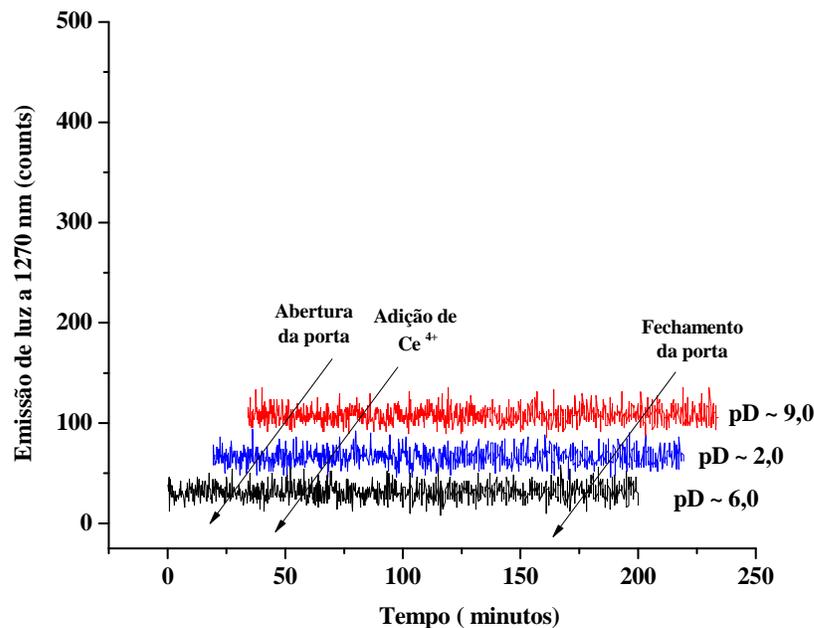


Figura 4.19 - Emissão de luz monitorada no infravermelho próximo - 0,150mL de Ce^{4+} 100mM foi injetado manualmente em uma cubeta contendo 1,35 mL dos produtos de reação de 5 mM de dGuo ozonizada durante 4 minutos em pH 2,0; pH 6,0 e pH 9,0.

4.6 Medidas da emissão bimolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ na reação de O_3 com 2'- desoxiguanosina.

A emissão bimolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ foi monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível a região de 360 a 700nm, utilizando um filtro “cut-off” que deixa passar apenas a luz superior ao comprimento de onda 570 nm para minimizar interferências de outras espécies excitadas. Desta forma, utilizou-se um sistema composto por H_2O_2 e OCl^- , um gerador químico, o qual gera quantidades

estequiométricas de O_2 ($^1\Delta_g$), como padrão de emissão da luminescência no decaimento bimolecular. Conseqüentemente, a figura 4.20 exhibe a quimiluminescência proveniente da adição de uma solução de hipoclorito 50 mM em uma solução contendo peróxido de hidrogênio 50 mM, nota-se a diferença de emissão de luz na presença e na ausência do filtro, o mesmo absorve uma parte da luz. De modo similar foi detectada uma luminescência proveniente da adição de 100 μ L de dGuo (5mM, concentração final 0,5mM) em solução de ozônio 0,15mM contida em uma cubeta com agitação constante, a figura 4.21 expressa a intensidade da emissão de luz realizada na presença e na ausência do filtro “cut-off” 570nm em (A) e (B), respectivamente. Antes de injetar a solução de dGuo a solução de ozônio observa-se uma emissão de luz ao abrir a porta que permite a passagem da luz a fotomultiplicadora.

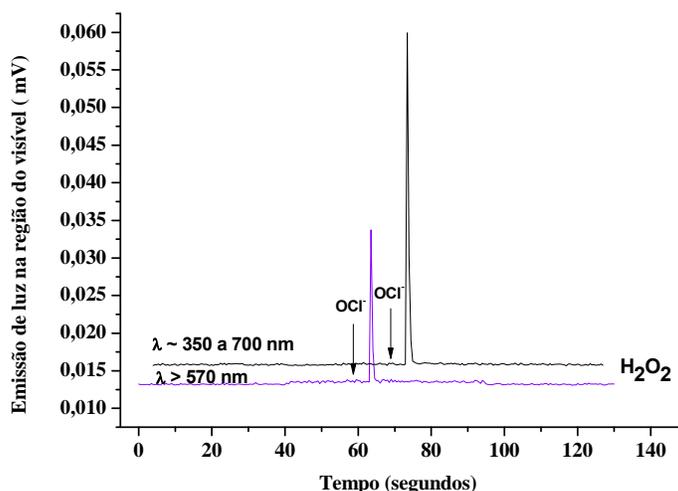


Figura 4.20 – Quimiluminescência adquirida na região do visível proveniente da reação quando o OCl^- 100 μ L 50 mM foi injetado a uma solução de H_2O_2 50 mM contido em uma cubeta, (A) com filtro de corte de 570 nm e (B) sem filtro.

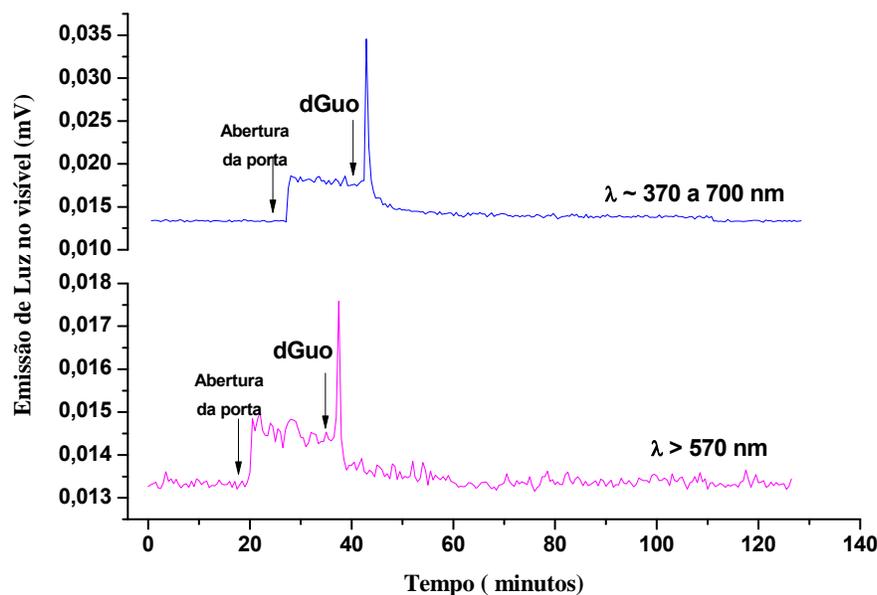


Figura 4.21 – Detecção da emissão luz na região do visível produzida a partir da adição de dGuo 10 mM a uma solução de O_3 0,15 mM em água deuterada, contida em uma cubeta, (A) com filtro “cut-off” de 570 nm e (B) sem filtro.

De forma a proporcionar uma maior superfície para passagem da luz as reações de dGuo com ozônio em H_2O foram analisadas utilizando uma cubeta com volume de 6 mL. O pH (2,0, 6,0 e 9,0) da solução foi variado similarmente aos experimentos conduzidos na detecção de luz no infravermelho. A figura 4.22 retrata uma diferença não significativa nos pH's estudados da intensidades da emissão de luz. Interessantemente a menor intensidade da emissão de luz foi adquirida na reação da dGuo 10 mM com uma solução de ozônio em D_2O .

De forma mais específica, à luminescência no decaimento bimolecular foi adquirida por uma fotomultiplicadora (PMT) juntamente com um monocromador, o qual seleciona o comprimento de onda exato, sendo assim a emissão de luz a 634

nm foi observada quando uma solução de dGuo 1,2 mM foi adicionada a uma cubeta contendo uma solução de ozônio em D₂O pH 6,0, figura 4.23.

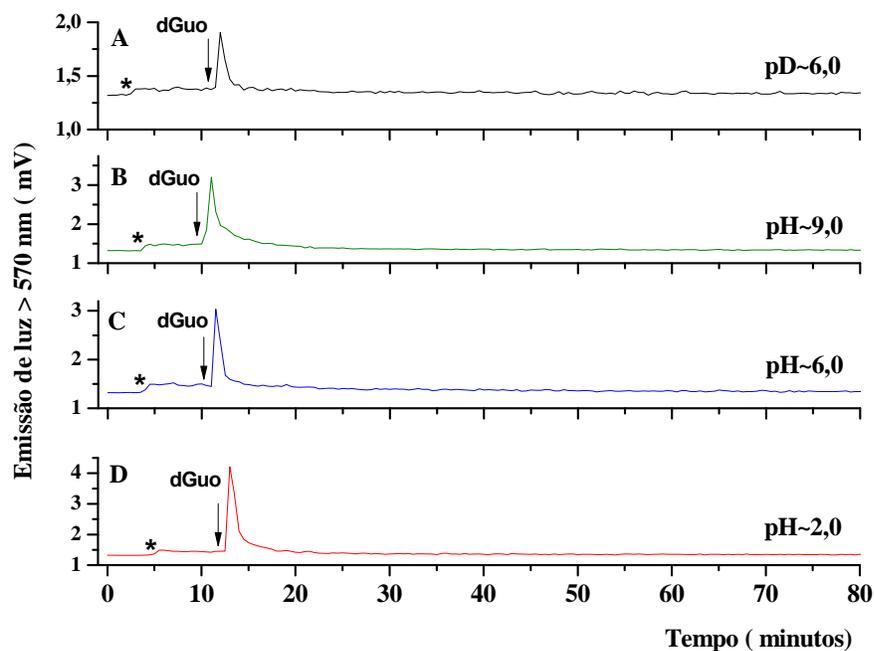


Figura 4.22 – Detecção da medida de emissão luz na região do visível derivada da reação de dGuo 10mM (com concentração final de 0,5mM) com O₃ 0,15 mM com filtro “cut-off”. (A) em pD 6,0 ,(B) pH 9,0 e (C) em pH 6,0 em (D) pH 2,0, somente em (A) foi utilizado D₂O. * indica a abertura da porta.

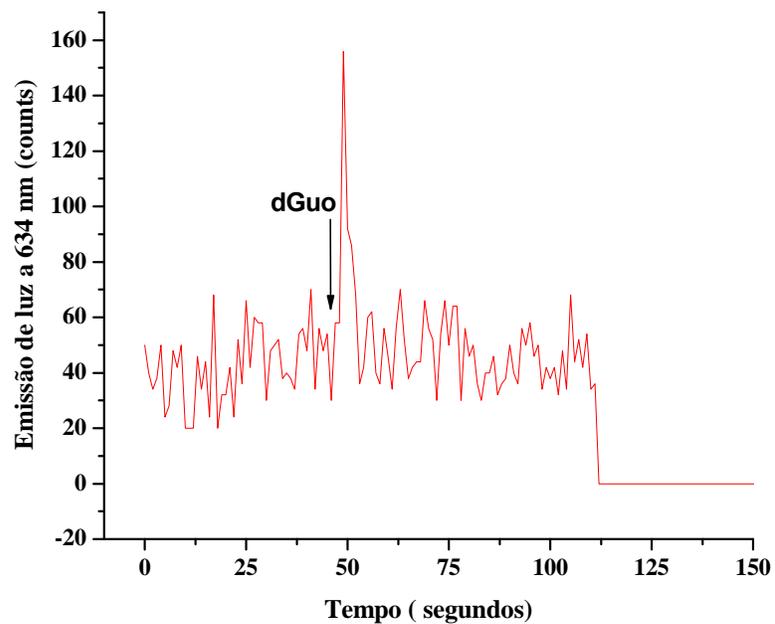


Figura 4.23 – Detecção da luminescência por uma PMT acoplada a um monomador selecionando $\lambda = 634$ nm derivada da adição de 200 μL de dGuo 1.2 mM (com concentração final de 120 μM) em uma cuneta contendo 1.80 mL de O_3 0,15 mM em D_2O . A seta indica o momento da adição da dGuo em pH 6.0.

4.7 Medidas da emissão bimolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ na reação de O_3 com as poliaminas espermina e espermidina.

A luminescência adquirida na transição bimolecular $O_2 (^1\Delta_g) + O_2 (^1\Delta_g) \rightarrow 2 O_2 (^3\Sigma_g^-) + h\nu$ ($\lambda = 634$ e 703 nm) das poliaminas foi adquirida em uma cubeta com volume de 6 mL, deste modo 1,0 mL de uma solução 2,5 mM pH's (2,0, 6,0 e 9,0) de espermina ou espermidina foram adicionadas em uma cubeta contendo 4 mL de ozônio 0,15 mM em H_2O ou D_2O , nas condições já descritas no item 3.12.

Para a espermidina observa-se em pH 8,0 uma intensa emissão de luz quando comparada as outras condições de pH. Interessantemente em pH 13 na condição em que as aminas estão desprotonadas a emissão de luz foi muito baixa quase equivalente ao meio ácido (pH 2,0) (aminas protonadas), portanto não correspondendo ao perfil analisado para a emissão monomolecular (1270 nm). Quando utilizado D_2O o comportamento se mostrou inverso ao esperado, ao compararmos o experimento em H_2O e D_2O há uma diminuição na luminescência quando utilizado D_2O , figura 4.24.

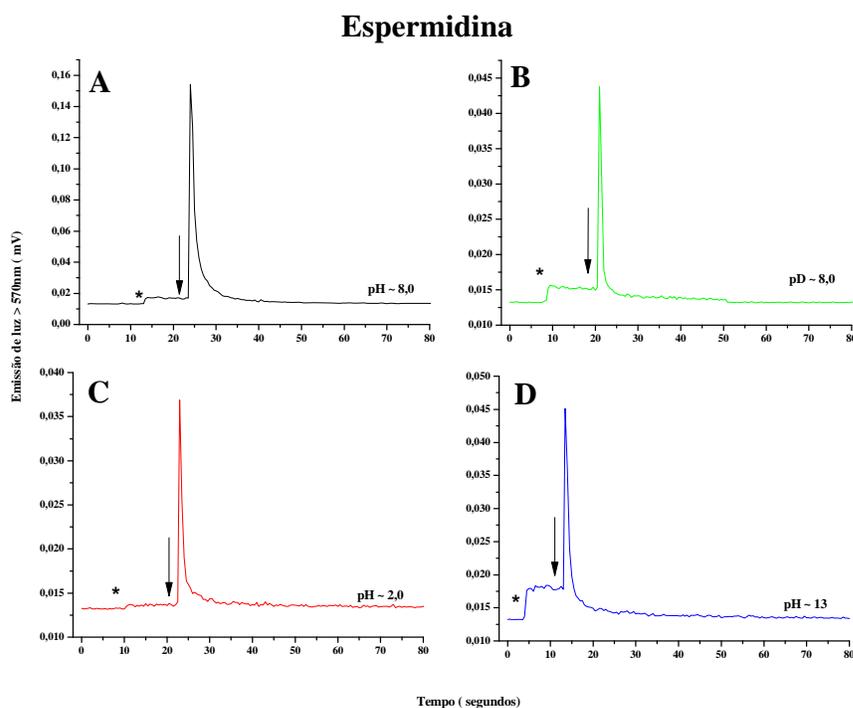


Figura 4.24 – Luminescência proveniente da região vermelha produzida da reação de espermidina 2,5mM (com concentração final de 0,4mM) com O_3 0,15mM, com filtro “cut-off”. (A) em pH 8,0, (B) pD 8,0 e (C) em pH 2,0 em (D) pH 13,0, somente em (B) foi utilizado D_2O . As setas indicam o momento da adição da espermidina e * indica a abertura da porta.

O mesmo experimento foi realizado para espermina com as mesmas condições. Neste caso nota-se uma maior emissão de luz para pH 13 quando comparado ao pH 6,0 o que é condizente com os experimentos da emissão de luz monomolecular. Entretanto em pH 2,0 observa-se uma emissão de luz maior do que em pH 6,0, neste caso o comportamento não era o esperado. Como já foi dito acima as amins estão protonadas e a reação com ozônio se torna mais lenta. Ao utilizar D_2O como solvente, a emissão de luz da espermina possui o mesmo perfil que a

espermidina. A emissão é diminuída, aliás, dentre todas as condições para espermina em D₂O foi onde encontramos a menor emissão de luz, o que não condiz com os experimentos realizados nas medidas de quimiluminescência em 1270 nm, no qual há um aumento da luminescência, figura 4.25.

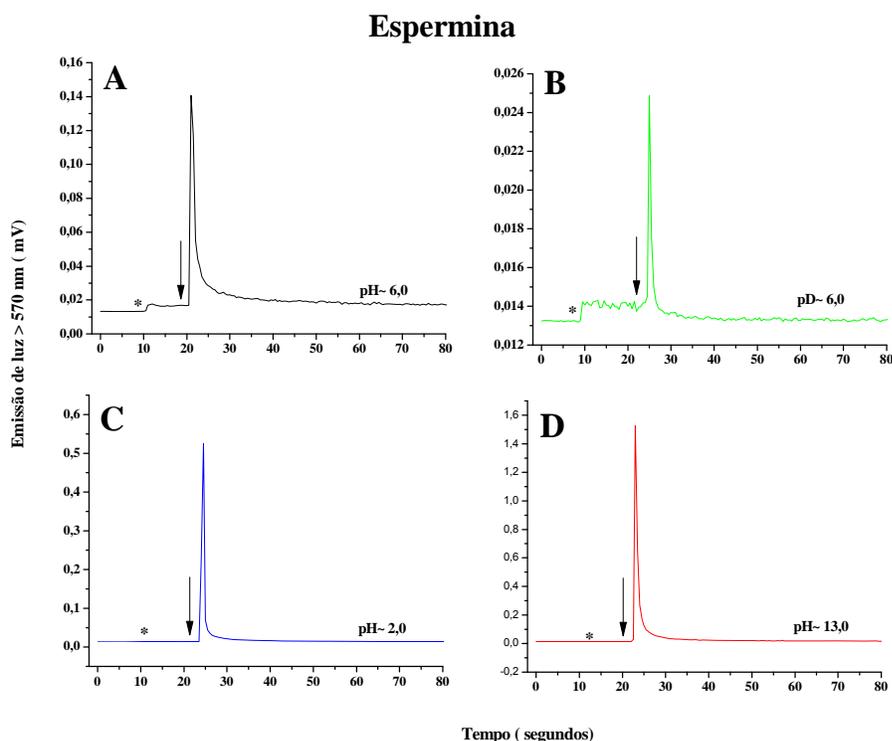


Figura 4.25 – Luminescência proveniente da região vermelha produzida da reação de espermidina 2.5 mM (com concentração final de 0,4 mM) com O₃ 0,15 mM, com filtro “cut-off”. (A) em pH 6,0 ,(B) pD 6,0 e (C) em pH 2,0 em (D) pH 13,0, somente em (B) foi utilizado D₂O. As setas indicam o momento da adição da espermidina e * indica a abertura da porta.

4.8 Quimiluminescências durante a decomposição do ozônio na emissão monomolecular e bimolecular do $O_2 (^1\Delta_g)$ e por espectrometria UV-Visível.

4.8.1 Absorção UV-Visível durante a decomposição do ozônio.

O mecanismo e a cinética de decomposição do ozônio em meio aquoso têm se destacado e motivado numerosos estudos durante as últimas décadas. Acredita-se que o ozônio se decompõe em água pura para formar oxigênio molecular, a velocidade da reação cresce consideravelmente quando o pH é aumentado, e isso é devido ao efeito catalizador dos íons hidroxilas. O mecanismo de destaque inclui reações em cadeias sucessivas produzindo espécies reativas de oxigênio, íon radical superóxido, íon radical ozonida e radical hidroxila que propagam a reação em cadeia. O mecanismo de decomposição está esquematizado nas reações 1.16 a 1.19, (Hoigne, 1984 e 1985).

Desta forma analisamos o tempo de decomposição do ozônio em meio aquoso, em meio ácido (pH= 2,0), com adição de álcool *tert* butílico e em água deuterada medidos por espectrofotometria.

Como sabido os íons hidroxila iniciam a decomposição do ozônio, portanto seria esperado uma menor taxa na velocidade de decomposição em pH 2,0, no entanto constatamos em meio ácido a decomposição é sutilmente mais lenta quando comparado em meio neutro, figura 4,26.

O álcool *tert* butílico é normalmente utilizado nas reações como sequestrador de radical hidroxila para determinar o efeito da velocidade de reação, desta maneira ao adicionarmos álcool *tert* butílico à solução aquosa a decomposição do ozônio

apresenta-se mais lento em relação à água, de tal modo o álcool *tert* butílico reage com os radicais hidroxilas formados, evitando a etapa de propagação da reação de decomposição em cadeia prolongando a meia vida do ozônio.

A cinética de decomposição do ozônio é evidentemente menor quando água deuterada é utilizada. Uma possível explicação para esse fato baseia-se na velocidade de dissociação da H_2O ser cerca de três vezes maior do que D_2O , suas constantes são 1×10^{-14} e $3,0 \times 10^{-15}$, respectivamente. As ligações com próton são rompidas mais facilmente do que as com deutério, sugerindo que a velocidade de reação com os íons hidroxila deuterados são mais lentas e, portanto, a velocidade de formação do $\cdot OD$ é menor, favorecendo uma taxa menor da velocidade da decomposição. A figura 4.26 ilustra claramente o comportamento da decomposição do O_3 nos meios estudados.

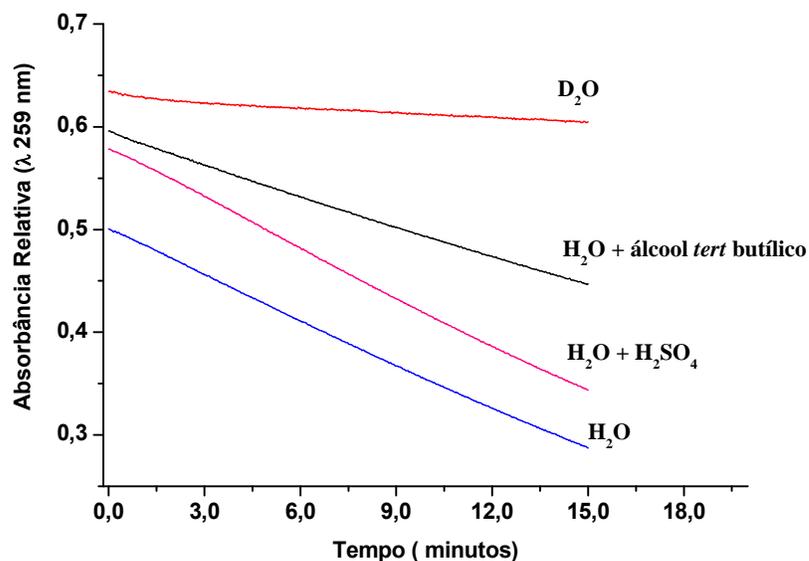


Figura 4.26 – Decomposição do ozônio em solução aquosa, ácida (pH 2,0), com adição de álcool *tert* butílico e em D_2O medidas espectrofotométricas em

$\lambda = 259 \text{ nm}$ a aproximadamente 25°C .

4.8.2 Luminescência durante a decomposição do ozônio

Atualmente sabe-se que uma das espécies intermediárias da decomposição do ozônio em meio aquoso é o O_2^* , o qual pode transferir o seu elétron para o ozônio com uma constante de velocidade de $1,6 \times 10^9$ para formar o ânion radical ozonida que por sua vez é protonado com constante de velocidade $5 \times 10^{10} \text{ L. mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gerando o triofo (HO_3^-) que se decompõe a HO^* e $O_2 (^3\Sigma_g^-)$. Ito *et. al.* (2005) levantou a hipótese do oxigênio molecular formado estar no estado excitado singlete.

Deste modo, avaliamos a luminescência durante a decomposição do ozônio em D_2O e H_2O na região do visível com um filtro “cut-off” 570 nm, o qual permite selecionar a passagem de luz com comprimento de onda superior a 570 nm. A figura 4.27, observa-se uma luminescência durante a decomposição do ozônio de forma mais lenta em meio aquoso, isso se deve pelo fato da decomposição do O_3 ser radicalar. Em D_2O a velocidade de reação é diminuída devido à força de ligação O-D ser maior, assim contribuindo para uma menor velocidade de formação dos íons hidroxilas deuterados, de certa maneira pode haver a estabilização de uma espécie intermediária desconhecida.

Podemos relacionar este evento com a cinética de decomposição analisada no item acima, onde fica claro que o ozônio tem um tempo de vida maior em D_2O , ou seja, sua velocidade de decomposição é menor do que em H_2O . Ressaltando que as reações radicalares possuem três etapas: iniciação, propagação e terminação e na última com a aniquilação do radical poder ser acompanhada de emissão de luz.

Até aqui a luminescência apresentada nos indica a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$, mas não de uma forma tão específica, visto que outras espécies também podem emitir no visível, mesmo utilizando o filtro “cut-off”. De forma mais específica e característica

investigou-se a quimiluminescência na transição monomolecular em 1270 nm durante a decomposição do ozônio. No painel (A) da figura 4.28 apresenta a emissão de luz ao abrir a porta da fotomultiplicadora, observa-se o mesmo perfil de emissão no decaimento bimolecular. No painel (B) ilustra a emissão de luz proveniente da adição de D₂O por uma sonda de polietileno a uma cubeta contendo uma solução de ozônio saturada. Com o intuito de demonstrar a geração de O₂ (¹Δ_g) de forma inequívoca um espectro na faixa de 1150 a 1350 nm foi adquirido, a figura 4.28 (C) e (D) revela o espectro de emissão característico do O₂ (¹Δ_g) em D₂O mais intenso comparando com uma solução de H₂O, respectivamente. A semelhança do espectro obtido pode ser comparada ao espectro adquirido da termodecomposição do endoperóxido 1,4-dimetilnaftaleno, figura 4.4 (B).

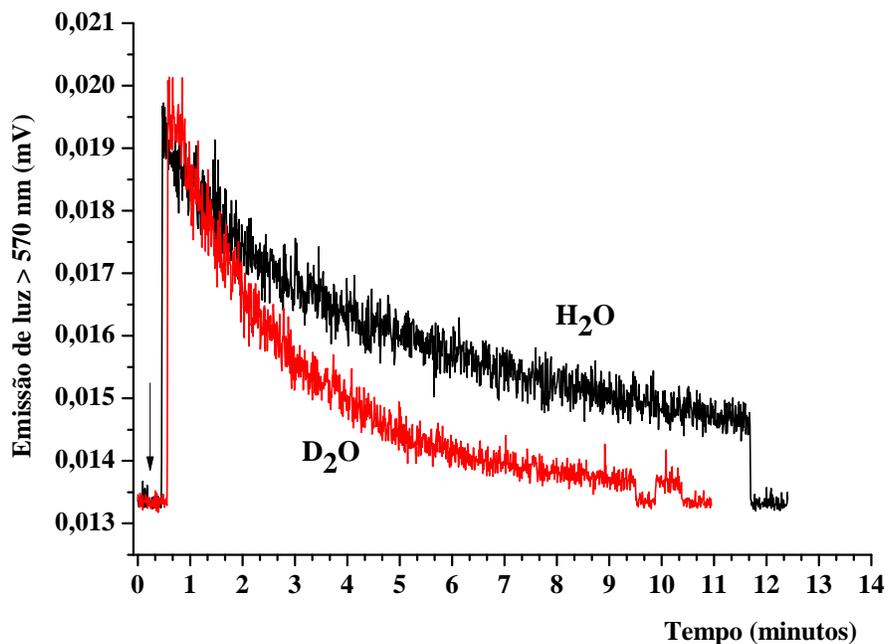


Figura 4.27– Luminescência obtida na transição bimolecular $O_2(^1\Delta_g) + O_2(^1\Delta_g) \rightarrow 2 O_2(^3\Sigma_g^-) + h\nu$ ($\lambda = 634$ e 703 nm) gerada na decomposição de $0,15$ mM de O_3 , na presença do filtro “cut-off” de 570 nm. A seta indica o momento da abertura da porta.

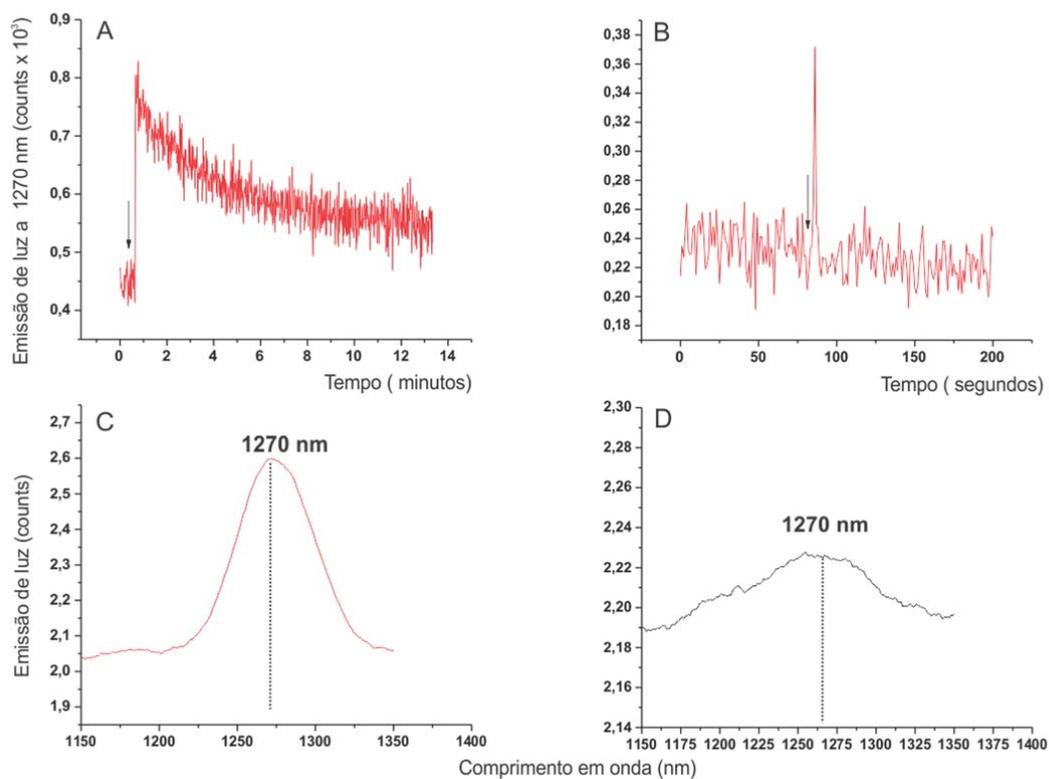


Figura 4.28 – Quimiluminescência detectada na transição monomolecular $O_2 (^1\Delta_g) \rightarrow O_2 (^3\Sigma_g^-)$ em $\lambda=1270$ nm gerada durante a (A) decomposição do O_3 0,15 mM em D_2O , (B) no momento da injeção de 150 μL de D_2O em uma cubeta contendo O_3 saturado em D_2O 0,15 mM. As setas indicam em (A) a abertura da porta e (B) o momento da injeção de D_2O . Espectro de emissão de luz na região do infravermelho emitido durante a decomposição do O_3 em (C) D_2O e (D) em H_2O .

4.9 Caracterização da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com $^{16}\text{O}_3$.

Com a finalidade de se obter mais informações sobre o mecanismo de formação dos produtos e a origem da incorporação do átomo de oxigênio na dGuo foi desenvolvida uma metodologia para a geração de ozônio marcado isotopicamente a partir do $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$). Desta forma a detecção e a caracterização da 8-oxodGuo resultante da oxidação da dGuo pelo O_3 marcado no átomo de oxigênio 16 ou 18 analisado por HPLC/MS/MS por detecção no modo SRM e nas transições escolhidas para os íons com m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ foi $284 \rightarrow 168$ e com acréscimo de duas unidades massa m/z $[(\text{M} + 2) \text{H}]^+$ foi $286 \rightarrow 170$. A figura 4.29 (A) representa a detecção da 8-oxodGuo com a incorporação de um átomo de ^{16}O e (B) ^{18}O , (C) o qual pode ser comparado com um padrão de 8-oxodGuo $10 \mu\text{M}$. A transição escolhida indica a clivagem da ligação *N*-glicosídica.

O mesmo experimento foi feito utilizando outra modalidade de marcação isotópica nos nitrogênios da estrutura, a $^{15}\text{N}_5$ -2'-desoxiguanosina, que foi oxidada com o $^{16}\text{O}_3$. Portanto a $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo foi identificada no meio reacional, a transição escolhida possui o acréscimo de 5 unidades massa referente aos cinco ^{15}N , m/z $[(\text{M} + 5) + \text{H}]^+$ foi $289 \rightarrow 173$, como padrão utilizou a $^{15}\text{N}_5$ -8-oxodGuo 500 pmol , a figura 4.30.

A caracterização da 8-oxodGuo não marcada foi obtida através do espectro de massas da fragmentação do íon precursor m/z 284 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e o íon resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da , m/z 168 referente ao íon fragmento $[(\text{M} - 116) + \text{H}]^+$. Esses fragmentos foram confirmados pela fragmentação da 8-oxodGuo marcada com um átomo de oxigênio-18, com acréscimo de 2 Da do grupo

cetona localizado no carbono 8 e com cinco Da a mais da marcação dos cinco nitrogênio-15. Assim para o íon precursor m/z 286 $[(M + 2) + H]^+$ e $[(M + 2 - 116) + H]^+$ e m/z 289 $[(M + 5) + H]^+$ e $[(M + 5 - 116) + H]^+$, respectivamente, figura 4.31.

De modo que as reações com ozônio em meio aquoso são conhecidas por gerarem espécies reativas intermediárias, desta forma avaliou-se a contribuição da H_2O na formação da 8-oxodGuo a partir da oxidação pelo ozônio-16 na presença de $H_2^{18}O$. A figura 4.32 ilustra a formação da (A) 8-oxodGuo marcada m/z 286 com um átomo de oxigênio-18 perante a formação de (B) não marcada m/z 284 e (C) 8-oxodGuo padrão. Assim as áreas para m/z 284 e m/z 286 são $3,1 \times 10^7$ e $2,20 \times 10^5$, respectivamente, denotando a diferença de aproximadamente 140 vezes mais para a formação de m/z 284.

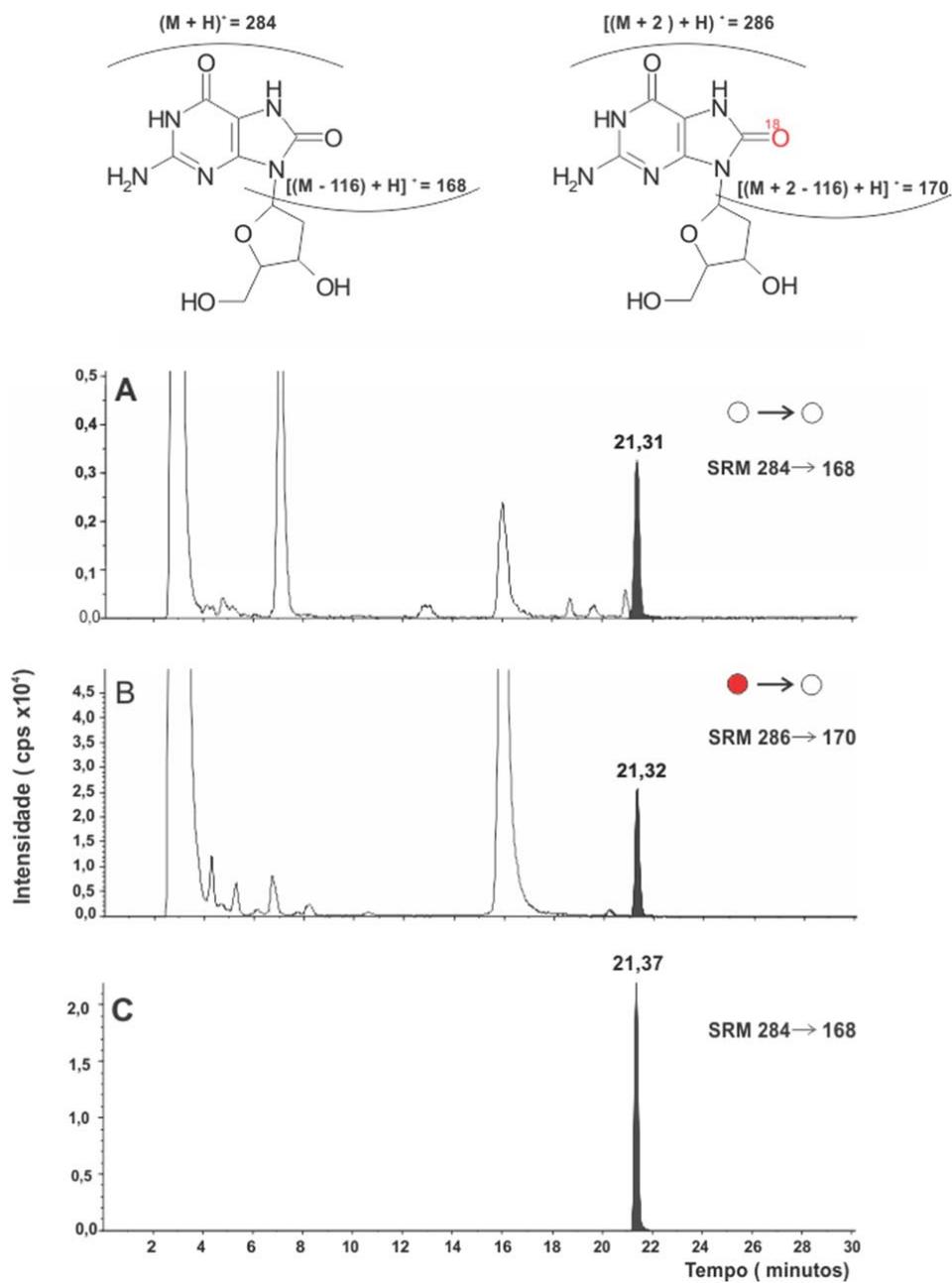


Figura 4.29 - Análise da 8-oxodGuo por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na reação da 2'-desoxiguanosina com (A) $^{16}\text{O}_3$ m/z 284 \rightarrow 168; (B) $^{18}\text{O}_3$ m/z 286 \rightarrow 170 e (C) 8-oxodGuo padrão 10 μM . Legenda: $\circ \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \circ$ referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente.

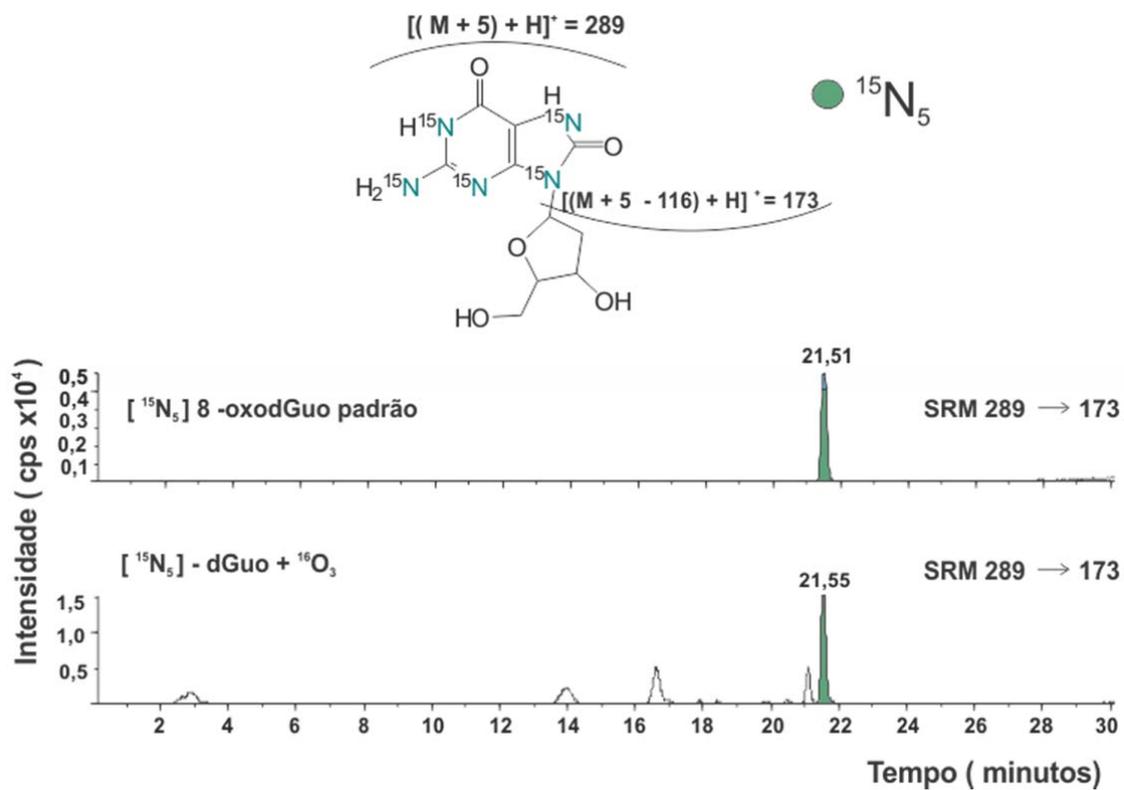


Figura 4.30 - Detecção da 8-oxodGua por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na transição m/z 289 → 173 da reação de $[^{15}\text{N}_5]$ -2'-desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$.

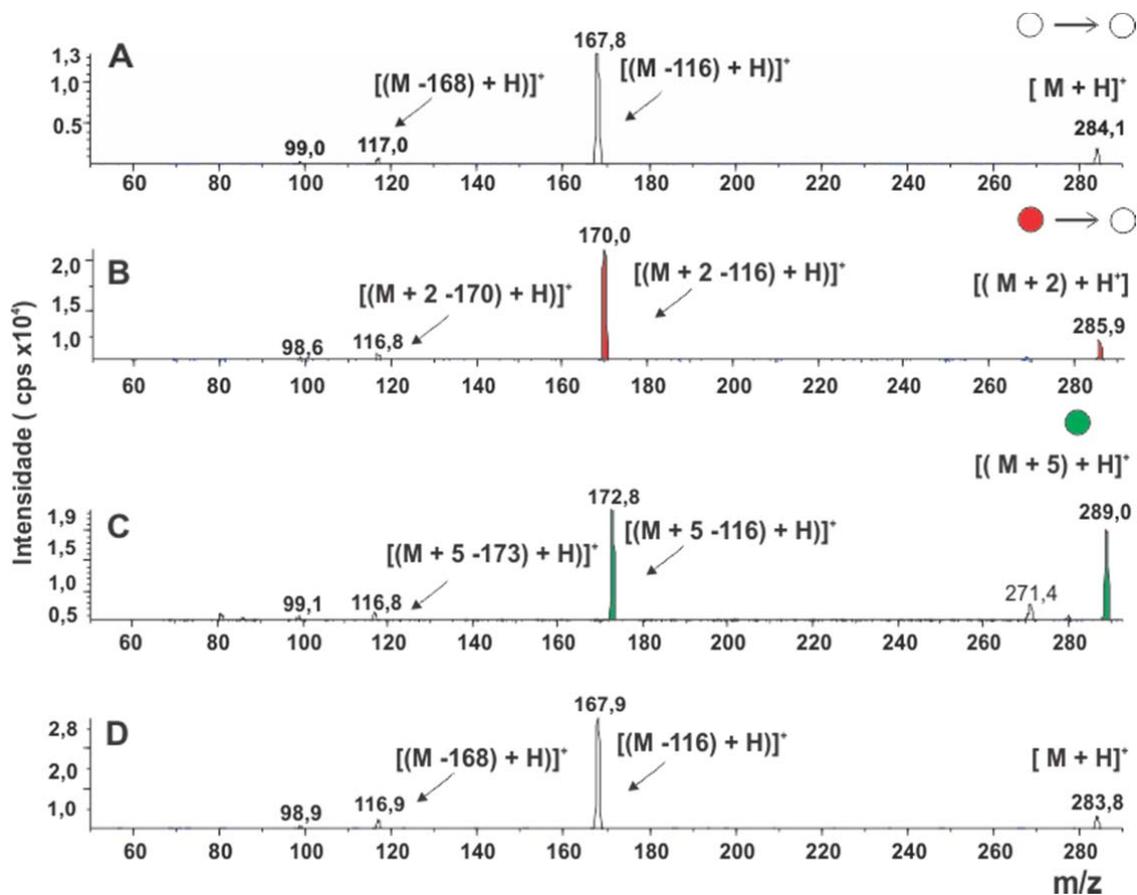


Figura 4.31 - Espectro de massas obtido da 8-oxodGuo por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 2'-desoxiguanosina com (A) ¹⁶O₃ m/z 284; (B) ¹⁸O₃ m/z 286 e (C) da reação com [¹⁵N₅]-dGuo com ¹⁶O₃ m/z 289 e (D) 8-oxodGuo padrão 10 μM.

Legenda: ○ → ○; ● → ○, referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. ● para ¹⁵N₅.

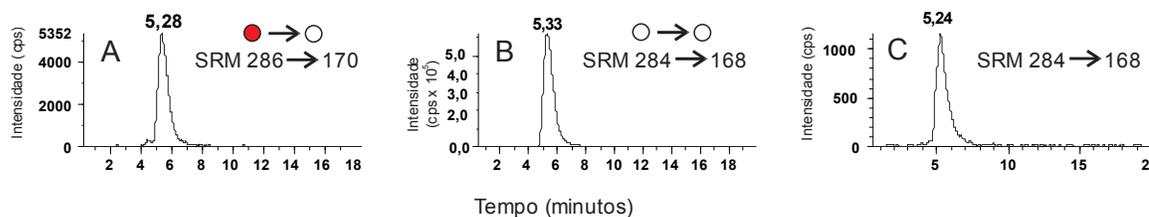


Figura 4.32 - Cromatograma obtido da 8-oxodGuo por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM da reação da 2'-desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$ em H_2^{18}O (A) m/z 286 \rightarrow 170; (B) m/z 284 \rightarrow 168 e (C) 8-oxodGuo padrão. Legenda: ○ \rightarrow ○ e ● \rightarrow ○, referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O . O sistema HPLC foi composto por fase normal com coluna amina constituído de fase móvel 80% metanol e formiato de amônio 10 mM em pH 6.2.

A caracterização da 8-oxodGuo foi feita também por HPLC-MS/MS através da análise do perfil de fragmentação do íon fragmento mais abundante da fragmentação do íon precursor m/z 284, o qual tem como íon fragmento m/z 168. Assim o espectro de fragmentação de m/z 168 possui um íon fragmento mais intenso com m/z 140 referente à perda de CO (28 Da) juntamente com três íons fragmentos de menor intensidade, os quais são caracterizados pela perda de NH_3 (17 Da) originando o fragmento m/z 151 e o íon protonado de massa carga 140 também sofre uma perda de NH_3 e CO formando os íons produtos de m/z 123 e 112. O experimento de marcação isotópica corrobora com a incorporação de um átomo de oxigênio-18 na estrutura da 8-oxodGuo proveniente do $^{18}\text{O}_3$ seu espectro de massas possuem as mesmas fragmentações seguintes: a partir do íon precursor m/z 170 origina [$(M + 2 - \text{NH}_3) + \text{H}$]⁺, [$(M + 2 - \text{C}^{18}\text{O}) + \text{H}$]⁺ e [$(M + 2 - \text{CO}) + \text{H}$]⁺ com m/z 153, 140 e 142, respectivamente. A partir do íon protonado m/z 140 origina [$(M + 2 - \text{C}^{18}\text{O} - \text{NH}_3) + \text{H}$]⁺ com m/z 123.

O perfil de fragmentação da $[^{15}\text{N}_5]$ -8-oxodGuo proveniente da reação da $[^{15}\text{N}_5]$ -dGuo com O_3 confirma as fragmentações observadas acima com acréscimo de 5 Da para o íon produto m/z 173, $[(M + 5) + \text{H}]^+$, o qual origina $[(M + 5 - ^{15}\text{NH}_3) + \text{H}]^+$ e $[(M + 5 - \text{CO}) + \text{H}]^+$ com m/z 155 e 145. A partir do íon protonado m/z 145 origina $[(M + 5 - \text{CO} - ^{15}\text{NH}_3) + \text{H}]^+$ com m/z 127. (figura 4.33).

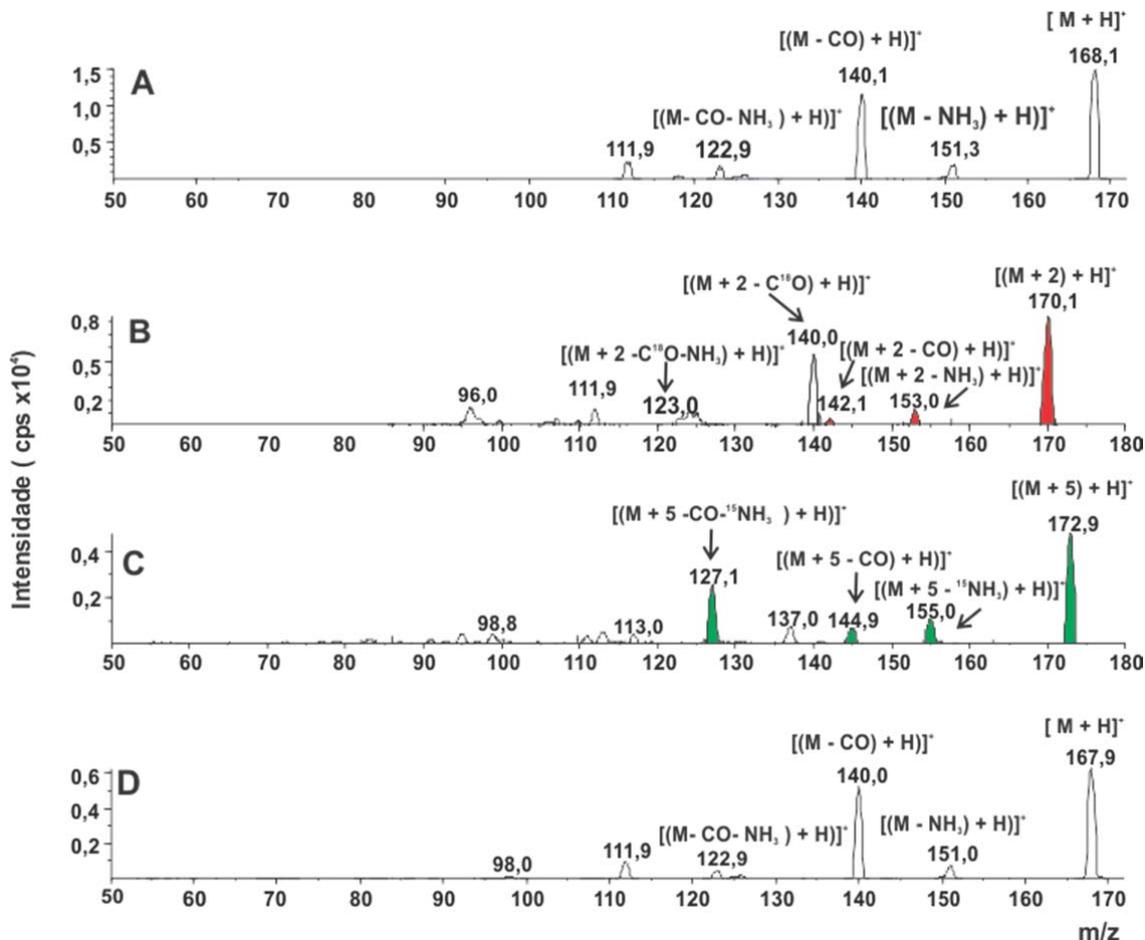


Figura 4.33- Análises da 8-oxodGuo por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 168 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da da fragmentação do íon precursor m/z 284. proveniente da reação de dGuo com (A) $^{16}\text{O}_3$, (B) $^{18}\text{O}_3$ e (C) $[^{15}\text{N}_5]$ -desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$ e (D) 8-oxodGuo padrão. $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$, referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente e \bullet $^{15}\text{N}_4$.

4.10 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína formada na reação da 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por [$^{15}\text{N}_5$]-dGuo com $^{16}\text{O}_3$.

Sabe-se que a dSp é formada através da oxidação por O_2 ($^1\Delta_g$) por duas rotas, a adição de H_2O a um intermediário, Kang e Foote (2002b) e pela adição de duas moléculas de O_2 ($^1\Delta_g$). (Ravanat e Cadet, 1995 e Kang e Foote, 2002b). Tendo em vista estes aspectos e as evidências espectroscópicas da geração de O_2 ($^1\Delta_g$) no decaimento monomolecular das reações de dGuo com ozônio até aqui demonstradas foi investigada a formação da dSp primeiramente partindo da dGuo com objetivo de compor o panorama do mecanismo de reação com ozônio em meio aquoso. Desta forma utilizamos como ferramenta a metodologia para a geração de ozônio marcado isotopicamente a partir do $^{18}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$) como descrito no item 3.15, as análises procederam por HPLC acoplados ao espectrômetro de massas com fonte ESI+ por detecção no modo SRM, as transições específicas da dSp com a incorporação de dois átomo de ^{16}O , dSp com a incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O e dSp com a incorporação de dois átomo de ^{18}O foram $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 4) + \text{H}]^+$ para m/z $300 \rightarrow 184$; $302 \rightarrow 186$ e $304 \rightarrow 188$, respectivamente. As transições escolhidas são referentes à clivagem da ligação N-glicosídica, as quais estão ilustradas na figura 4.34. A figura 4.35 corresponde ao cromatograma no modo SRM obtido das reações da dGuo com ozônio-16 e ozônio-18, o método desenvolvido para o HPLC foi cromatografia de fase normal, sendo a coluna C-NH₂ com fase móvel 80% metanol e 10mM de tampão formiato, portanto nessas condições pode ser visto os dois picos dos diastereoisômeros da dSp, os quais não são vistos quando uma coluna C-18 foi utilizada, conforme descrito por Ravanat e Cadet

(2006). O cromatograma para as transições $[(M + 2) + H]^+$ e $[(M + 4) + H]^+$ está representado na figura 4.36, essa análise foi obtida de uma alíquota tirada do sistema alimentado com ozônio-18 em 20 minutos de forma que a dSp com a incorporação de 2 átomos de ^{18}O é formada em maiores proporções em referência a dSp com m/z 302, as áreas relativas referente ao sinal com tempo de retenção em aproximadamente 3,0 minutos indicam esse fato, $3,36 \times 10^5$ e 4×10^6 unidades arbitrárias. Os sinais com tempo de retenção em 5,40 (X_1) e 6,0 (X_2) minutos possuem a mesma transição indicada para a dSp, os quais serão discutidos mais adiante.

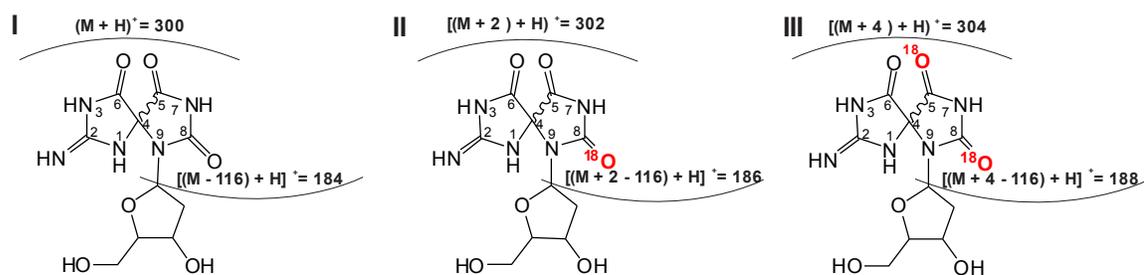


Figura 4.34- Estrutura da dSp nas transições (A) m/z 300 \rightarrow 184; (B) m/z 302 \rightarrow 186 e (C) m/z 304 \rightarrow , $[M + H]^+$; $[(M + 2) + H]^+$; $[(M + 4) + H]^+$ referente ao íon precursor da molécula com a incorporação de (I) dois átomos de ^{16}O , (II) um átomo de ^{16}O e um átomo de ^{18}O e (III) dois átomos de ^{18}O .

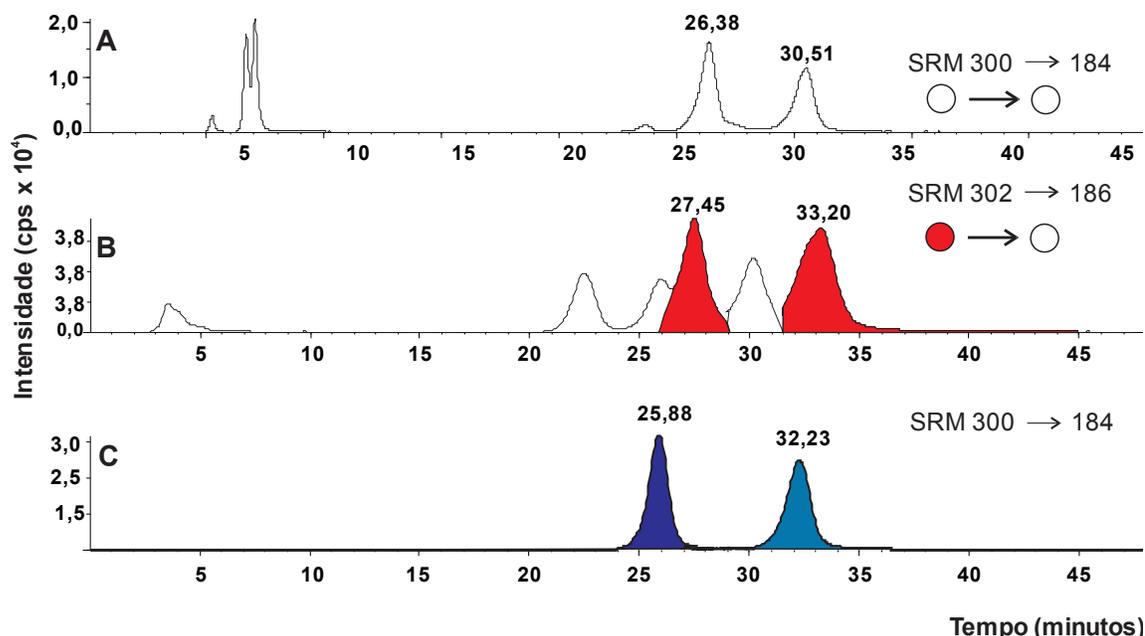


Figura 4.35- Análise da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na reação da 2'-desoxiguanosina com (A) ¹⁶O₃ m/z 300 → 184; (B) ¹⁸O₃ m/z 302 → 186 e (C) dSp padrão 100 μM m/z 300 → 184. ○ → ○ e ● → ○ referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. Condições utilizadas para o HPLC consiste em coluna de amina com fase móvel composta por 80% de metanol e formiato de amônio 10 mM.

Uma vez detectada a dSp formada pelo sistema anteriormente estudado através da marcação isotópica no átomo de oxigênio, a investigação foi composta pelo estudo isotópico da reação da [¹⁵N₅]-2'-desoxiguanosina com o ozônio-16 por HPLC-ESI/MS/MS, sendo assim a transição escolhida [(M + 5) + H]⁺ para m/z 305 → 189, contém cinco Da referente aos diastereoisômeros ¹⁵N₅-dSp, figura 4.37. A escolha da condição cromatográfica está vinculada à modificação da dGuo a ser analisada juntamente com a quantidade de amostra. Nas figuras 4.35 e 4.37 a condição do HPLC escolhida (fase normal) é específica para dSp, de forma que os

sinais de X_1 e X_2 co-eluem e o oposto pode ser visualizado para fase reversa, na figura 4.36 evidenciando um único sinal para os diastereoisômeros da dSp e os dois sinais para X_1 e X_2 .

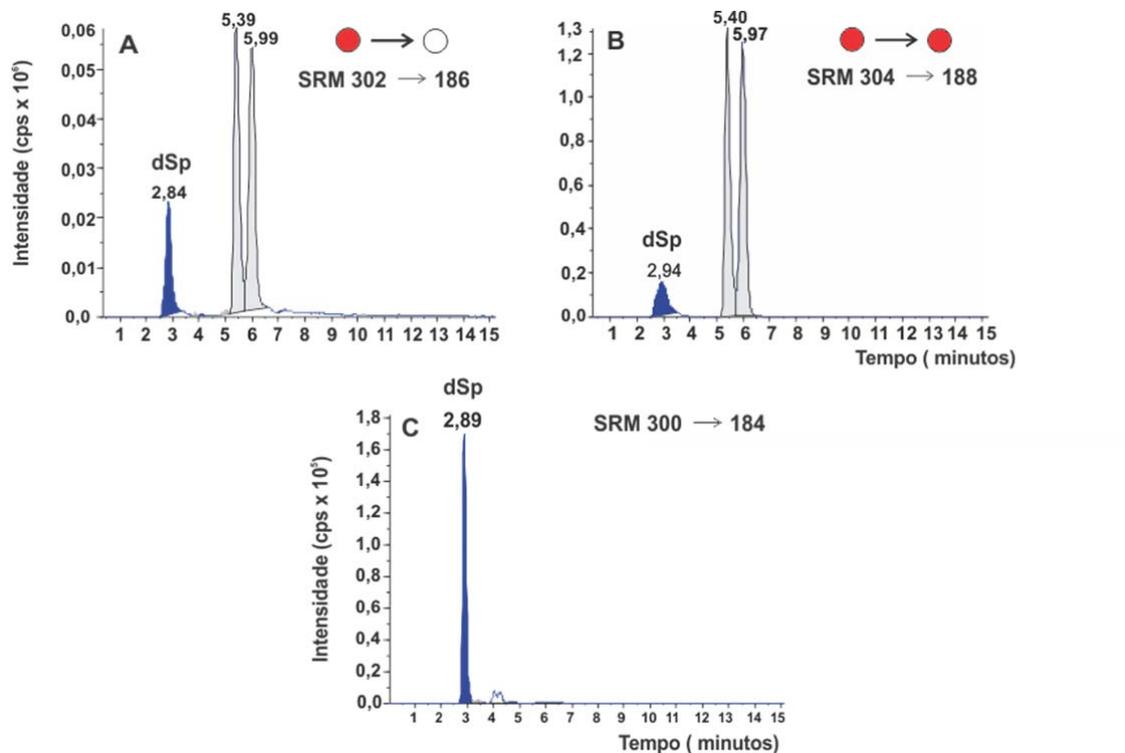


Figura 4.36 - Análise da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na reação da 2'-desoxiguanosina com (A) $^{16}\text{O}_3$ m/z 302 → 186; (B) $^{18}\text{O}_3$ m/z 304 → 188 e (C) dSp padrão m/z 300 → 184 100 μM . $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \bullet$ referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O e dois átomos de ^{18}O respectivamente. Condição utilizada para o HPLC consiste em: coluna C-18 com por um gradiente com fase móvel composta por acetonitrila e 10 mM de formiato de amônio.

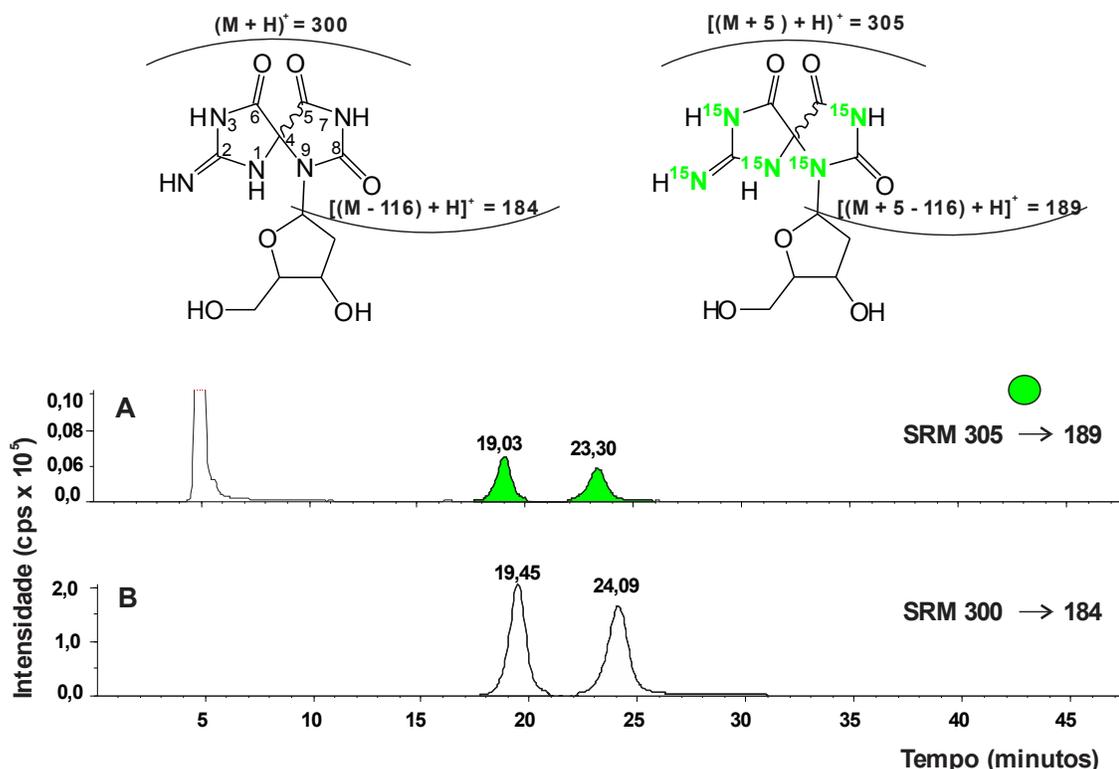


Figura 4.37 - Detecção da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida em (A) transição m/z 305 da reação de $[^{15}\text{N}_5]$ -2'-desoxiguanosina com $^{16}\text{O}_3$ e (B) m/z 300 para dSp padrão $100\mu\text{M}$. Condição cromatográfica: fase normal, coluna NH_2 com fase móvel constituída de 80% metanol e 10 mM de formiato de amônio.

● $^{15}\text{N}_5$ -dSp.

Com base nos resultados obtidos da incorporação do átomo de oxigênio-18 na estrutura da dSp juntamente com os resultados da formação da $^{15}\text{N}_5$ -dSp, suas estruturas foram confirmadas e caracterizadas por análise dos espectros de massas obtido no modo ESI+. O espectro obtido, figuras 4.38 e 4.39, exibe a fragmentação do íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 300 para a molécula não marcada; $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$ e $[(\text{M} + 4) + \text{H}]^+$ para molécula marcada com o incremento de duas e quatro unidades de massas, respectivamente. Os íons fragmentos resultantes da quebra da ligação

N-glicosídica (116 Da – 2-desoxirribose) são observados no espectro de massas correspondente a $[(M - 116) + H]^+$, $[(M + 2) - 116) + H]^+$ e $[(M + 4) - 116) + H]^+$, para *m/z* 184, 186 e 188, respectivamente. Além disso, observa-se para os dois diastereoisômeros da dSp o perfil idêntico de fragmentação, os quais são coerentes aos anteriormente descritos por Ravanat (2006).

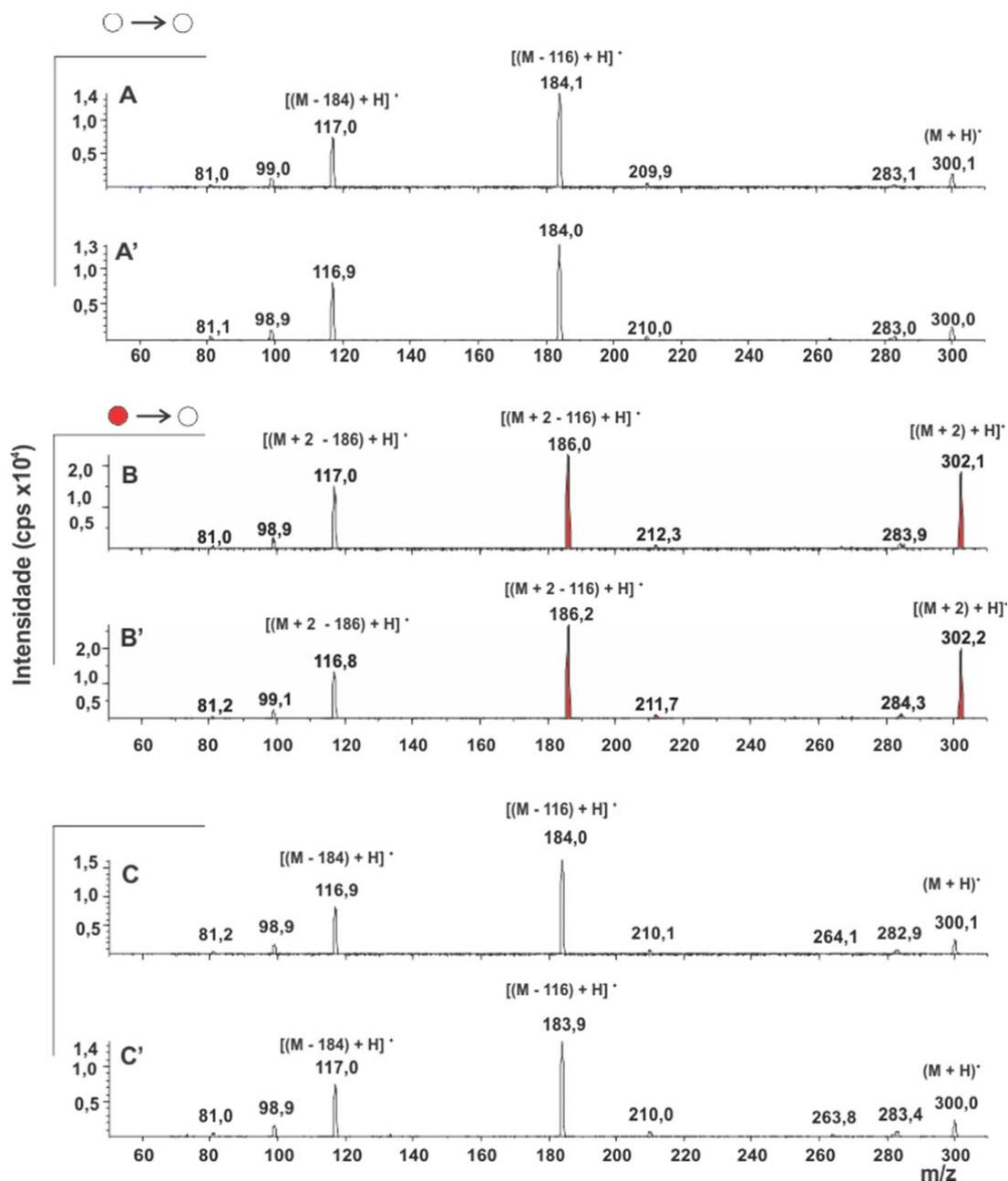


Figura 4.38 - Espectro de massas obtido da dSp por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 2'-desoxiguanosina com (A) e (A') ¹⁶O₃ m/z 300; (B) e (B') ¹⁸O₃ m/z 302 e (C) e (C') dSp padrão m/z 300. Legenda: ○ → ○; ● → ○, referente à incorporação de dois átomos de ¹⁶O e um átomo de ¹⁸O, respectivamente. A terminologia A ; B ; C; refere-se ao diastereoisômero 1 e A'; B'; C' ao diastereoisômero 2.

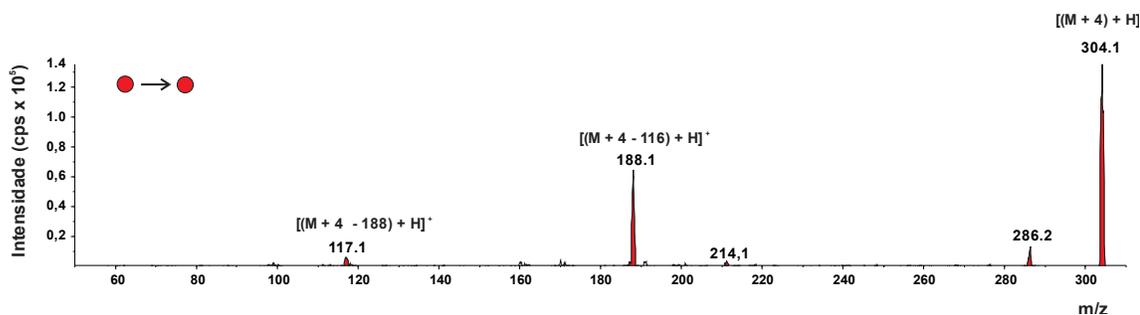


Figura 4.39 - Espectro de massas obtido da $^{18}\text{O}^{18}\text{OdSp}$ por HPLC-ESI/MS/MS da reação da desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$ m/z 304, referente à incorporação de dois átomos de oxigênio-18.

Os diastereoisômeros da $^{15}\text{N}_5\text{-dSp}$ foram igualmente identificados através dos espectros de massas ilustrados na figura 4.40, assim sendo, observou-se os mesmos fragmentos para as análises obtidas para a $^{16}\text{O}^{16}\text{O-dSp}$ e $^{16}\text{O}^{18}\text{O-dSp}$ e $^{18}\text{O}^{18}\text{O-dSp}$ com o incremento de 5 Da a transição $[(M + 5) + H]^+$ m/z 305 corresponde $^{15}\text{N}_5\text{-dSp}$ e $[(M + 5 - 116) + H]^+ = 189$ a quebra da ligação *N*-glicosídica.

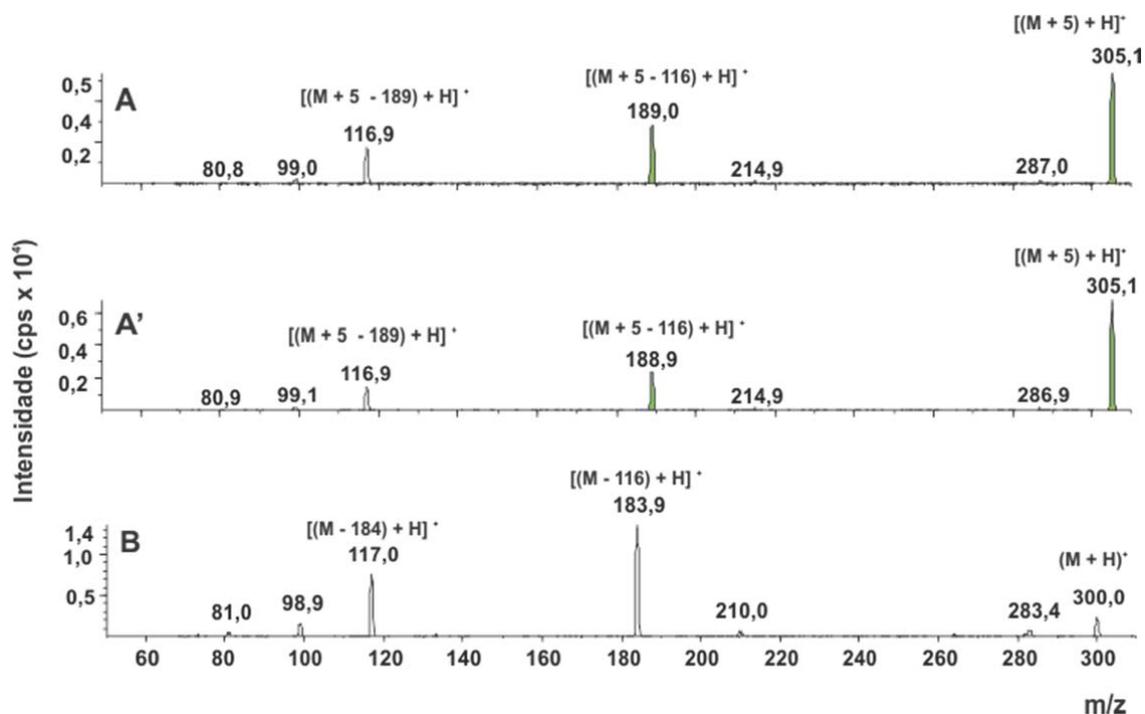


Figura 4.40 - Espectro de massas obtido da ¹⁵N₅-dSp por HPLC-ESI/MS/MS da reação da ¹⁵N₅-desoxiguanosina com ¹⁶O₃ (A) e (A') m/z 305 e (B) dSp padrão m/z 300. ● ¹⁵N₅-dSp ; A ; A' refere-se ao diastereoisômero 1 e 2, respectivamente.

Na primeira identificação da dSp até aqui analisada confirma os fragmentos dos íons precursores referente a perda da 2- desoxirribose resultando na base nitrogenada modificada, o íon produto de maior intensidade correlacionado com a transição [(M -116) H]⁺ m/z 184 e os respectivos acréscimos de massas de acordo com a marcação isotópica estudada. Do mesmo modo para uma identificação inequívoca da geração da dSp proveniente das reações com ozônio, estudamos os padrões de fragmentação no modo MS² obtidos do íon precursor. Assim, de modo geral, o íon precursor foi selecionado em Q1 como filtro de massas assim apenas íons com uma determinada relação m/z tenham trajetórias estáveis. O íon selecionado em Q1 é fragmentado em Q2 e os íons fragmentos são analisados em

Q3. Essencialmente todos os fragmentos são mostrados nos espectros de massas obtidos com realce em cores diferentes correspondentes a cada fragmento da dSp. Entre outros fragmentos são observados como a perda de $[(M - \text{NHCO}) + \text{H}]^+$ e $[(M - \text{CO}) + \text{H}]^+$ para m/z 141 e 156, respectivamente. A maior evidência sobre a estrutura da espiro são os íons fragmentos obtidos com m/z 113 e 114, esses íons correspondem aos dois anéis de cinco membros, um com um grupo imino ($\text{R}_2\text{C}=\text{NH}$) em vez de um grupo $\text{C}=\text{O}$, provenientes de $(M + \text{H})^+$ m/z 184. A figura 4.40 mostra os fragmentos para a dSp padrão e para a dSp proveniente da reação com $^{16}\text{O}_3$. Para $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp o ^{18}O é incorporado especificamente no heterocíclico contendo o grupo $\text{C}=\text{O}$, portanto, o íon fragmento m/z 114 é acrescido de dois Da para m/z 116, figura 4.42. A $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp dupla marcação é observada no anel de cinco membros do grupo $\text{C}=\text{O}$, o fragmento m/z 114 tem o incremento de 4 Da para m/z 188, figura 4.43. Pelos espectros de fragmentação observa-se os íons característicos dos diastereoisômeros da dSp anteriormente descritos por Wenchen Luo (2000) e Glaucia Martinez (2007), inclusive com os incrementos de massa esperados pela incorporação dos átomos de oxigênio-18.

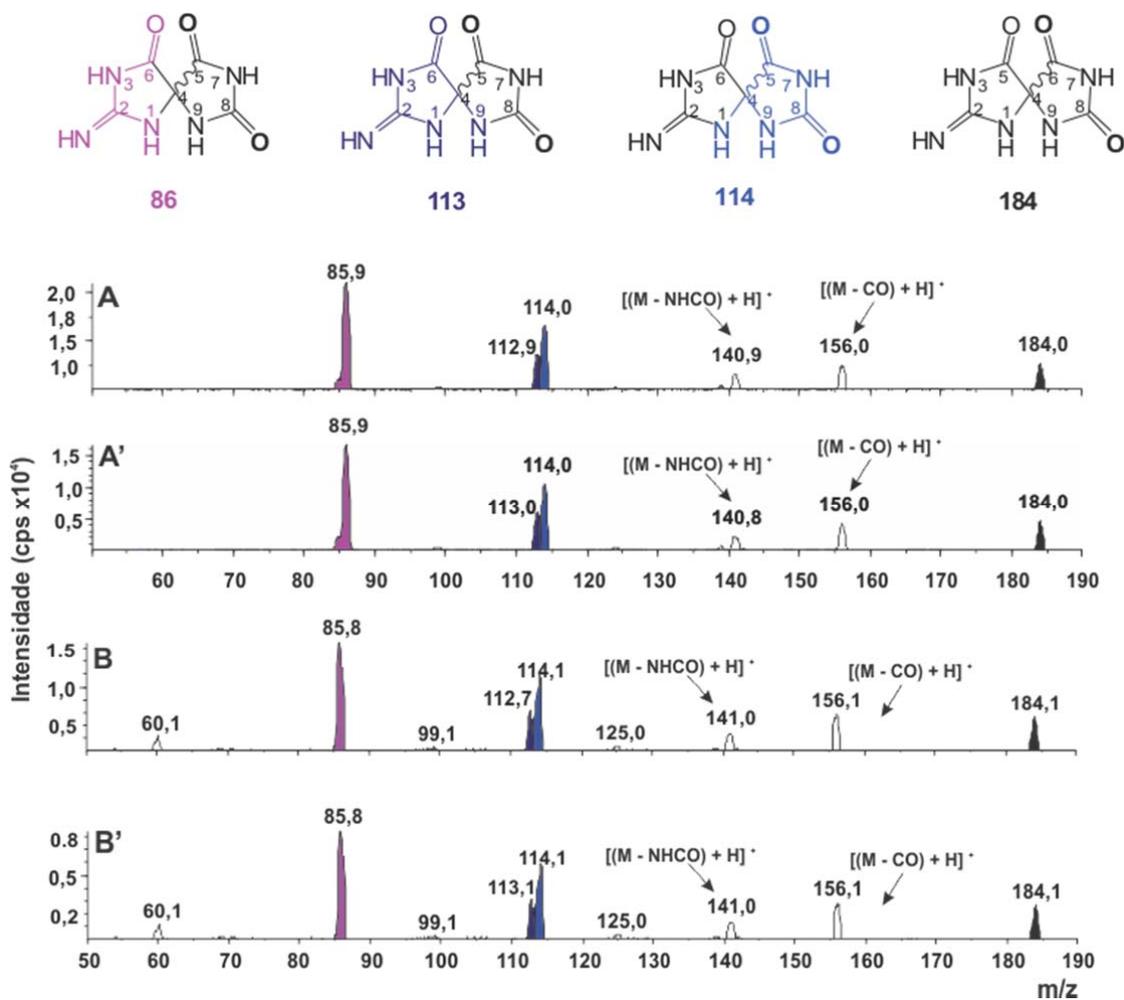


Figura 4.41 - Análise da dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 184 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da a menos da fragmentação do íon precursor m/z 300. (A) e (A') dSp padrão e (B) e (B') dSp proveniente da reação de dGuo com ¹⁶O₃. A terminologia A e B, refere-se ao diastereoisômero 1 e A' e B' ao diastereoisômero 2.

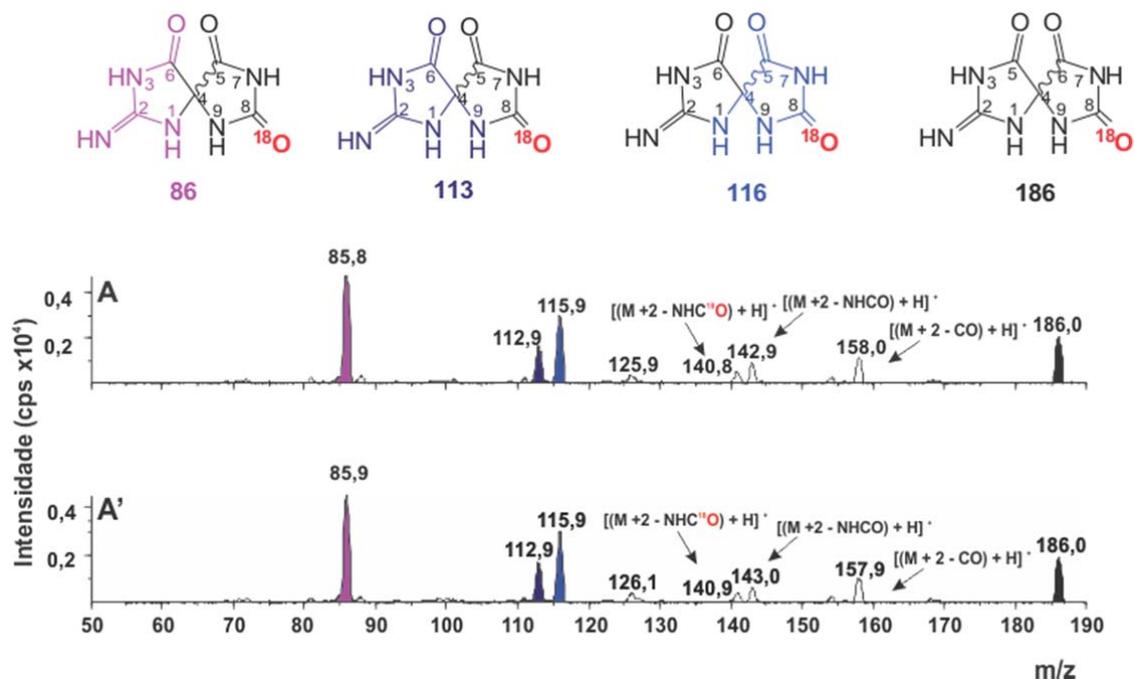


Figura 4.42 - Análise da $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 186 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Dalton a menos da fragmentação do íon precursor m/z 302. (A) e (A') $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp proveniente da reação de dGuo com $^{18}\text{O}_3$. A terminologia A e A', refere-se ao diastereoisômero 1 e 2, respectivamente.

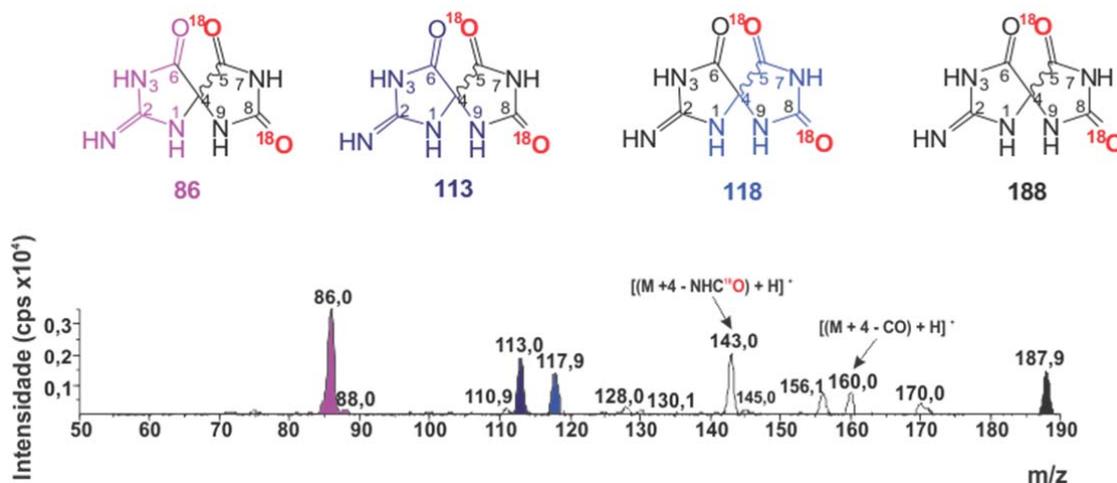


Figura 4.43 - Análise da $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 188 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da a menos da fragmentação do íon precursor m/z 304, proveniente da reação de dGuo com $^{18}\text{O}_3$.

As análises dos íons fragmentos no modo MS^2 para a $^{15}\text{N}_5$ -dSp m/z 189 correspondem igualmente aos íons fragmentos encontrados para os fragmentos descrito acima, deste modo os íons fragmentos que distinguem a estrutura da espiro correspondem aos dois anéis de cinco membros, um com um grupo imino ($\text{R}_2\text{C}=\text{NH}$) em vez de um grupo $\text{C}=\text{O}$, podem ser observados a perda de 72 Da para $[(\text{M} + 5) - (\text{H}_3\text{C}_2^{15}\text{N}_2\text{O}) + \text{H}]^+$ e $[(\text{M} + 5) - (\text{HC}_2^{15}\text{NO}_2) + \text{H}]^+$ equivalem a m/z 117. Os íons fragmentos da dSp não marcada correspondem a perda de 70 e 71 Da para $[(\text{M} - \text{H}_3\text{C}_2\text{N}_2\text{O}) + \text{H}]^+$ e $[(\text{M} - \text{HC}_2\text{NO}_2) + \text{H}]^+$ m/z 114 e 113, respectivamente. Observa-se esses e os outros fragmentos da $^{15}\text{N}_5$ -dSp na figura 4.44, a porção cinza indica a perda dos fragmentos.

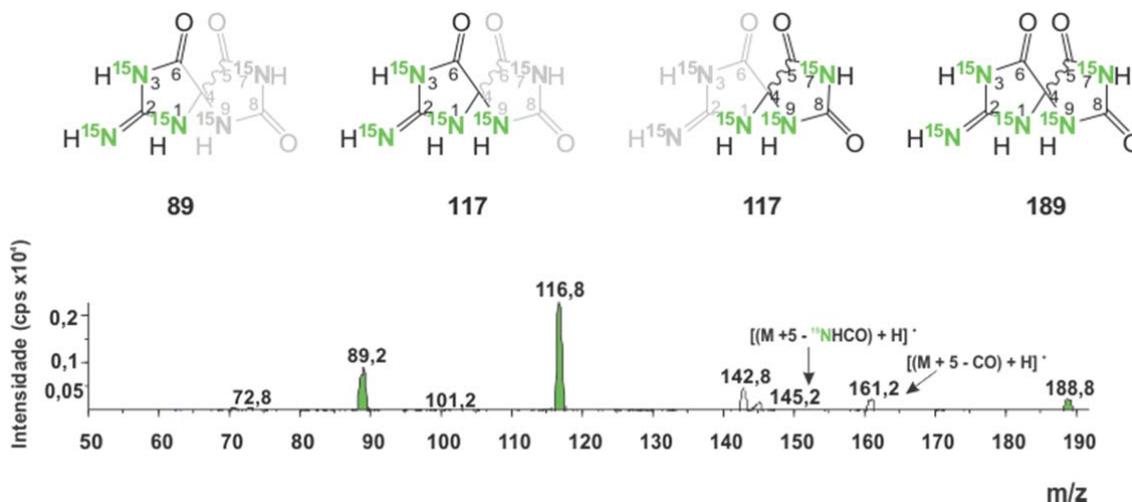


Figura 4.44- Análise da $^{15}\text{N}_5$ -dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 189 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da a menos da fragmentação do íon precursor m/z 305, proveniente da reação de dGuo com $^{16}\text{O}_3$.

Em vista dos resultados obtidos provenientes da reação com o ozônio marcado isotopicamente onde foi constatada a formação da $^{16}\text{O}^{18}\text{OdSp}$ e $^{18}\text{O}^{18}\text{OdSp}$, esses resultados indicam que mais de um mecanismo está implicado na formação da dSp. Durante o curso da reação da dGuo com o ozônio-18 alíquotas foram analisadas por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM nas transições específicas da $^{16}\text{O}^{18}\text{OdSp}$ e $^{18}\text{O}^{18}\text{OdSp}$, dGuo e ^{18}O -8-oxodGuo.

Deste modo a figura 4.45 apresenta um aumento progressivo até 20 minutos da dSp duplamente marcada, após esse período há o declínio de sua formação. No caso da $^{16}\text{O}^{18}\text{OdSp}$ a sua formação mostra ser linear até 45 minutos. A ^{18}O -8-oxodGuo foi possível medir a sua formação em até 20 minutos de ozonização. Visto que a 8-oxodGuo é uma molécula com baixo potencial padrão de redução sendo mais suscetível a oxidação. Acompanhando o gráfico da dGuo observa-se o seu drástico consumo em 30 minutos, levando em conta o poder oxidativo do ozônio, há

outras modificações sendo geradas inclusive as estudadas neste trabalho e outras que serão apenas citadas.

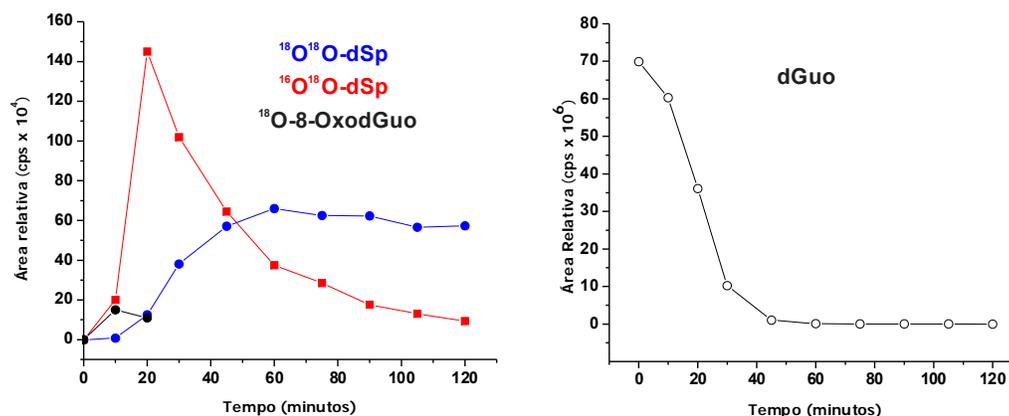


Figura 4.45 Formação de ¹⁶O¹⁸O-dSp e ¹⁸O¹⁸O-dSp durante a reação da dGuo com ¹⁸O₃ durante 120 minutos. O consumo da dGuo durante o curso da reação e a formação da 8-oxodGuo isotopicamente marcada. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM, monitorando as transições 302 → 186 ; 304 → 188 para a dSp, 268 → 152 para dGuo e 286 → 170 para 8-oxodGuo.

A formação da ¹⁶O¹⁸O-dSp com m/z 302 apresenta um perfil independente da dSp duplamente marcada. Assim para atribuir a sua formação a rota de oxidação, tornou-se importante investigar a reação da dGuo com ozônio-16 em H₂¹⁸O. Neste caso a participação da água poderia ser através de um ataque nucleofílico em um intermediário formado da reação ou mesmo pela reação do ozônio com os íons hidroxilas da água, que levaria a decomposição em cadeia, a figura 4.46 denota um aumento gradual da ¹⁶O¹⁸O-dSp até 45 minutos de forma que neste período a sua formação permaneceu constante durante o tempo de análise (120 minutos). Propõe-

se que uma competição estaria ocorrendo entre a oxidação da dGuo que está em baixa concentração e a decomposição O_3 em água.

A reação da dGuo com O_3 em $H_2^{18}O$ resultou na formação de dSp com m/z 300 de forma mais abundante do que a $^{16}O^{18}OdSp$, m/z 302, figura 4.46 (A), deste modo, a água contribui para o mecanismo de formação da dSp por uma rota secundária. Discutindo ainda a formação de m/z 302 avaliamos a possibilidade de haver uma troca entre o ^{18}O da molécula com o ^{16}O da $H_2^{16}O$, uma alíquota foi retirada do sistema contendo dGuo em D_2O e $^{18}O_3$ e analisada por HPLC ESI/MS/MS no modo SRM as transições escolhidas foram m/z 302 e 304, a amostra foi injetada imediatamente e depois de 4 horas, a figura 4.46 (B) mostra que não houve um aumento na formação de m/z 302 em função da troca de m/z 304 por ^{16}O da H_2O . Interessantemente m/z 304 se mostrou instável durante o período de análise, contudo não houve a troca dos dois átomos de oxigênio-18, pois a transição m/z 300 \rightarrow 184, qual se refere à dSp não marcada não foi detectado nenhum sinal, levando a conclusão que nenhuma troca ocorreu. Esses resultados estão de acordo com a publicação de McCallum *et. al.*, 2004. De forma que foi apontado uma única possibilidade de troca durante a redução da 5-OOH-8-oxodGuo para gerar 5-OH-8-oxodGuo que origina a espiro, a troca de água pode ocorrer rapidamente com o hidroperóxido ou com o grupo hidróxi na posição 5, os quais são esperados serem bastante labéis à hidrólise. Uma vez que a 5-OH rearranja a espiro com constante de velocidade de $2.24 \times 10^{-4} s^{-1}$.

Uma vez estabelecida a participação da água na formação da dSp, de forma clássica estimou-se a contribuição do $O_2 (^1\Delta_g)$ na sua formação, as reações da dGuo 5mM foram analisadas em D_2O e H_2O ozonizadas por 5 minutos em um fluxo de 6 mL por minuto, sendo assim a transição escolhida foi m/z 300 \rightarrow 184 para

ambos os sistemas. Considerando o eixo da ordenada (y) na figura 4.47 observa-se uma intensidade do sinal para os diastereoisômeros da dSp cerca de dez vezes maior em (A) nas reações conduzidas em D₂O comparando com (B) em H₂O, o qual expressa fortemente a contribuição O₂ (¹Δ_g) e (C) destaca a área relativa.

Desta maneira, abrindo mais uma possibilidade de rota da formação da dSp. Os diastereoisômeros da dSp são produtos característicos do O₂ (¹Δ_g) provenientes da oxidação da dGuo, Niles *et al.*, 2001, e em menores proporções a 8-oxodGuo (Buchko *et al.*, 1995; Ravanat e Cadet; 1995; Martinez, 2003). Logo, através da oxidação da dGuo com uma fonte química de O₂ (¹Δ_g) o DHPN¹⁸O₂ detectamos a formação da dSp, figura 4.48, a predominância da não marcada pode ser explicada pela presença de ¹⁶O₂ dissolvido, uma vez que o ¹⁸O₂ (¹Δ_g) gerado pode transferir sua energia para o ¹⁶O₂ (³Σ_g⁻), Martinez *et al.*, 2004.

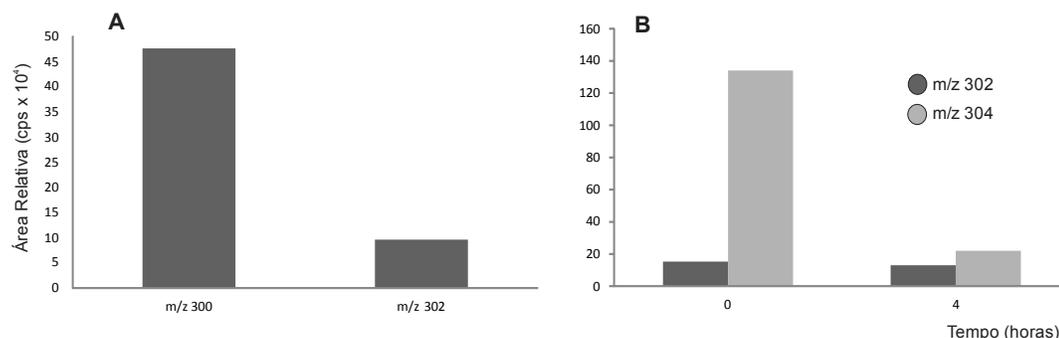


Figura 4.46- (A) Formação de dSp m/z 300 e ¹⁶O¹⁸OdSp m/z 302 e durante a reação da dGuo com ¹⁶O₃ em água-18. (B) Avaliação da troca do ¹⁸O pelo ¹⁶O derivado da H₂¹⁶O, monitorando a transição m/z 302 e m/z 304 provenientes da reação da dGuo em D₂O com ¹⁸O₃ nos tempos 0 e 4 horas. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM.

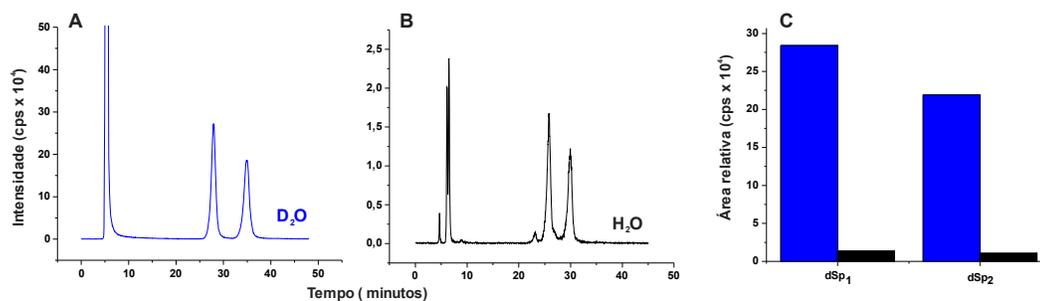


Figura 4.47- Cromatograma exibe a detecção da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na transição m/z 300 \rightarrow 184 da reação da dGuo com $^{16}\text{O}_3$ nos solventes (A) D₂O e (B) H₂O. Em (C) mostra a área relativa dos diastereoisômeros da dSp, a cor azul refere-se o uso de D₂O e a preta em H₂O. Condição cromatográfica composta por fase normal, coluna NH₂ com fase móvel constituída de 8% metanol e 10 mM formiato de amônio.

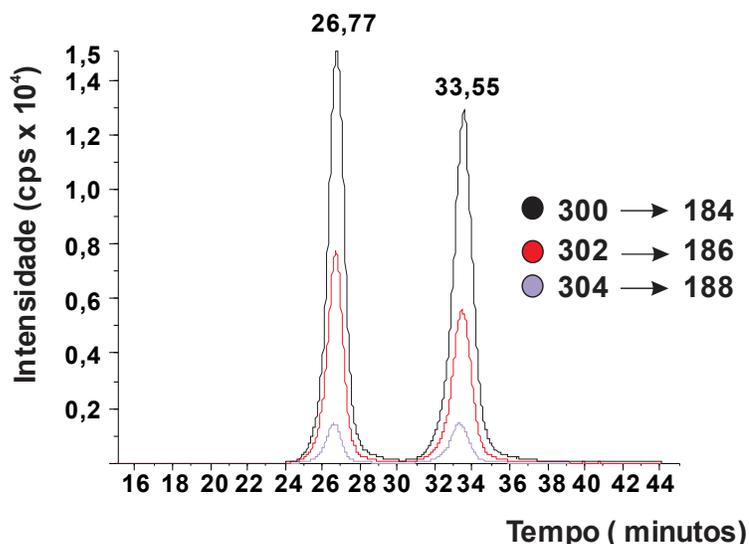


Figura 4.48- Detecção da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM da oxidação da dGuo por DHPN¹⁸O₂. Condição cromatográfica composta por fase normal, coluna NH₂ com fase móvel constituída de 8% metanol e 10 mM de formiato de amônio.

4.11 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína formada na reação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e 8-metoxi-2'-desoxirribose com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$.

Tendo em vista as evidências da formação da 8-oxodGuo isotopicamente marcada com oxigênio-18 derivado do ozônio-18 e a formação da dSp duplamente marcada, verificou-se a possibilidade da formação da dSp proveniente da ozonização da 8-oxodGuo. Com intuito de compor a hipótese do mecanismo de reação da dGuo com ozônio em meio aquoso. Essencialmente os experimentos foram conduzidos igualmente aos já mostrados para as reações da dGuo. Sendo assim utilizou-se a metodologia de geração do $^{18}\text{O}_3$ para as reações, as quais foram analisadas por HPLC acoplado a espectrometria de massas. A figura 4.49 destaca a detecção da dSp obtida no modo SRM nas transições m/z 300 \rightarrow 184 e 302 \rightarrow 186, não foi detectado 304 devido o carbono 8 da 8-oxodGuo possuir o grupo $\text{C}=\text{O}^{16}$. As estruturas das transições específicas da dSp podem ser lembradas na figura 4.34. Nas transições analisadas é importante notar a ausência dos produtos X_1 e X_2 anteriormente detectados nas reações da dGuo nas mesmas transições da dSp, os quais serão discutidos mais a frente.

A caracterização da dSp foi feita por análise dos espectros de massas obtidos no modo ESI+, de modo que, a fragmentação do íon precursor $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 300 para a molécula não marcada; $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$ m/z 302, refere-se a clivagem da ligação *N*-glicosídica, exibem exatamente os mesmo íons fragmentos comparados aos espectros obtidos da reação da dGuo e com os espectros publicados por Ravant (2006), figura 4.50.

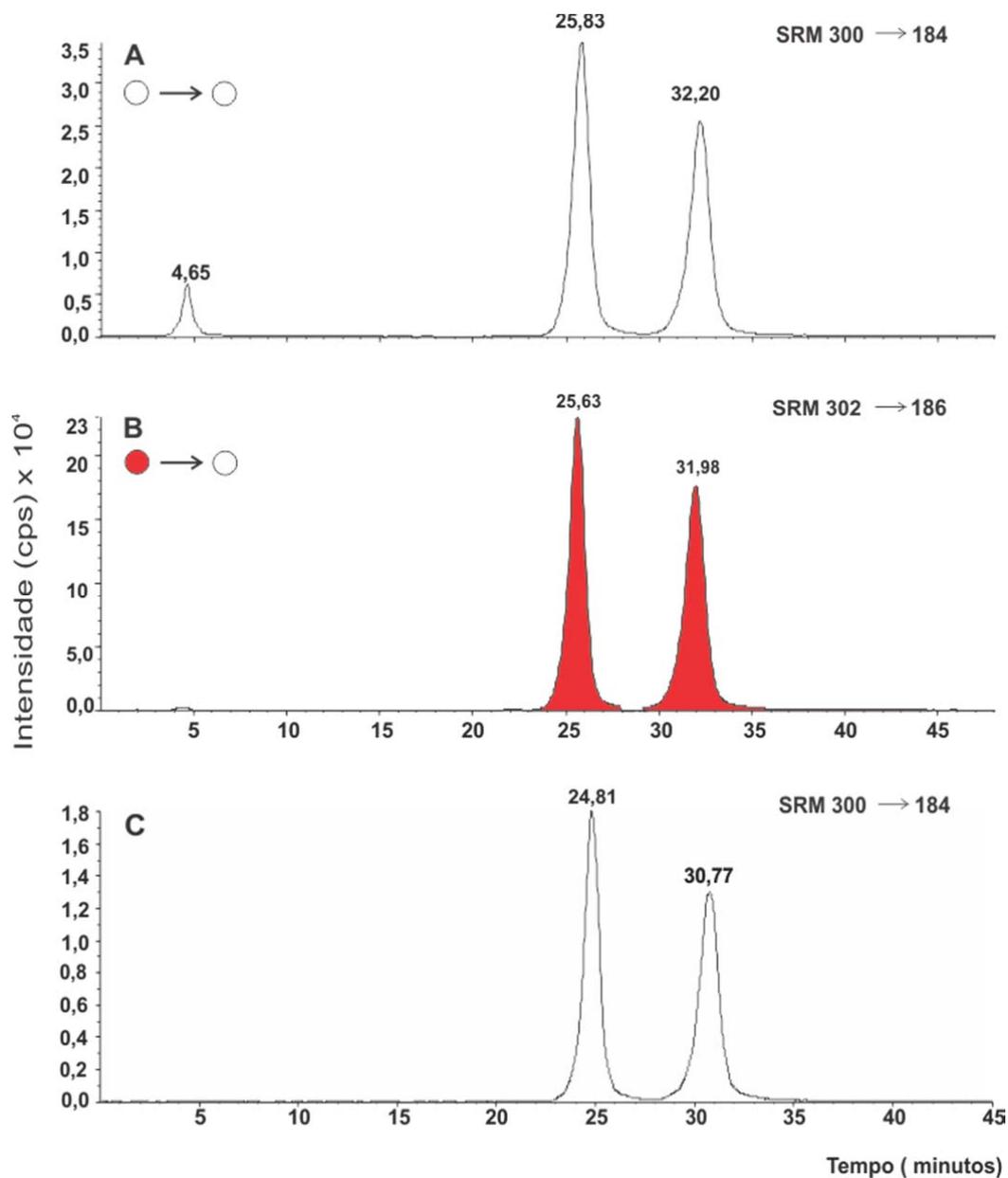


Figura 4.49- Análise da dSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida na reação da 8-oxodGuo com (A) ¹⁶O₃ m/z 300 → 184; (B) ¹⁸O₃ m/z 302 → 186 e (C) dSp padrão 100µM. Legenda: ○ → ○ e ● → ○ referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. Condições utilizadas para o HPLC consiste em coluna NH₂ com fase móvel composta por 80% de metanol e formiato de amônio 10mM.

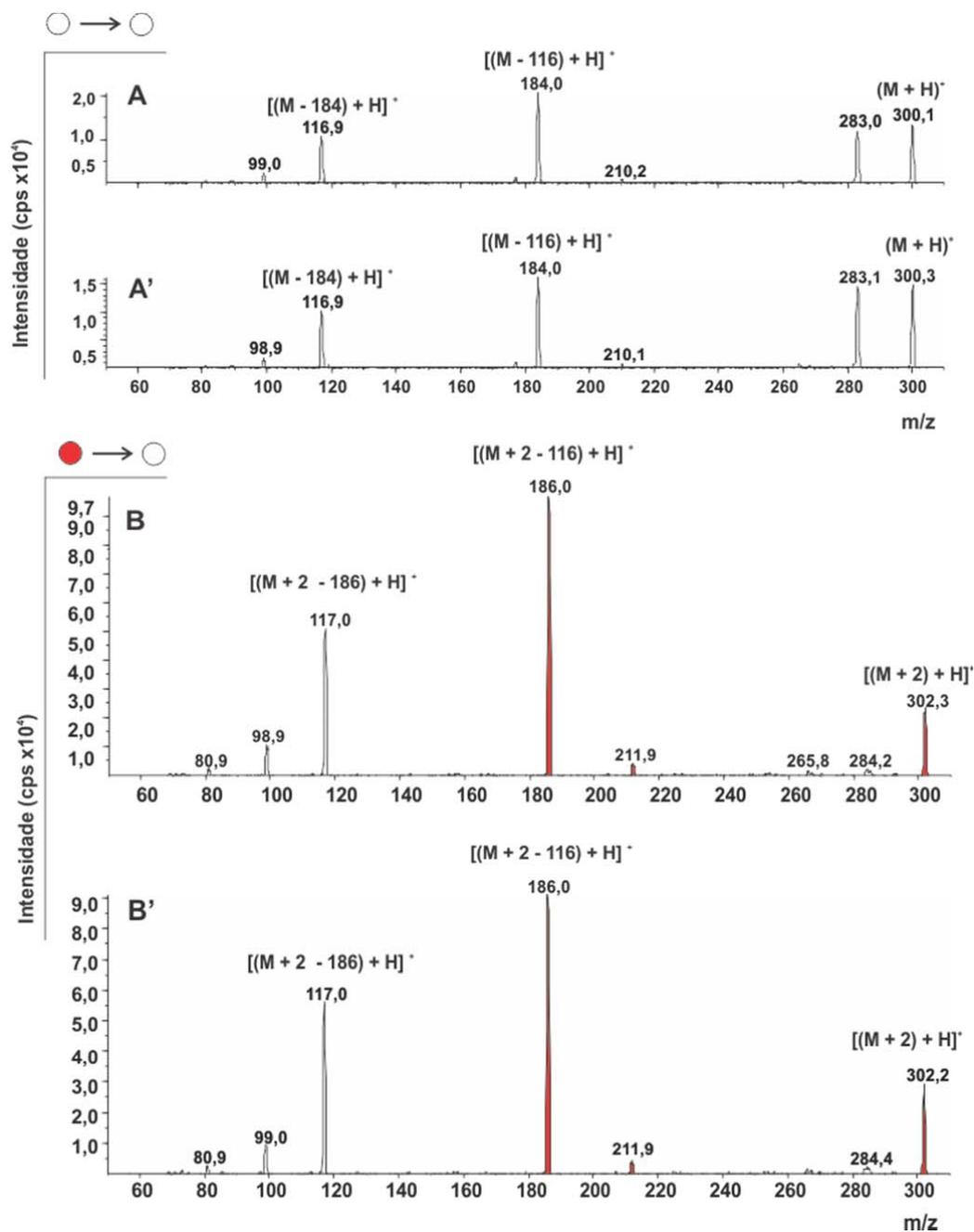


Figura 4.50 - Espectro de massas obtido da dSp por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 8-oxodGuo com (A) e (A') ¹⁶O₃ m/z 300; (B) e (B') ¹⁸O₃ m/z 302 e (C) .

Legenda: $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$, referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. A terminologia A e B referem-se ao diastereoisômero 1 e A' e B' ao diastereoisômero 2.

De forma mais criteriosa na caracterização da dSp proveniente da oxidação da 8-oxodGuo foi feito um estudo das fragmentações do íon produto com m/z 184 e 186, os quais foram gerados pela quebra da ligação N-glicosídica, $[(M - 116) + H]^+$ = 184 e $[(M + 2) - 116] + H]^+$ = 186. Os espectros foram igualmente adquiridos ao modelo descrito acima. Sendo assim observam-se nas figuras 4.51 e 4.52 os espectros de massas referentes ao íon fragmento m/z 184 e 186, respectivamente. A maior evidência sobre a estrutura da espiro não marcada são os íons fragmentos obtidos com m/z 113 e 114 e para a marcada isotopicamente em um átomo de oxigênio são m/z 113 e 116, esses íons correspondem aos dois anéis de cinco membros. Entre outros fragmentos observa-se a perda de $[(M - NHCO) + H]^+$ e $[(M - CO) + H]^+$ para m/z 141 e 156; $[(M + 2) - NHCO] + H]^+$ e $[(M + 2) - CO] + H]^+$ para m/z 143 e 158, respectivamente. Esses fragmentos estão de acordo com os espectros publicados (Martinez *et. al.*, 2007) e também com os fragmentos obtidos no modelo de oxidação da dGuo pelo $^{18}O_3$. Luo *et. al.*, 1999 demonstrou a oxidação da 8-oxodGuo não marcada por um elétron com água-18 resultou na formação de $^{16}O^{18}OdSp$ através de um ataque nucleofílico da $H_2^{18}O$ em um intermediário de reação. Em nosso modelo de estudo com o $^{18}O_3$ constatamos que além da transição m/z 302 para a dSp marcada a transição m/z 300 é vista em menores proporções cerca de 10 vezes menor, a área relativa é mostrada na figura 4.53. O cromatograma obtido por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM para as duas transições acima é mostrado na figura 4.54 (A), nota-se uma pequena contribuição da H_2O . De forma a nos conduzir a uma ideia mais apropriada da participação da água em nosso modelo, a oxidação da 8-oxodGuo 5mM foi conduzida em $H_2^{18}O$ com $^{16}O_3$ por 5 minutos, do mesmo modo o cromatograma da figura 4.54 (B) mostra um sinal bem intenso para a transição m/z 300 o que nos leva a acreditar em uma pequena

participação da água com um mecanismo secundário, talvez a diferença da formação de m/z 300 no modelo com $^{18}\text{O}_3$ seja maior ao comparar m/z 302 com a H_2^{18}O devido ao tempo de ozonização, uma vez que o primeiro a reação prosseguiu por 5 horas enquanto o segundo por 5 minutos, analisando esse aspecto a competição por outros mecanismos de oxidação se tornam viáveis.

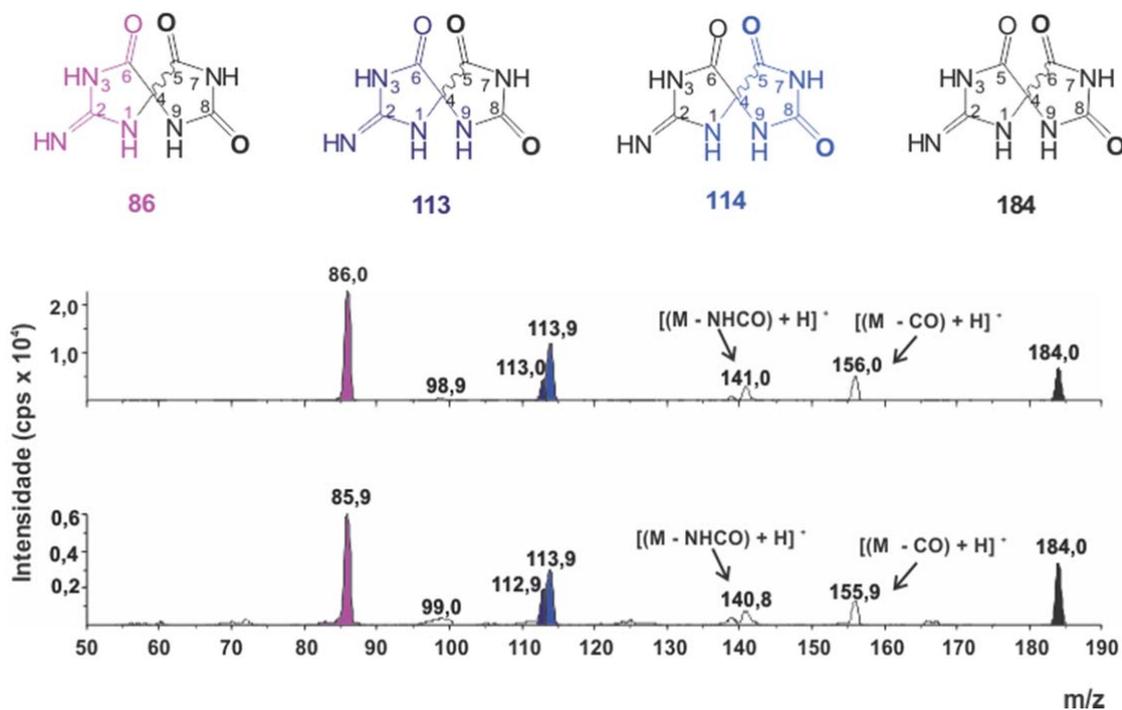


Figura 4.51 - Análise da $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ -dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento de m/z 184 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica (116 Da) da fragmentação do íon precursor m/z 300 proveniente da reação de 8-oxodGuo com $^{18}\text{O}_3$. Espectro superior refere-se ao primeiro diastereoisômero e o inferior ao segundo.

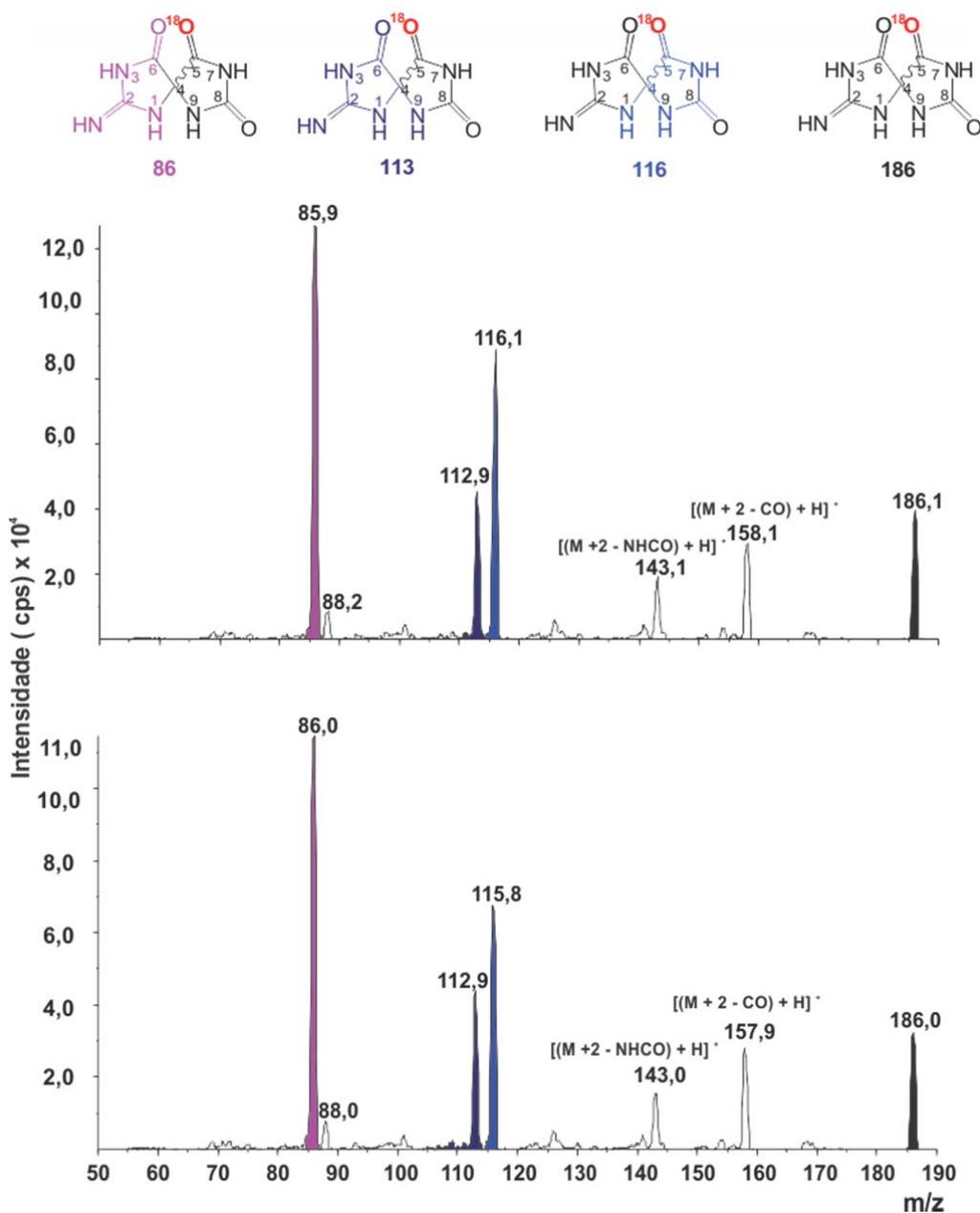


Figura 4.52 - Análise da $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ -dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 186 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica (116 Da) da fragmentação do íon precursor m/z 302 proveniente da reação de 8-oxodGuo com $^{18}\text{O}_3$. Espectro superior refere-se ao primeiro diastereoisômero e o inferior ao segundo.

A partir deste ponto buscamos a informação da contribuição de $O_2 (^1\Delta_g)$ na formação da dSp através do efeito do solvente, ou seja, a reação da 8-oxodGuo 5mM foi conduzida em H_2O ou D_2O sendo ozonizada por 5 minutos. As amostras foram analisadas por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM nas transições específicas para a molécula não marcada, $300 \rightarrow 184$. Deste modo o cromatograma apresenta os diastereoisômeros da dSp detectados tanto em D_2O como em H_2O , porém a intensidade do sinal equivale cerca de 3 vezes mais em D_2O , o qual pode ser visto na figura 4.55, o gráfico inserido no cromatograma expressa a área relativa dos dois diastereoisômeros.

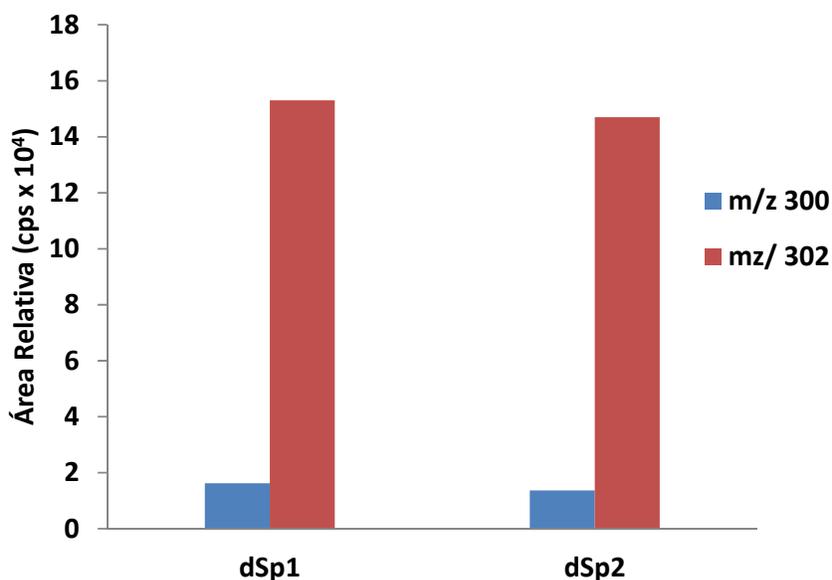


Figura 4.53- Área relativa proveniente da formação de dSp m/z 300 e $^{16}O^{18}OdSp$ m/z 302 durante a reação da 8-oxodGuo com $^{18}O_3$. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM monitorando as transições $m/z 300 \rightarrow 184$ e $m/z 302 \rightarrow 186$.

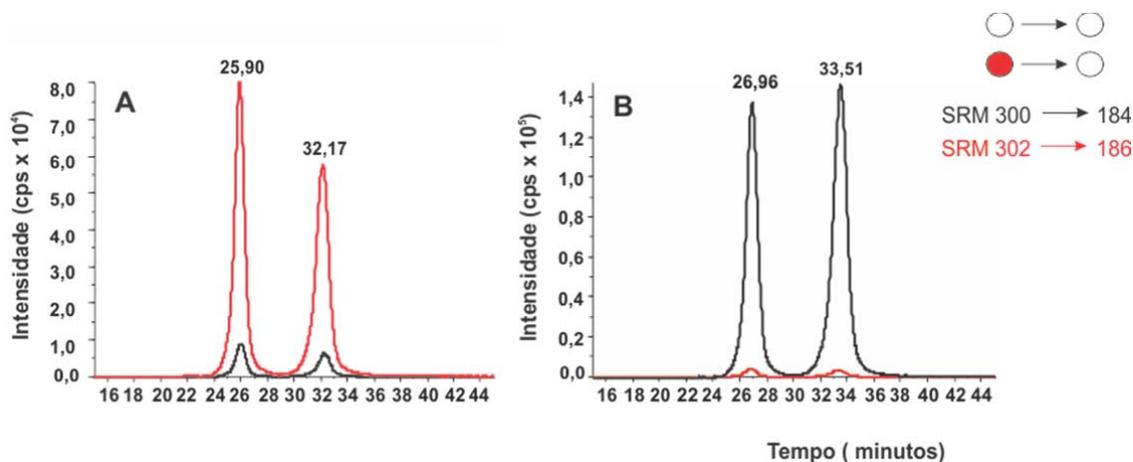


Figura 4.54- Formação de dSp m/z 300 e $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ dSp m/z 302 durante a reação da 8-oxodGuo com (A) $^{18}\text{O}_3$. E (B) com $^{16}\text{O}_3$ em H_2^{18}O , monitorando a transição m/z 300 e m/z 302. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM, utilizando a cromatográfica de fase normal. Legenda: $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$, referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente.

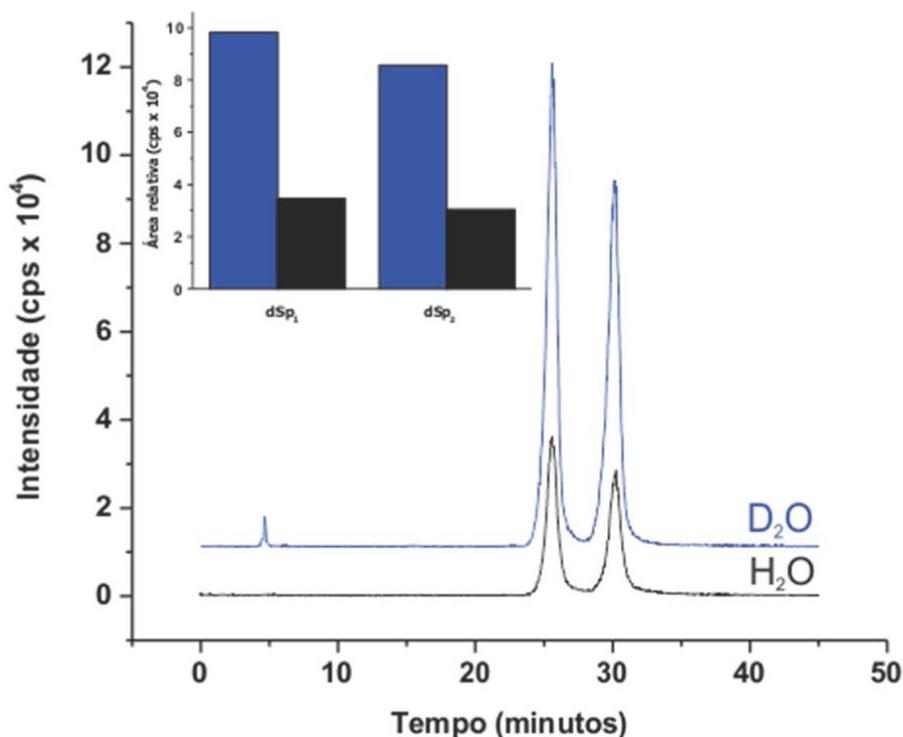


Figura 4.55- Cromatograma da formação de dSp proveniente da reação da 8-oxodGuo com ozônio em D₂O e H₂O. O gráfico inserido na parte superior do cromatograma refere-se às áreas relativas dos diastereoisômeros da dSp em D₂O e H₂O. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM monitorando a transição m/z 300 \rightarrow 184 utilizando a cromatografia de fase normal.

De uma forma elaborada na abordagem do mecanismo de reação foi utilizada desta vez a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina, a qual possui um grupo metoxi (OCH₃) ligado ao carbono 8 da dGuo, este grupo age como doador de elétrons, deste modo avaliamos a possibilidade da formação da dSp entre outras modificações, as quais serão abordadas mais adiante. Levando em consideração que a 8-oxodGuo possui

uma carbonila no carbono-8 o anel imidazol tendo uma propriedade de deslocar os elétrons da molécula em sua direção.

A determinação da MeOdSp, a qual possui 14 Da a mais referente a dSp foi obtida pela transição 314 → 189, perda da desoxirribose 116 Da, figura 4.56, no modo SRM por HPLC-ESI/MS/MS. Primeiramente obteve-se um padrão proveniente da incubação da 8-MeodGuo com uma fonte química de O₂ (¹Δ_g) o DHPNO₂ em D₂O. A presença da dSp contendo o grupo metoxi foi identificado como mostra a figura 4.56 (A), os sinais destacados em lilás refere-se a MeOdSp. O sinal com tempo de retenção em 6,30 minutos pode ser outro produto formado, uma vez que o padrão não foi isolado. Posteriormente identificamos formação de MeOdSp nas reações com ozônio, a figura 4.56 (B) mostra o cromatograma obtido no modo SRM, os quais possuem o mesmo tempo de retenção da MeOdGuo proveniente da oxidação do O₂ (¹Δ_g). A próxima etapa foi caracterizada a estrutura dos sinais obtidos na figura 4.56 (B) através do estudo dos padrões de fragmentações dos íons fragmentos no modo MS². Inicialmente analisou-se a fragmentação do íon precursor com m/z 314, na figura 4.57 observa-se o mesmo perfil de fragmentação da dSp de forma característica a clivagem da ligação *N*-glicosídica resulta no íon produto mais intenso referente a m/z 189, o qual possui 14 Da a mais da dSp.

A maior evidência sobre a estrutura da MeOdSp são os íons produtos obtidos da fragmentação de m/z 189. Os fragmentos com m/z 113 e 128 correspondem aos dois anéis de cinco membros, as quais correspondem à perda de 85 Da, na porção do anel imino e 70 Dalton no anel onde está localizado o grupo metoxi respectivamente. Os fragmentos estão destacados em cores, ou seja, a parte em cor preta na estrutura refere-se à perda de massa. Outro fragmento encontrado está relacionado à perda de [(MeOdGuo – CO) + H]⁺ para m/z 170, figura 4.58.

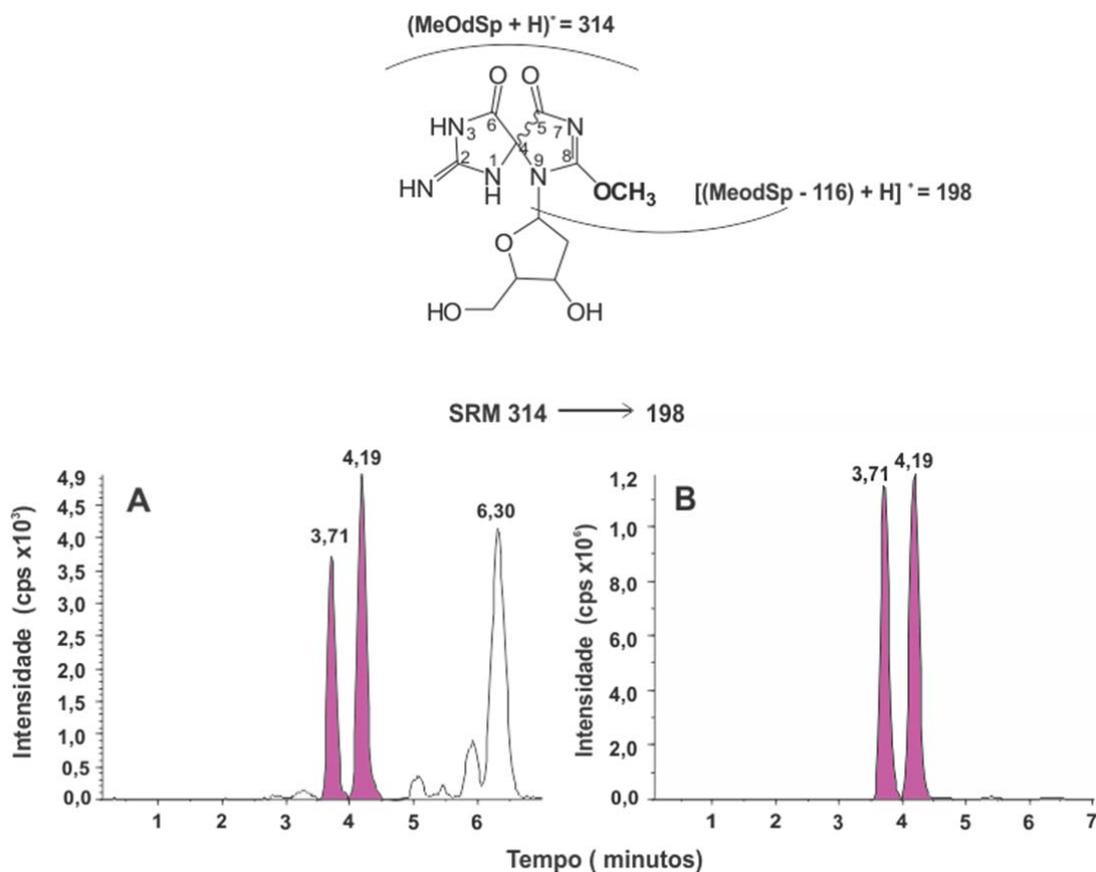


Figura 4.56- Análise da MeOdSp por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM na transição m/z 314 \rightarrow 198 obtida na reação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com (A) DHPNO₂; (B) ozônio. Condições utilizadas para o HPLC consiste em coluna C-18 com por um gradiente com fase móvel composta por metanol e 10mM de formiato de amônio.

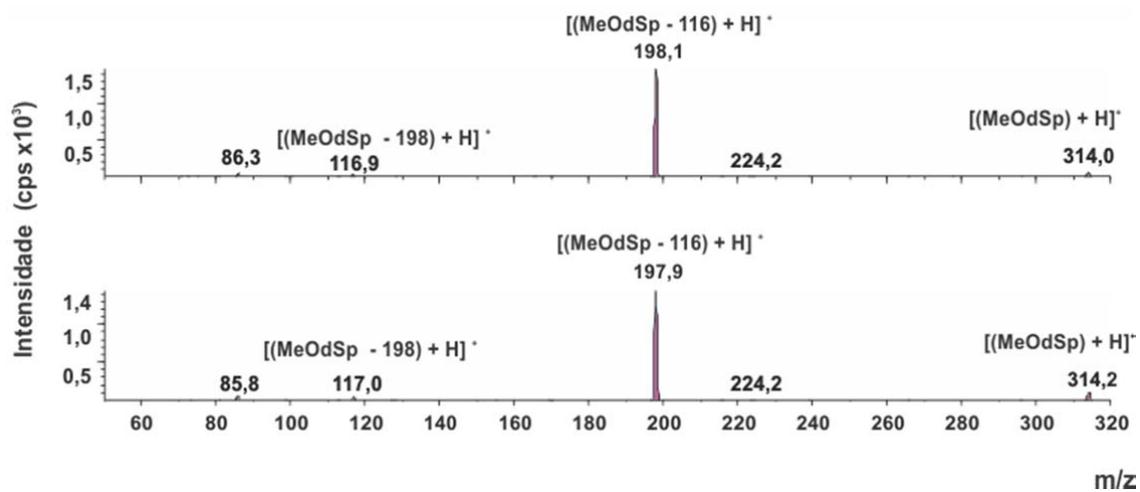


Figura 4.57 - Espectro de massas obtido da MeodSp por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina ozônio em D₂O. O espectro superior refere-se ao diastereoisômero 1 e o inferior ao diastereoisômero 2.

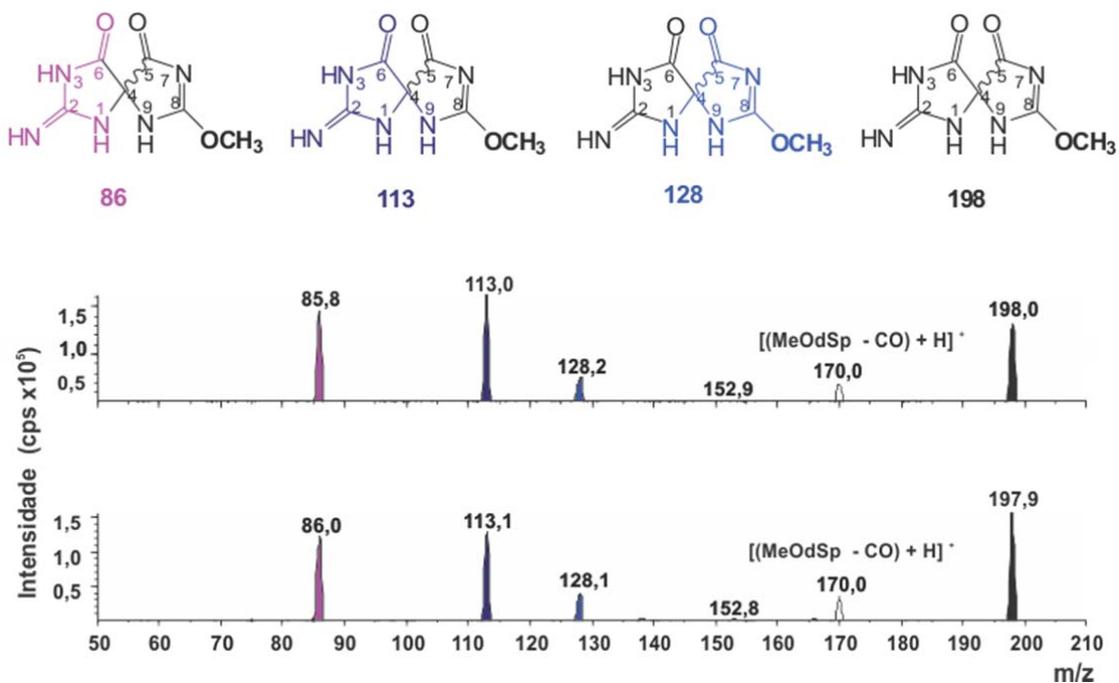


Figura 4.58 - Análise da MeOdSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 198 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica (116 Da) da fragmentação do íon precursor m/z 314 proveniente da reação de 8-MeOdGuo com ozônio. Espectro superior refere-se ao diastereoisômero um e o inferior ao diastereoisômero dois.

4.12 Caracterização da Imidazolona e Oxazolona formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o ¹⁶O₃ e ¹⁸O₃ e por [¹⁵N₅]-dGuo com ¹⁶O₃.

De forma bem conhecida a fotossensibilização com azul de metileno da dGuo em uma solução saturada de O₂ (³Σ_g⁻) leva a formação dos produtos principais: os diastereoisômeros da dSp e a 8-oxodGuo que por sua vez reage aproximadamente 3 vezes mais rápida que a dGuo, formando também a dOz e a dlz. A evidência da contribuição do O₂ (¹Δ_g) na reação na foto-oxidação foi demonstrada utilizando como ferramenta o efeito do solvente, D₂O e H₂O, e o efeito supressor físico com NaN₃,

assim em água deuterada foi observado um aumento de aproximadamente quatro vezes na velocidade de reação e com a adição do supressor a mesma foi diminuída (Buchko *et. al.*, 1995, Raoul e Cadet, 1996).

A oxazolona e a sua precursora imidazolona foram identificadas nas oxidações pelo ozônio-16 e 18 através das reações com a dGuo, $^{15}\text{N}_5\text{-dGuo}$, 8-oxodGuo e 8-MeOGuo. Inicialmente apresentaremos os resultados obtidos para dlz na figura 4.59 mostra a sua estrutura e os seus fragmentos principais utilizados para a sua identificação nas análises por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas.

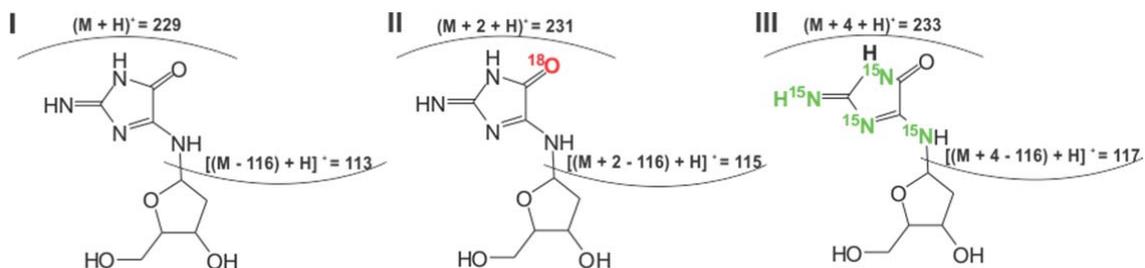


Figura 4.59 - Estrutura da Imidazolona nas transições (I) m/z 229 \rightarrow 113; (II) m/z 231 \rightarrow 115 e (III) m/z 233 \rightarrow 117 com as seguintes notações: $[\text{M} + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 2) + \text{H}]^+$; $[(\text{M} + 4) + \text{H}]^+$ referente ao íon precursor da molécula com a incorporação de (I) um átomo de ^{16}O , (II) um átomo de ^{18}O e (III) com $^{15}\text{N}_4$.

Basicamente para identificarmos a dlz, um padrão foi gerado através da fotossensibilização com azul de metileno como descrito por Cadet, 1996 e Martinez, 2003, desta forma a presença da dlz foi identificada por HPLC-ESI/MSMS no modo SRM nos sistemas estudados. Os cromatogramas da figura 4.60 apresentam um sinal com tempo de retenção em 7,30 minutos sendo de acordo com o padrão sintetizado e denotado como dGuo + O_2 ($^1\Delta_g$). Nas reações com ozônio-18 (dGuo +

$^{18}\text{O}_3$) há a formação tanto da dlz com a incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , contudo a intensidade para a formação do produto marcado realçado em cor vermelha é muito maior. De forma que na reação da dGuo com O_3 conduzida em H_2^{18}O foi detectada apenas a dlz não marcada, e nas reações utilizando como solvente D_2O e H_2O , não houve uma diferença significativa em sua formação, a figura 4.60 mostra apenas a reação conduzida em D_2O (dGuo + O_3). Adicionalmente pode ser constatada a $^{15}\text{N}_4$ -dlz destacada em cor verde proveniente da oxidação da $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com O_3 .

Igualmente identificou-se a dlz e ^{18}O dlz derivada da oxidação da 8-oxodGuo com ozônio-18, sendo que a marcada apresenta um sinal cerca de 3 vezes maior, diferentemente da reação conduzida em H_2^{18}O com O_3 , onde o sinal equivalente a formação da dlz é aproximadamente 10 vezes mais intenso. Os sinais destacados em vermelho referem-se ao acréscimo de um átomo de oxigênio-18. A oxidação da MeOdGuo pelo O_3 também constatou-se a formação da dlz, a qual possui a mesma razão massa carga (m/z) 229, pois de acordo com os mecanismos propostos pela oxidação da 8-oxodGuo pelo O_2 ($^1\Delta_g$) ou por transferência de um elétron, após a formação do 5-hidroperóxido um segundo processo importante envolve a abertura da pirimidina na ligação do carbono 5 e 6 seguido de alguns rearranjos há a formação da dlz, (Raoul, 1995 , Ravanat *et al.*, 2006 e Neeley, 2006) ou seja, o anel imidazol da molécula é clivado. Desta forma a reação da 8-oxodGuo e MeodGuo com O_2 ($^1\Delta_g$) foi utilizado como padrão, a figura 4.61 ilustra os cromatogramas obtidos para os sistemas estudados.

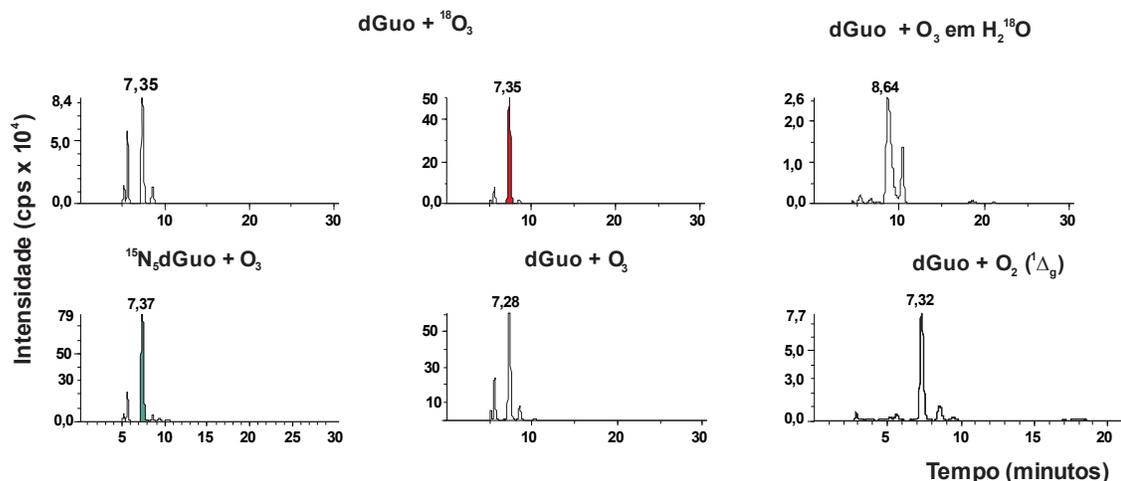


Figura 4.60 - Análise da dlz por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida através da oxidação da dGuo nas transições m/z 229 \rightarrow 113; 231 \rightarrow 115 e 233 \rightarrow 115, para $\circ \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \circ$ referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente e \bullet ¹⁵N₄. Condições utilizadas para o HPLC consiste em coluna C-18 com gradiente de fase móvel composta por Metanol e formiato de amônio 10 mM.

A caracterização da dlz foi obtida por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas no modo eletrospray positivo. A dlz como padrão foi obtida pela fotossensibilização da dGuo com o O₂ (¹Δ_g), a figura 4.62 ilustra a fragmentação do íon precursor (M + H)⁺ com m/z 229 exibe o íon fragmento com m/z 113 [(M - 116) + H]⁺ referente à perda de 116 Da da clivagem da ligação *N*-glicosídica, o perfil de fragmentação apresentado é igual ao anteriormente demonstrado por Ravanat, 1999. Desta forma os espectros de massas obtidos para as reações da dGuo com ¹⁶O₃ e ¹⁸O₃ estão apresentados na figura 4.63 nos painéis (A) para (M + H)⁺ e B com um acréscimo de 2 Da referente a incorporação de um átomo de oxigênio-18 para

$[(M + 2) + H]^+$ para m/z 231 e (C) para $[(M + 4) + H]^+$ para m/z 233 referente ao íon fragmento com $^{15}N_4$ proveniente da oxidação da $^{15}N_5$ -dGuo.

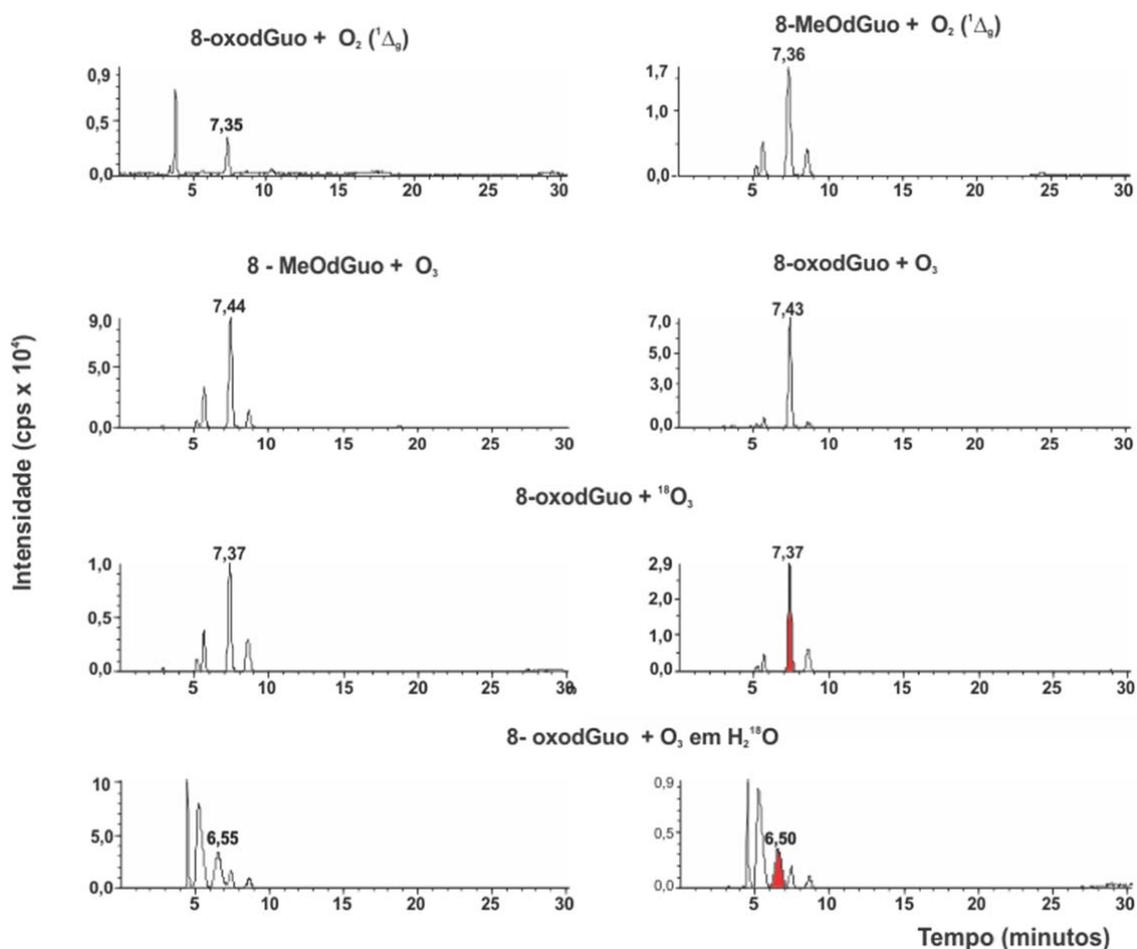


Figura 4.61- Análise da dlz por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida através da oxidação da 8-OxidGuo e 8-MeOdGuo nas transições m/z 229 \rightarrow 113 e 231 \rightarrow 115, para $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$ referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente. Condições utilizadas para o HPLC consiste em uma coluna C-18 com utilizando um gradiente de fase móvel composta por Metanol e formiato de amônio 10 mM.

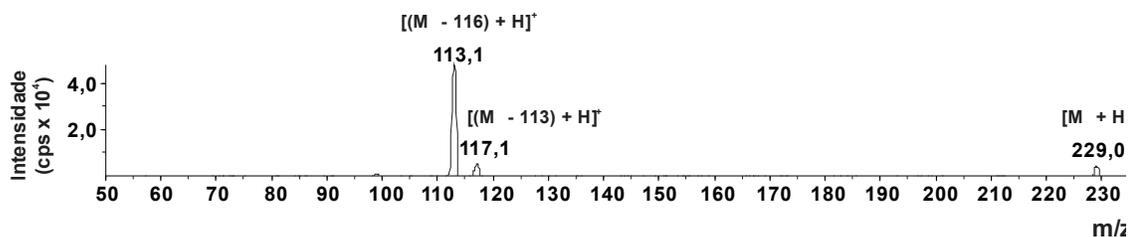


Figura 4.62 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI/MS/MS da dlz padrão proveniente da foto-oxidação da dGuo.

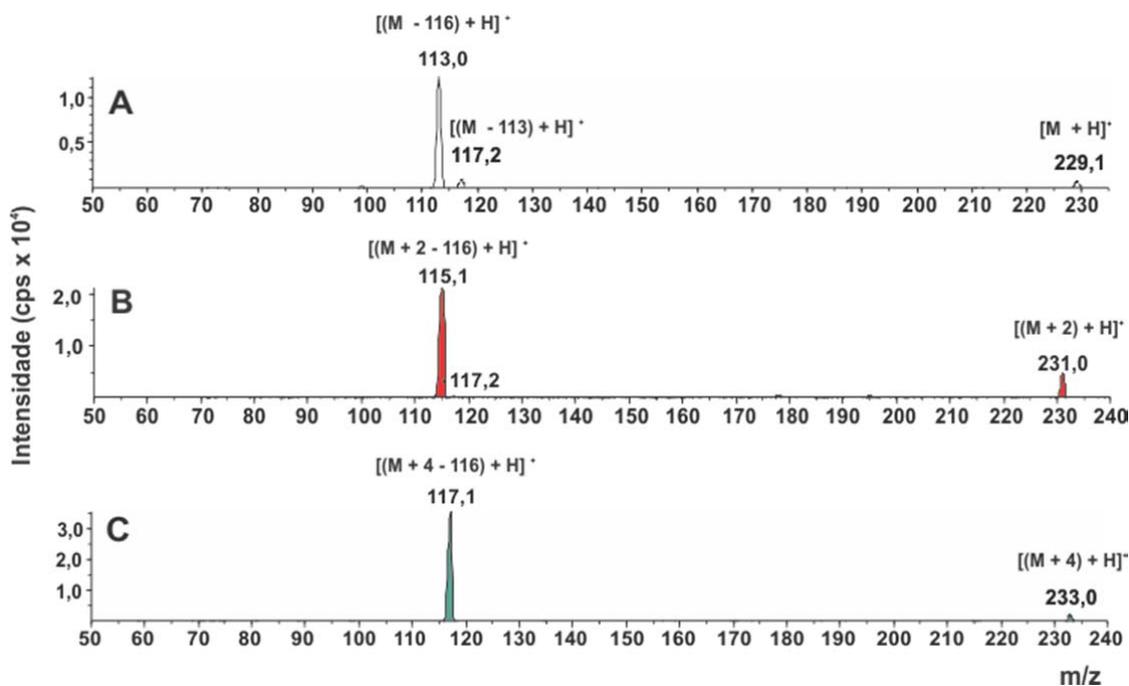


Figura 4.63 - Espectro de massas obtido da dlz por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 2'-desoxiguanosina com (A) ¹⁶O₃, (B) ¹⁸O₃ (C) através da oxidação da ¹⁵N₅-dGuo com O₃. Legenda: ○ → ○; ● → ○, referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente e ● ¹⁵N₄.

Do mesmo modo para a oxidação da 8-oxodGuo com $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e da MeOdGuo com o $^{16}\text{O}_3$ exibem o mesmo perfil de fragmentação da dlz e ^{18}O dlz apresentado na figura 4.62. Assim as fragmentações estão apresentadas na figura 4.64, nos painéis (A) e (B) observa-se a fragmentação dos íons precursoros m/z 229 e 231 dando origem aos íons fragmentos m/z 113 e 115 para a dlz não marcada e marcada, respectivamente e no painel (C) apresenta a dlz proveniente da oxidação da MeOdGuo com mesmos fragmentos de (A).

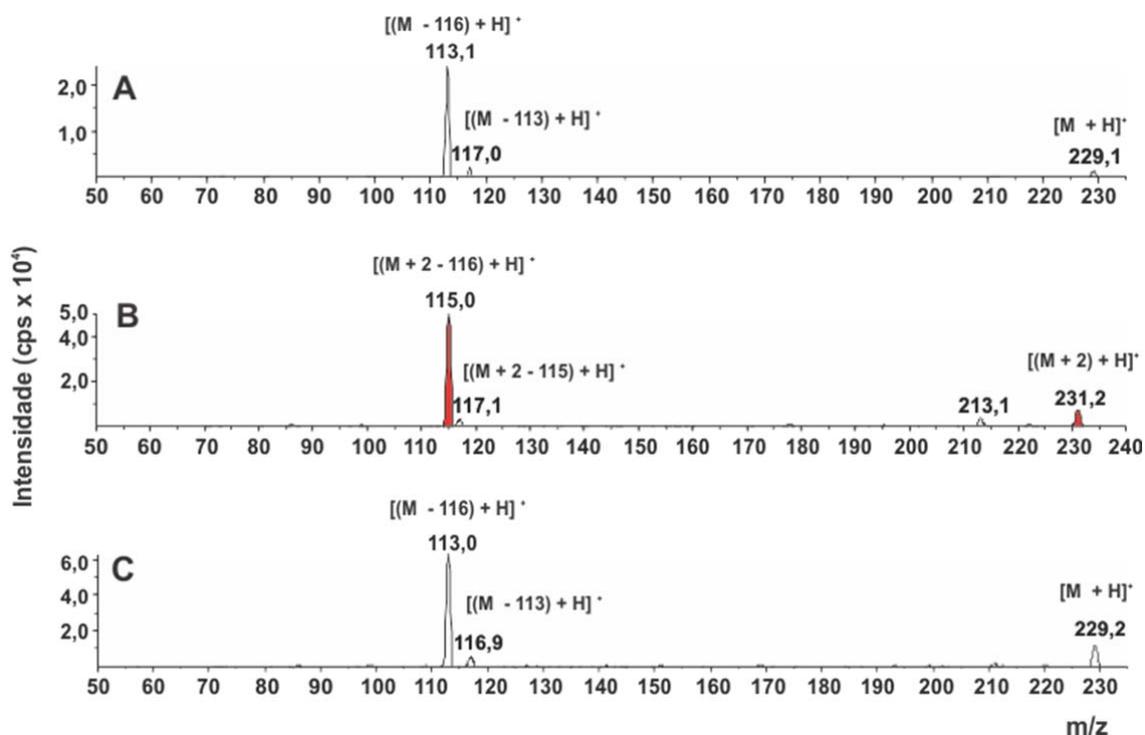


Figura 4.64 - Espectro de massas obtido da dlz obtido por HPLC-ESI/MS/MS da reação (A) 8-oxodGuo com O_3 (B) 8-oxodGuo com $^{18}\text{O}_3$ e (C) 8-MeOdGuo com O_3 . Legenda: $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$, referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente.

A imidazolona, a qual foi detectada nos sistemas estudados anteriormente descrito, sofre hidrólise acompanhada da incorporação de uma molécula de água levando à formação da dOz em solução aquosa neutra. Essa reação ocorre segundo mecanismo que envolve a formação transitória de um ácido carboxílico, seguido do ataque do oxigênio nucleofílico ao carbono eletrofílico levando à ciclização e formação do produto final (Raoul *et. al.*, 1995) figura 4.65.

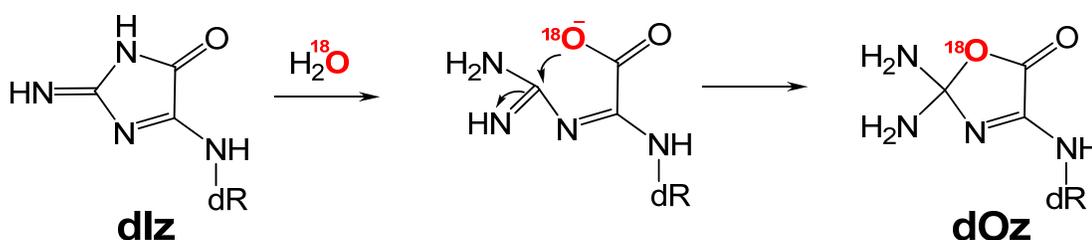


Figura 4.65 - Mecanismo de hidrólise da imidazolona levando a formação da oxazolona (Raoul *et. al.*, 1995).

Para a identificação da oxazolona por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM utilizou-se as seguintes transições: 247 → 131, 249 → 133 e 251 → 135 para os íons precursores [M + H]⁺; [(M + 2) + H]⁺; [(M + 4) + H]⁺ referente à dOz, ¹⁸O-dOz e ¹⁵N₄-dOz, a figura 4.66 ilustra os fragmentos da molécula.

Portanto a dOz foi detectada nas reações da dGuo com O₃ e ¹⁸O₃ e a partir da oxidação da ¹⁵N₅-dGuo com ozônio-16. Com o intuito de obter um padrão a dOz foi formada através da oxidação da dGuo utilizando o DHPNO₂, uma fonte química de O₂ (¹Δ_g). Assim os cromatogramas da figura 4.67 apresentam um sinal com tempo de retenção em 3,30 minutos equivalente ao padrão utilizado. Pode ser visto ainda na figura 4.67 o cromatograma proveniente da reação da dGuo com ozônio-16 em

H_2^{18}O revelando a incorporação de um átomo de oxigênio-18 proveniente da água-18 (reação apresentada na figura 4.65).

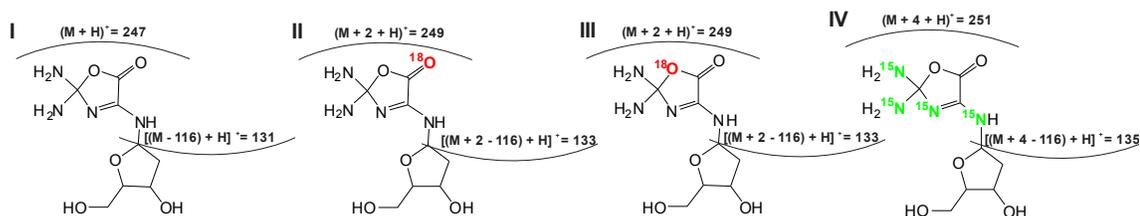


Figura 4.66- Estrutura da Oxazolona nas transições (I) m/z 247 \rightarrow 131; (II) e (III) m/z 249 \rightarrow 133 e (IV) m/z 251 \rightarrow 135. Legenda: $[M + H]^+$; $[(M + 2) + H]^+$; $[(M + 4) + H]^+$ referente ao íon precursor da molécula com a incorporação de (I) um átomo de ^{16}O , (II) um átomo de ^{18}O proveniente do $^{18}\text{O}_3$, (III) um átomo de ^{18}O devido à incorporação de uma molécula de H_2^{18}O e (IV) com quatro átomos de ^{15}N .

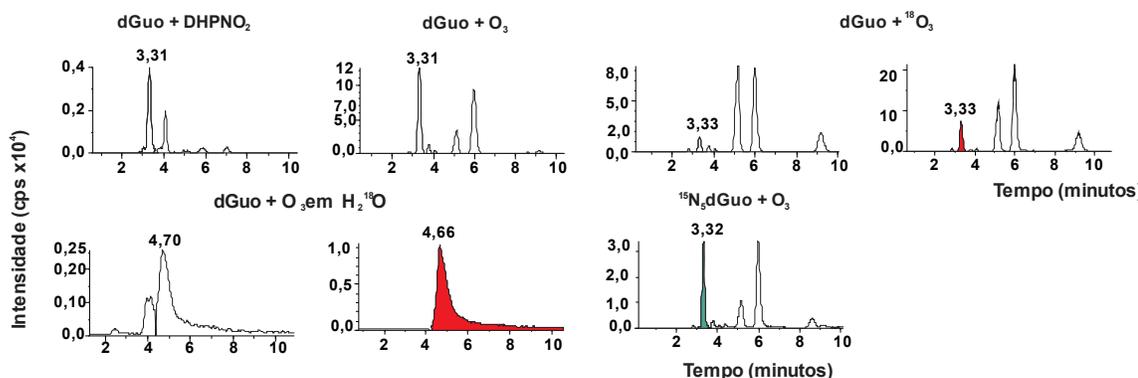


Figura 4.67- Análise da dOz por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida através da oxidação da dGuo nas transições m/z 247 \rightarrow 131; 249 \rightarrow 133 e 251 \rightarrow 135, para $\circ \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \circ$ referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente e $\bullet \rightarrow \bullet$ $^{15}\text{N}_4$. Condições utilizadas para o HPLC consiste em uma coluna C-18 com um gradiente de fase móvel composta por Metanol e formiato de amônio 10 mM.

Investigamos a formação da dOz proveniente das reações da 8-oxodGuo com ozônio-16, ozônio-18 e através da oxidação da 8-MeodGuo com O₃. Como efeito de comparação o padrão utilizado nestes ensaios foi obtido através da oxidação da 8-oxodGuo e MeOdGuo com DHPNO₂. Sendo assim, de forma esperada a presença da dOz foi observada nos sistemas analisados, os quais podem ser visto na figura 4.68. Igualmente a detecção da dOz foi observada na reação da 8-oxodGuo com O₃ na presença de água-18 com o incremento de 2 Da, equivalente a incorporação de um átomo de ¹⁸O derivado da água.

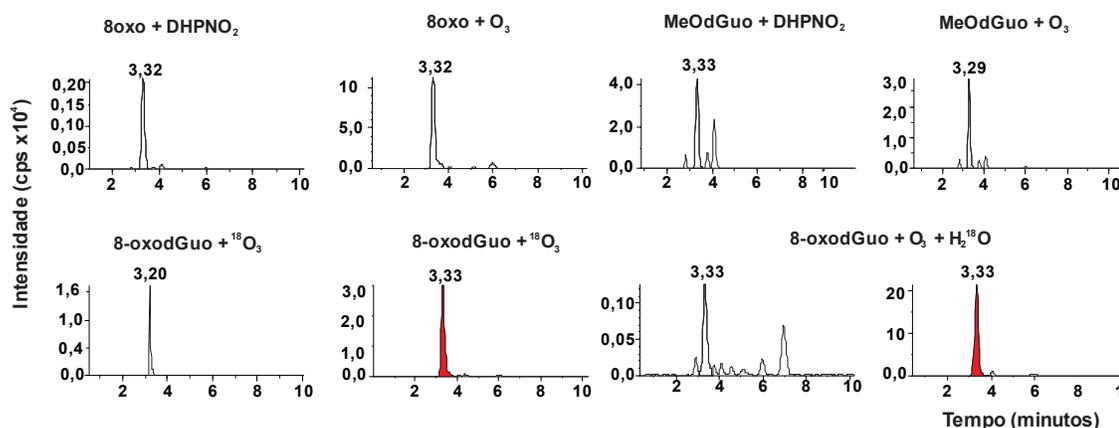


Figura 4.68- Análise da dOz por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM obtida nas transições m/z 247 \rightarrow 131 e 249 \rightarrow 133, foram obtidas através da oxidação da 8-oxodGuo e 8-MeOdGuo. Legenda: $\circ \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \circ$ referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. Condições utilizadas para o HPLC consiste em coluna C-18 com por um gradiente com fase móvel composta por Metanol e formiato amônio 10 mM.

Do mesmo modo para uma identificação inequívoca da formação da dOz proveniente das reações com ozônio, estudamos os padrões de fragmentação no modo MS² obtidos do íon precursor. Essencialmente obteve-se um padrão de fragmentação da dOz proveniente da fotossensibilização da dGuo. O espectro de massas da dOz com m/z 247 exibe três íons fragmentos de maior intensidade juntamente com um fragmento de menor intensidade com m/z 117 referente a desoxirribose protonada. Dentre eles o fragmento mais intenso corresponde a m/z 131, geralmente observado para os 2'-desoxirribonucleosídeos referente à clivagem da ligação N-glicosídica. Outra fragmentação característica é a perda de CO₂ equivalente a 44 Dalton partir do nucleosídeo (m/z 203) ou a partir da base modificada (m/z 87). A figura 4.69 exibe o perfil de fragmentação característico da dOz, esse padrão de fragmentação também foi descrito por Ravanat, 1999.

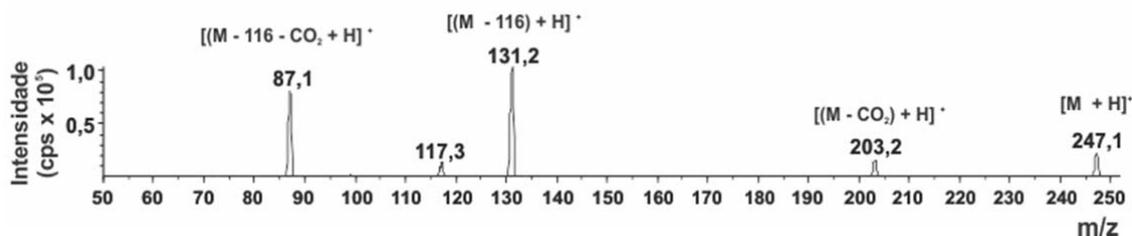


Figura 4.69 - Espectro de massas obtido por HPLC-ESI/MS/MS da dOz padrão proveniente da foto-oxidação da dGuo.

De tal modo o mesmo perfil de fragmentação observado no espectro de massas para o padrão de dOz foi constatado nas reações da dGuo com ozônio-16 para dOz [M + H]⁺ com m/z 247, [(M - CO₂) + H]⁺ m/z 203 e [M - 116 + H]⁺ m/z 131. Para o sistema com o ozônio marcado observa-se um acréscimo de 2 Da para

os seguintes fragmentos $[(M + 2) + H]^+$ com m/z 249, $[(M + 2) - (CO^{18}O) + H]^+$ m/z 203 e $[(M + 2) - 116 + H]^+$ m/z 133 e finalmente para $^{15}N_5$ -dOz observa-se o incremento de 4 Da para o fragmentos com m/z 251 $[(M + 4) + H]^+$, para m/z 207 $[(M + 4) - CO_2 + H]^+$ e $[(M + 4) - 116 + H]^+$ m/z 135, figura 4.70 (A), (B) e (C), respectivamente.

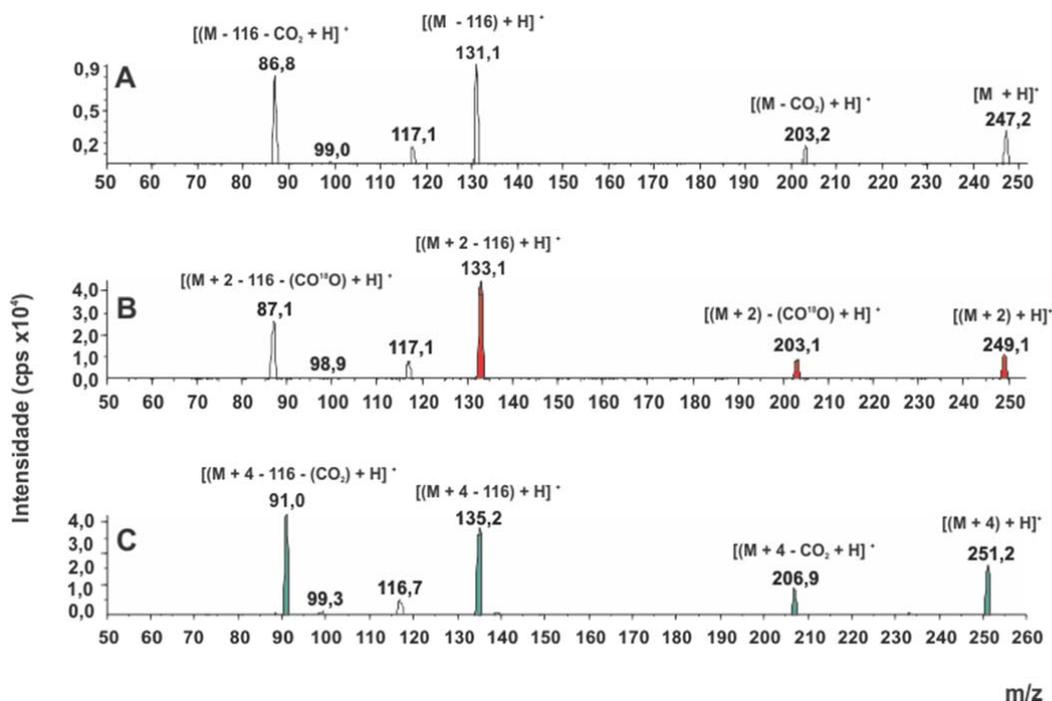


Figura 4.70 - Espectro de massas obtido da dOz por HPLC-ESI/MS/MS da reação da 2'-desoxiguanosina com (A) $^{16}O_3$, (B) $^{18}O_3$ (C) através da oxidação da $^{15}N_5$ -dGuo com O_3 . Legenda: $\circ \rightarrow \circ$; $\bullet \rightarrow \circ$, referente à incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente e \bullet $^{15}N_4$.

Foi igualmente observado o mesmo perfil de fragmentação da dOz proveniente da reação de MeOdGuo com ozônio-16 com $[M + H]^+$ para m/z 247, $[(M - CO_2) + H]^+$ m/z 203 e $[M - 116 + H]^+$ m/z 131, figura 4.71 (A), (B) e (C) apresentam

os mesmos padrão de fragmentação com acréscimo de dois Da para a reação da 8-oxodGuo com ozônio-18 e para 8-oxodGuo com ozônio em água-18, respectivamente.

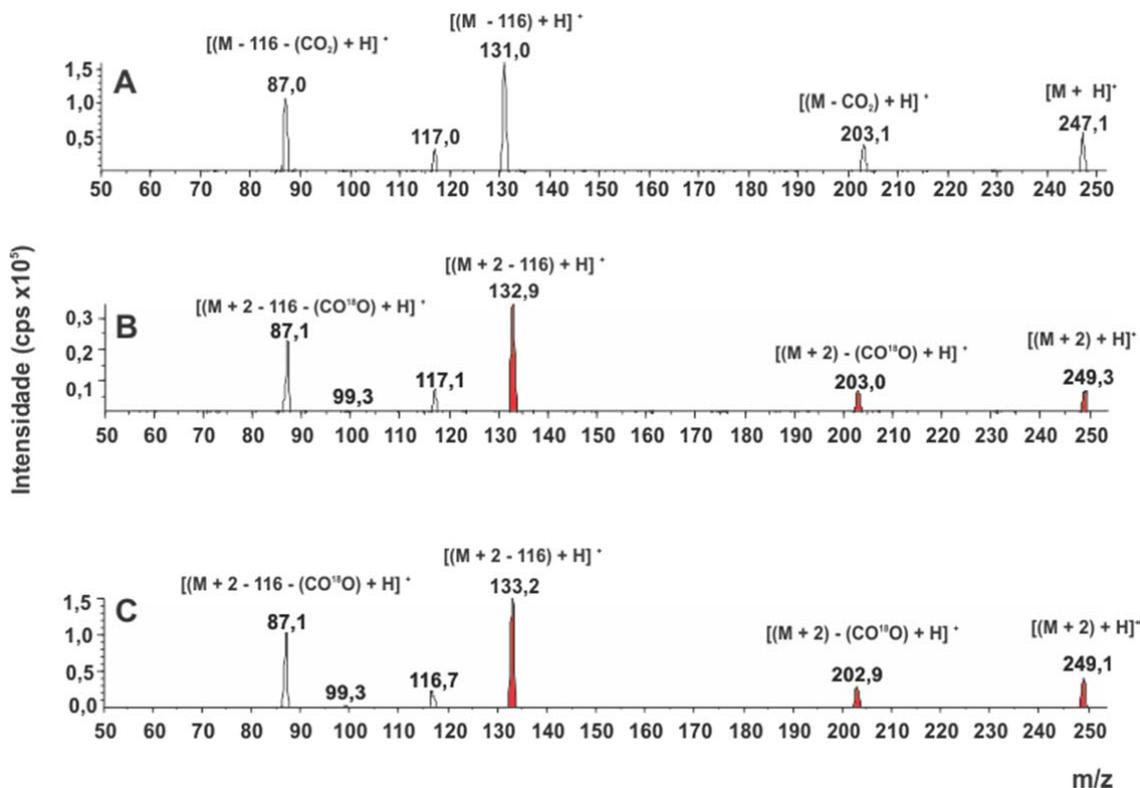


Figura 4.71 - Espectro de massas obtido da dOz obtido por HPLC-ESI/MS/MS da (A) reação da 8-MeOdGuo com O₃, (B) 8-oxodGuo com ¹⁸O₃ e (C) da O₃ em H₂¹⁸O.

Legenda: ○ → ○; ● → ○, referente à incorporação de um átomo de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente.

4.13 Caracterização de X_1 e X_2 formada na reação da 2'-desoxiguanosina com o $^{16}\text{O}_3$ e $^{18}\text{O}_3$ e por $^{15}\text{N}_5$ -dGuo com $^{16}\text{O}_3$.

Dois produtos ainda não identificados foram detectados a partir da reação da dGuo com ozônio, os quais serão denotados como X_1 e X_2 . Esses produtos não foram detectados tanto a partir da 8-oxodGuo como da 8-MeOdGuo, sendo produtos específicos da dGuo. Como visto na figura 4.36, a qual apresentou os experimentos realizados com a $^{18}\text{O}_3$, mais específico na transição característica da dSp foi possível notar dois sinais bem intensos, a princípio acreditava-se que o X's poderiam ser a dSp, contudo com o desenvolvimento da pesquisa foi possível evidenciar que se tratavam de dois produtos diferentes.

Desta forma analisou-se X_1 e X_2 do mesmo modo com que foi analisada a dSp, sendo assim os estudos envolvendo a marcação isotópica do ozônio-18 a partir da oxidação da dGuo detectados por HPLC acoplados ao espectro de massas com fonte ESI+ por detecção no modo SRM, as transições específicas para com a incorporação de dois átomos de ^{16}O , dSp com a incorporação de um átomo de ^{18}O e dSp com a incorporação de dois átomos de ^{18}O foram $[M + H]^+$; $[(M + 2) + H]^+$; $[(M + 4) + H]^+$ para m/z 300 \rightarrow 184; 302 \rightarrow 186 e 304 \rightarrow 188, respectivamente. E juntamente com os resultados da formação da $^{15}\text{N}_5$ - X_1 e $^{15}\text{N}_5$ - X_1 com transição $[(M + 5) + H]^+$ para m/z 305 \rightarrow 189. Como esperado a figura 4.72 apresenta os cromatogramas (A) m/z 300, (B) 304 e (C) 305, aos quais pode ser visto dois sinais intensos com tempo de retenção em 5,70 e 6,40 minutos em todas as transições. A transição com m/z 302 está representada na figura 4.36. O sinal com tempo de retenção 2,90 minutos corresponde a dSp. O espectro de absorção dos X's está representado na figura 4.72 (D). Essas análises procederam-se em cromatografia de

fase reversa, constituída por uma coluna C-18 e por fase móvel metanol e formiato de amônio 10 mM.

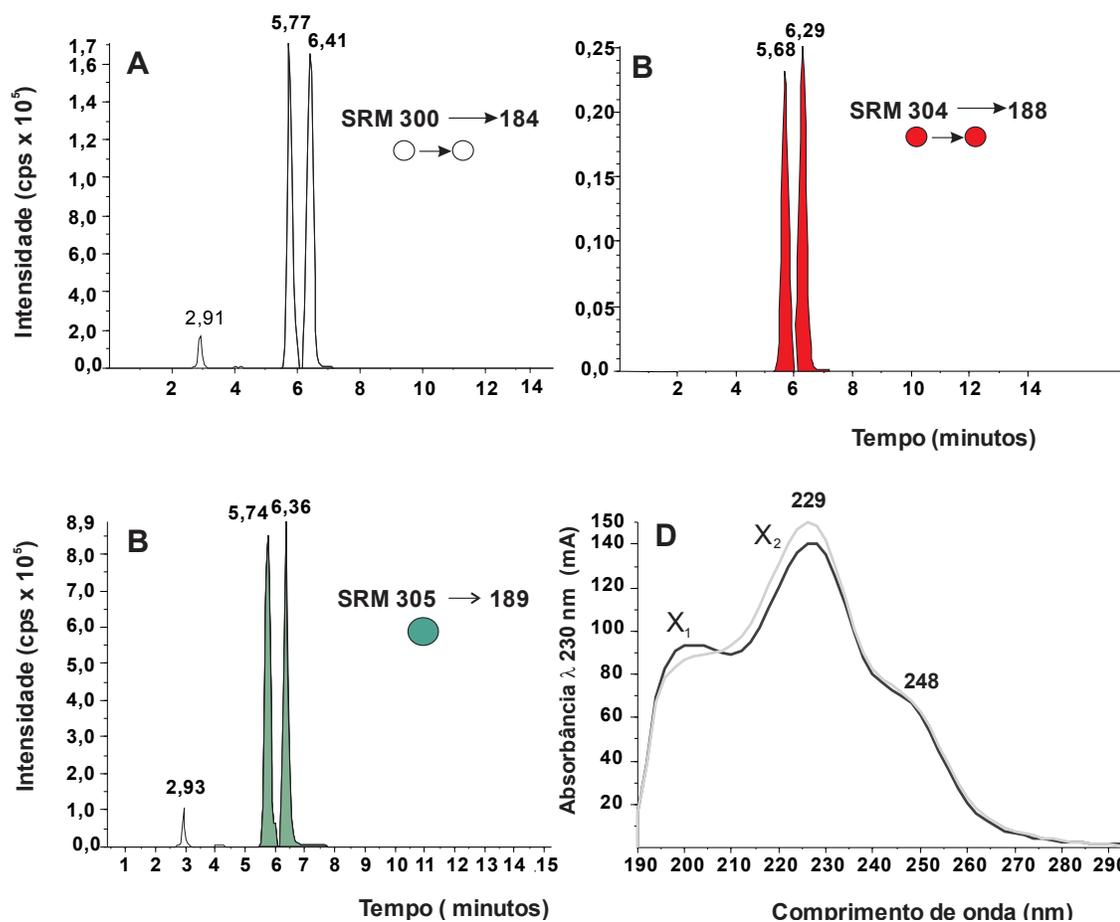


Figura 4.72 - (A) Cromatograma adquirido por HPLC-ESI/MS/MS por detecção no modo SRM nas transições 300 → 184 ; 304 → 188 e 305 → 189 proveniente de X₁ e X₂ obtido da reação (A) dGuo com O₃; (B) dGuo com ¹⁸O₃; (C) ¹⁵N₅-dGuo com O₃ e (C) Espectro de absorção λ = em 230nm. Legenda: ○ → ○ e ● → ● referente à incorporação de dois átomos de ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente e ● ¹⁵N₅.

Com o intuito de se obter mais informações sobre a formação de $^{16}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ e $^{18}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ realizou-se uma cinética de oxidação da dGuo com o $^{18}\text{O}_3$, as alíquotas foram tiradas de 10 em 10 minutos até atingir 30 minutos, posteriormente foram retiradas de 15 e 15 minutos até completar 2 horas. Foi constatado o mesmo comportamento para ambos $^{18}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ (m/z 304), em 10 minutos se observa a maior formação, com uma queda em aproximadamente 80% em 20 minutos permanecendo estável até 30 minutos em seguida há uma diminuição constante. Para $^{16}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ (m/z 302) nota-se uma formação pouco expressiva ao comparar com $^{18}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ (m/z 304), o mesmo perfil é observado para ambos os isômeros de m/z 302 e 304, figura 4.73 (A). Esse resultado pode sugerir um mecanismo de reação direto do O_3 a dGuo, pelo fato da expressiva formação de m/z 304, ou seja, a incorporação de dois átomos de oxigênio-18 na estrutura inicial, a dGuo. Consequentemente, para obter mais informações do tipo de mecanismo realizou-se um conjunto experimentos de forma que a dGuo foi solubilizada em D_2O , em pD 2,0, em pD 9,0 e em uma mistura contendo $\text{D}_2\text{O}/\text{álcool } tert \text{ butílico}$ (1:1), o intuito foi verificar a formação dos X's avaliando a contribuição do O_2 ($^1\Delta_g$), efeito do pD e a contribuição do mecanismo radicalar. O mesmo conjunto de experimento foi feito utilizando H_2O no lugar de D_2O . A figura 4.73 (B) expressa a área relativa da formação dos X's, a qual foi obtida por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM, monitorando as transições m/z 300 \rightarrow 184. Interessantemente a combinação $\text{D}_2\text{O}/\text{álcool } tert \text{ butílico}$ foi observada a maior formação para os dois produtos, como também a combinação $\text{H}_2\text{O}/\text{álcool } tert \text{ butílico}$ se mostrou eficiente. Nota-se o dobro da formação dos X's em D_2O ao comparar com a H_2O . Entre os pH's estudados em meio ácido não foi possível detectar X_1 e X_2 , devido a velocidade de reação ser menor e em pH =9,0 somente em H_2O houve um aumento. Diante desses

diversificados resultados pode-se atribuir um ataque direto do O_3 , uma vez que o álcool *tert* butílico pode ter protegido o ozônio do radical hidroxila.

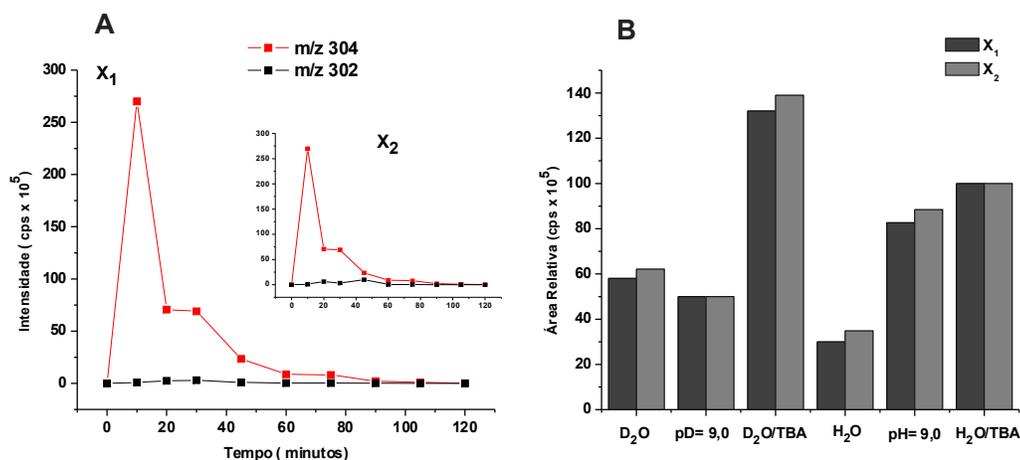


Figura 4.73 (A) Formação de $^{16}O^{18}OX$'s e $^{18}O^{18}OX$'s durante a cinética da reação da dGuo com $^{18}O_3$ por 120 minutos. Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM, monitorando as transições $302 \rightarrow 186$; $304 \rightarrow 188$. (B) A formação de X_1 e X_2 proveniente da reação da dGuo com O_3 , expressa pela área relativa, em diferentes condições de solvente e pH, as análises foram adquiridas por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM, monitorando a transição $300 \rightarrow 184$. TBA = álcool *tert*-butílico.

A partir deste ponto os produtos foram purificados por HPLC, o que foi possível deparar com sua instabilidade. Em uma primeira tentativa após a purificação os produtos foram rotoevaporados para redução do solvente orgânico e em seguida liofilizado, após esse processo foi possível notar que os produtos foram degradados. Portanto, outra metodologia foi aplicada na purificação, de forma que a fase móvel constitui-se de 80% metanol/ acetonitrila (1:1). Os X's (isômeros) purificados, o processo de coleta foi feito na meia altura do pico para evitar

contaminação do outro isômero. A figura 4.74 apresenta a área relativa adquirida por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM, monitorando as transições $300 \rightarrow 184$, (A) pode ser visto X_1 juntamente com X_2 e em (B) X_2 juntamente com X_1 , o que pode indicar que um isômero se converte no outro, podendo ser uma forma aberta e a outra fechada ou mesmo isômeros geométricos. Nesse mesmo experimento foi avaliado a sua estabilidade, as injeções no sistema HPLC-ESI/MS/MS foram feitas a cada 45 minutos, no entanto a mostra permaneceu no auto injetor a 4°C , nota-se que apenas X_1 se decompôs sutilmente.

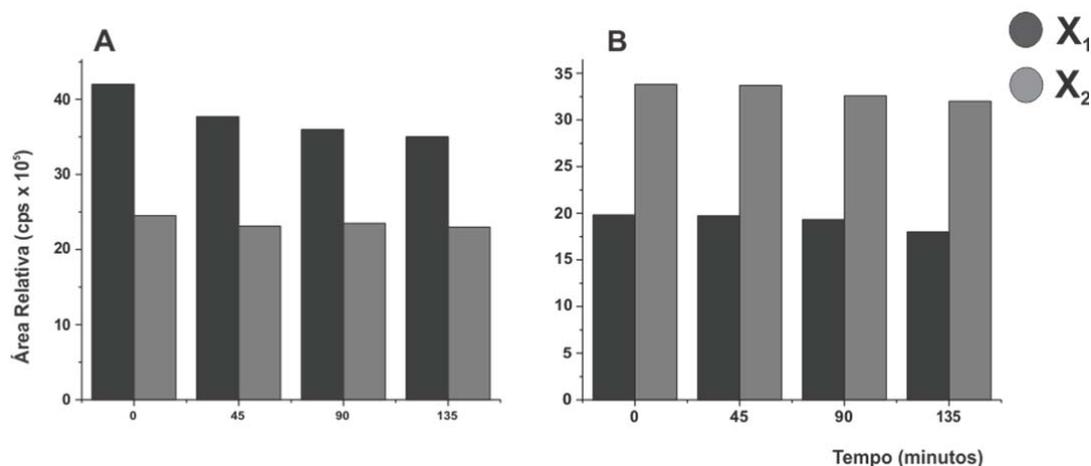


Figura 4.74- Análise da estabilidade dos produtos purificados (A) X_1 e (B) X_2 . As amostras foram injetadas a cada 45 minutos por um auto injetor programado com temperatura a 4°C . Os resultados das análises foram obtidos por HPLC-ESI/MS/MS do no modo SRM, monitorando as transições $300 \rightarrow 184$.

A caracterização dos X's foi realizada de forma semelhante a da dSp, portanto, inicialmente obteve-se o perfil de fragmentação do íon precursor com m/z 300 para a molécula não marcada, m/z 304 para molécula duplamente marcada e finalmente para m/z 305 para a molécula acrescida de cinco átomos de nitrogênio-

15. Os espectros exibem a formação de um íon fragmento de maior intensidade juntamente com um fragmento de menor intensidade com m/z 117 referente à desoxirribose protonada. Desta forma o fragmento mais intenso corresponde a m/z 184, que é comumente observado para dSp, figura 4.38, contudo seu perfil de fragmentação não apresenta íons fragmentos de menor intensidade como m/z 210, figura 4.75 (A e A'). Os espectros de massas correspondentes a (B e B') e (C, C') apresentam o mesmo padrão de fragmentação, apenas com acréscimo de quatro unidades de massas proveniente da molécula duplamente marcada com $^{18}\text{O}_3$ para $[(M + 4) + \text{H}]^+$ e $[(M + 4 - 116) + \text{H}]^+$, correspondente a m/z 304 e 188 e com incremento de 5 Da referente à oxidação da $^{15}\text{N}_5$ -dGuo para $[(M + 5) + \text{H}]^+$ e $[(M + 5 - 116) + \text{H}]^+$ com m/z 305 e 189, respectivamente.

Geralmente para a caracterização dos 2'-desoxirribonucleosídeos modificados observa-se o íon fragmento mais intenso, que corresponde à clivagem da ligação *N*-glicosídica, entretanto neste caso em especial a reação da dGuo com ozônio forma dois diastereoisômeros da dSp e dois isômeros ainda não identificados X_1 e X_2 com a mesma razão massa carga (m/z 300) e com as mesmas transições ($300 \rightarrow 184$).

Deste modo para elucidação estrutural dos X's estudou-se os padrões de fragmentação no modo MS^2 para m/z 184, 188 e 189 referente à $^{16}\text{O}^{16}\text{OX}'\text{s}$, $^{18}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ e $^{15}\text{N}_5\text{-X}'\text{s}$. Claramente é observado um perfil de fragmentação semelhante ao da dSp, embora notou-se a ausência dos íons fragmentos correspondentes a perda de $[(M - \text{NHCO}) + \text{H}]^+$ e $[(M - \text{CO}) + \text{H}]^+$ para m/z 141 e 156, respectivamente. Os espectros ainda exibem três íons fragmentos de maior intensidade com m/z 114, 112 e 86, interessante o padrão de fragmentação da dSp (figura 4.40) exibe os mesmos fragmentos com exceção do m/z 112, que na dSp equivale ao m/z 113. Destacando para maior evidência sobre a estrutura da espiro

são os íons fragmentos obtidos com m/z 113 e 114, esses íons correspondem aos dois anéis de cinco membros.

Desta forma os espectros de fragmentação da figura 4.76 (A e A'); (B e B') e (C e C') ilustram os íons fragmentos de m/z 184, 188 e 189 proveniente da reação da dGuo com O_3 , $^{18}O_3$ e a oxidação de $[^{15}N_5]$ -dGuo com O_3 , respectivamente.

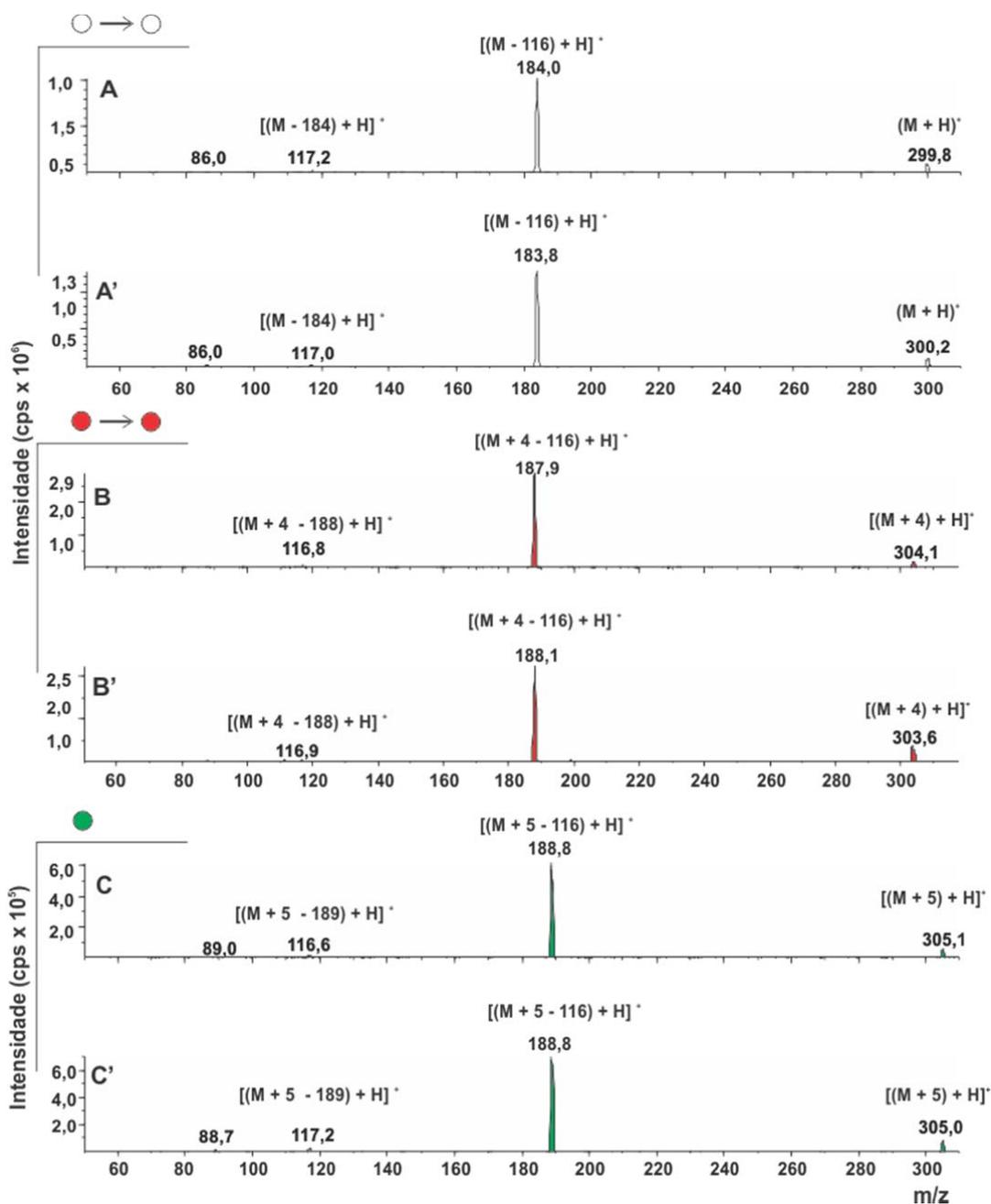


Figura 4.75 - Espectro de massas obtido de $^{16}\text{O}^{16}\text{OX}'\text{s}$, $^{18}\text{O}^{18}\text{OX}'\text{s}$ e $^{15}\text{N}_5\text{-X}'\text{s}$ por HPLC-ESI/MS/MS da reação da desoxiguanosina com (A) e (A') $^{16}\text{O}_3$ m/z 300; (B) e (B') $^{18}\text{O}_3$ m/z 304 e (C) $^{15}\text{N}_5\text{-dGuo}$ com O_3 m/z 305. Para $\circ \rightarrow \circ$ e $\bullet \rightarrow \bullet$ referente à incorporação de dois átomos de ^{16}O e ^{18}O , respectivamente e \bullet $^{15}\text{N}_5$. A terminologia A; B; C; refere-se ao isômero 1 e A'; B'; C' ao isômero 2.

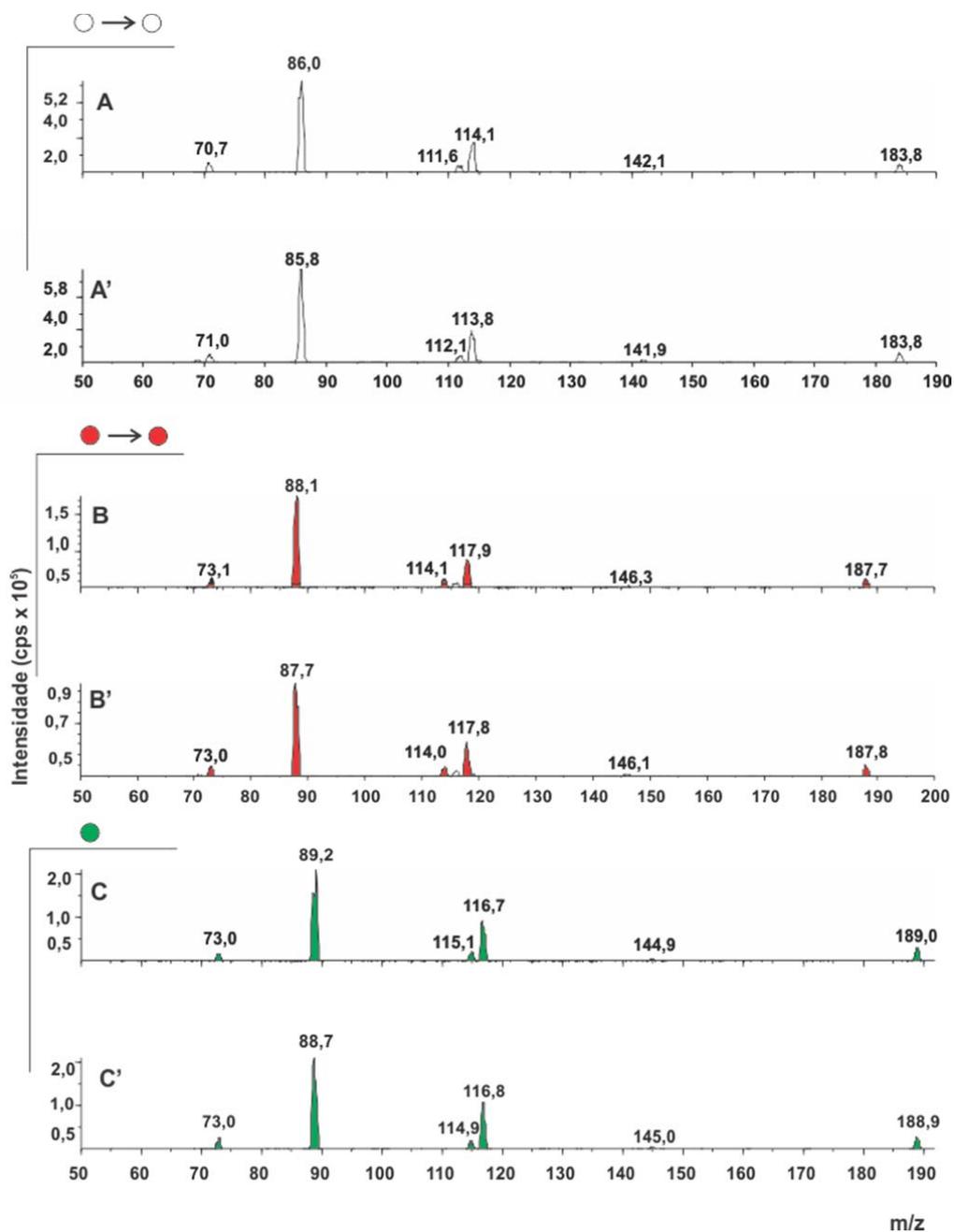
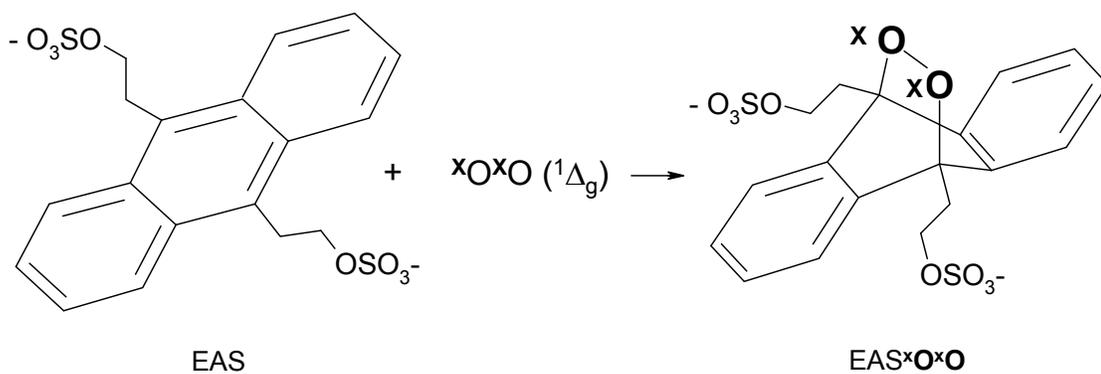


Figura 4.76 - Análises da dSp por HPLC-ESI/MS/MS do íon fragmento m/z 184 resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica, 116 Da da fragmentação do íon precursor m/z 300. (A) e (A') ¹⁶O¹⁶OX's, (B) e (B') ¹⁸O¹⁸OX's proveniente da reação de dGuo com ¹⁶O₃ e (C) e (C') ¹⁵N₅-dGuo com O₃. A terminologia A ; B ; C, refere-se ao isômero 1 e A' ; B' e C' ao isômero 2.

4.14. Captação química do $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) gerado na reação de 2'-desoxiguanosina com $^{18}\text{O}_3$ e durante a decomposição do $^{16}\text{O}_3$ utilizando EAS e analisado EAS $^{18}\text{O}_2$.

De forma mais elaborada buscou-se mais um indício da geração de O_2 ($^1\Delta_g$) nas reações com ozônio através da captação química. Em vista das propriedades químicas do O_3 , chamamos atenção da dificuldade de controlar um sistema composto por dois reagentes, isso se deve a sua propriedade altamente oxidante, ou seja, altamente eletrofílico. Sendo assim a escolha do captador foi devido ao EAS possuir substituintes hidrossolúveis e pela ausência de duplas ligações localizadas no substituinte ligado ao antraceno.

Com a finalidade de obter informações a respeito do mecanismo envolvido na geração de O_2 ($^1\Delta_g$) durante a decomposição do $^{16}\text{O}_3$ e informações sobre a origem dos átomos de oxigênio presentes na molécula de O_2 ($^1\Delta_g$), uma vez que, experimentos anteriores demonstraram a presença de O_2 ($^1\Delta_g$) evidenciado no estudo da emissão de luz monomolecular. Assim o captador químico EAS (molécula duplamente carregada) foi utilizado no sistema e o endoperóxido correspondente (EASO₂), figura 4.77, foi analisado por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas.



X : 16 ou 18

Figura 4.77 - Reação de captação do $O_2 (^1\Delta_g)$ a partir de um derivado de antraceno EAS gerando o respectivo endoperóxido EASO₂.

Inicialmente analisou-se um padrão de EASO₂ e EAS¹⁸O₂ sintetizado a partir do DHPN¹⁸O₂ com ¹⁶O₂ ($^3\Sigma_g^-$) dissolvido na solução por HPLC com detecção SRM no modo de ionização negativa nas transições 228 → 212 e 230 → 212, referente à perda do endoperóxido, figura 4.78.

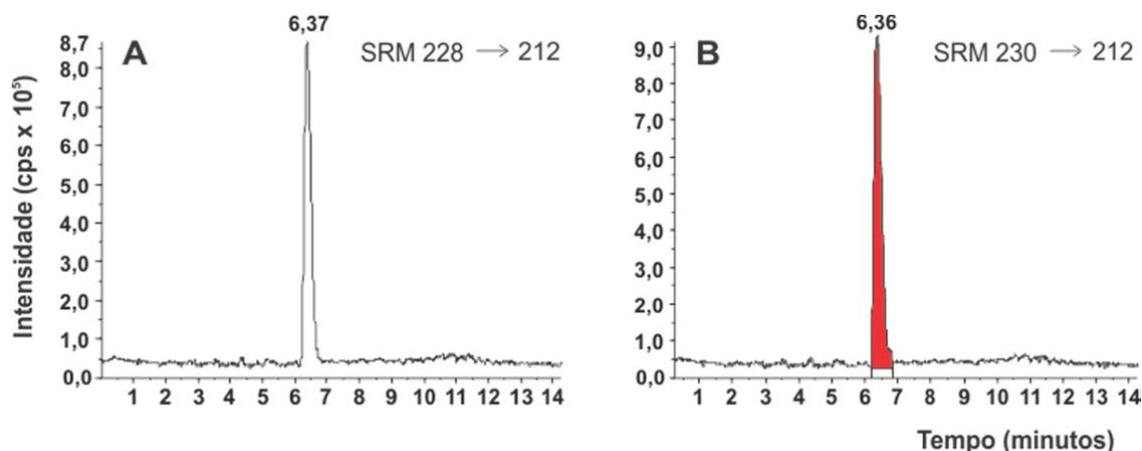


Figura 4.78 – Detecção de EASO₂ e EAS¹⁸O₂ proveniente da captação do O₂ (¹Δ_g) (DHPN¹⁸O₂) por HPLC-ESI/MS/MS nas transições (A) 228 → 212 e (B) 230 → 212. A cor vermelha corresponde a incorporação de dois átomos de ¹⁸O.

A formação do EASO₂ derivado durante a decomposição do O₃ foi confirmada por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM na transição 228 → 212. A figura 4.79 exhibe os cromatogramas obtidos durante a decomposição do O₃ em (A) D₂O e (B) H₂O, o qual observa-se um sinal mais intenso em D₂O, caracterizando a formação do O₂ (¹Δ_g). A caracterização do EASO₂ foi obtida pela análise de suas fragmentações, MS², o espectro de massas do íon precursor com m/z 228 exhibe um íon fragmento majoritário em m/z = 212, [EAS - 2H]²⁻, resultante da perda de 2 átomos de oxigênio presentes na molécula.

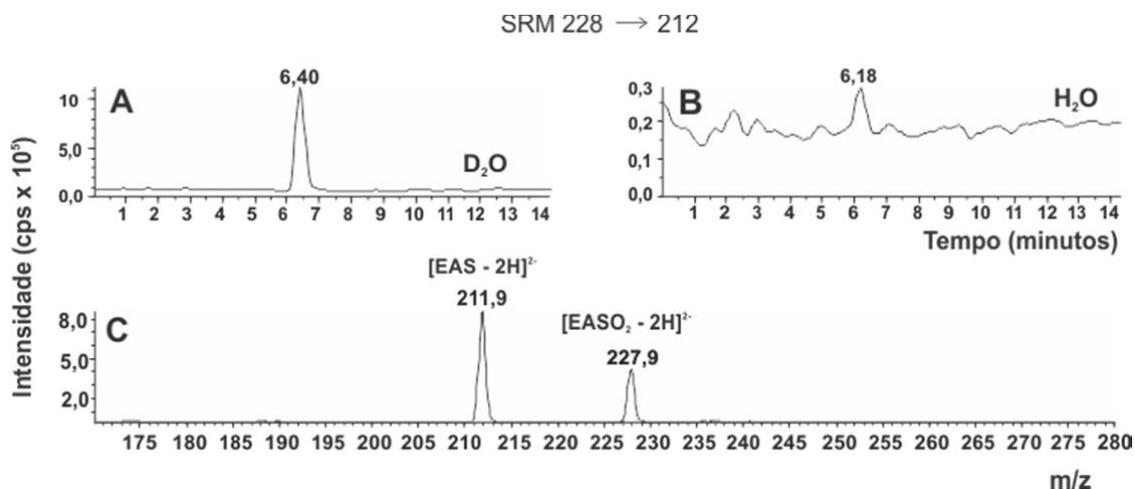


Figura 4.79 – Detecção de EASO₂ e EAS¹⁸O₂ proveniente da decomposição do O₃ por HPLC-ESI/MS/MS na transição 228 → 212 em (A) D₂O e (B) H₂O e (C) espectro de massas do íon precursor m/z 228.

Uma vez identificada a formação de O₂ (¹Δ_g) através da ferramenta comumente usada, a captação química na decomposição do ozônio, onde ficou clara a maior formação de EASO₂ em água deuterada, a qual prevalece à contribuição do O₂ (¹Δ_g) na formação do endoperóxido. Com o intuito de investigar a origem dos oxigênios contidos na molécula do oxigênio singlete proveniente da reação da dGuo com ozônio, deste modo, estudou-se a reação da dGuo com ozônio marcado isotopicamente a partir do ¹⁸O₂ (³Σ_g⁻) com a adição de EAS. Como esperado a figura 4.80 apresenta os cromatogramas obtidos para íon precursor com m/z (A) 228, (B) 229 e (C) 230 correspondente ao EAS¹⁶O¹⁶O, EAS¹⁶O¹⁸O e EAS¹⁸O¹⁸O, respectivamente. Observa-se claramente a formação predominante de EAS¹⁸O¹⁸O, em menores proporções a formação de EAS¹⁶O¹⁸O e uma pequena contribuição de EAS¹⁶O¹⁶O.

A identidade do íon precursor foi confirmada através da análise da fragmentação de m/z 230. A figura 4.80 (D) exhibe os íons fragmentos em m/z 230

correspondente à molécula marcada isotopicamente com dois átomos de oxigênio-18 e m/z 212 correspondente a molécula de EAS (duplamente carregada), proveniente da perda do endoperóxido marcado.

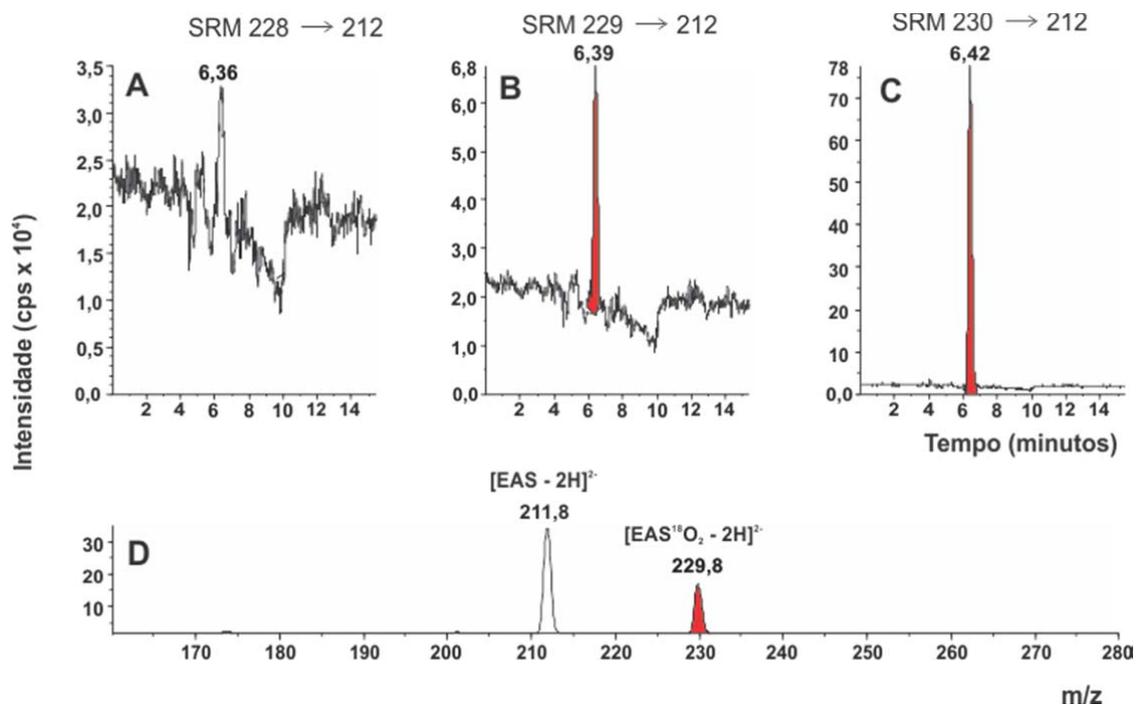


Figura 4.80 – Detecção de (A) EASO₂, (B) EAS¹⁶O¹⁸O e (C) EAS¹⁸O₂ proveniente da reação da dGuo com ¹⁸O₃ por HPLC-ESI⁻/MS/MS na transição 228, 229 e 230 → 212 e (D) espectro de massas do íon precursor m/z 230. O íon majoritário com m/z 212 corresponde à molécula sem os dois átomos de oxigênio, sendo duplamente carregada. A massa molar do EAS é de 444 g.mol⁻¹.

5. DISCUSSÃO

A presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em sistemas biológicos ocasiona alterações oxidativas nas biomoléculas, que, por sua vez podem conduzir a mudanças nas funções biológicas e a diversas lesões que são prejudiciais ao funcionamento celular. Dentre as espécies reativas o $O_2 (^1\Delta_g)$ tem um especial interesse, pois possui um caráter eletrofílico e é capaz de reagir com biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA. Ademais, a sua geração é evidenciada em meio biológico através de reações que envolvem as enzimas peroxidases, tais como lactoperoxidase, mieloperoxidase e cloroperoxidase (Kanofsky, 1983, 1984 e 1985, 1989), através da fagocitose (Steinbeck *et. al.*, 1992) e na peroxidação lipídica (Russell, 1957; Howard e Ingold, 1968; Miyamoto *et. al.*, 2003). Outra ocorrência da geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ em quantidades consideráveis provém das reações de O_3 com biomoléculas (Kanofsky e Sima, 1993). Por isso, o ozônio exógeno (poluente ou não) inalado leva a uma série de espécies secundárias reativas como o $O_2 (^1\Delta_g)$, produtos potencialmente tóxicos e biomoléculas oxidadas. As espécies antioxidantes encontradas no fluído de revestimento epitelial pulmonar, como ácido úrico, GSH e ácido ascórbico interceptam o O_3 , podendo gerar $O_2 (^1\Delta_g)$ em grandes quantidades. Especificamente o ácido ascórbico, além de gerar oxigênio molecular singlete forma também hidroperóxidos consequentemente induzindo o efeito pró-oxidante (Colussi A. J., *et. al.*, 2007, 2008).

Recentemente foi proposto que os anticorpos podem catalisar a geração de oxidantes na defesa celular, incluindo o hidróxido-hidrotrióxido (H_2O_3) e O_3 provenientes da reação do $O_2 (^1\Delta_g)$ e H_2O , Babior, 2003.

Ainda neste panorama do efeito tóxico do O₃, sugere-se pelo menos em parte que a cascata dos produtos gerados através da ozonização dos lipídeos contidos nos fluidos pulmonares seja responsável pelos danos gerados e pela sinalização da inflamação (Pryor, *et. al.*, 1995).

O elevado potencial mutagênico do O₃ é caracterizado, principalmente, por substituição das bases essencialmente localizado no G:C (75%), característico de espécies reativas de oxigênio, porém ocorrem em um padrão específico, sequências preferenciais (*hotspots*) de ações específicas para o O₃. Esses locais foram definidos após comparação dos efeitos de outras espécies oxidantes, como radicais hidroxilas, O₂ (¹Δ_g), e radiação ionizante, Jorge *et al.*, 2002. Atualmente, sabe-se que dentre as bases do DNA, a 2'-desoxiguanosina preferencialmente reage significativamente com o O₂ (¹Δ_g) em pH neutro.

Logo, as aminas terciárias, secundárias e primárias também são conhecidas como fonte de oxigênio molecular singlete nas reações com ozônio (Sonntag *et. al.*, 2001), as quais estão presentes no DNA. Compostas por aminoácidos básicos (lisina e arginina) as histonas, e as poliaminas (esperminas e espermidinas), as quais estão envolvidas na defesa antioxidante e empacotamento do DNA.

Apesar dos mecanismos de danos ao DNA por ação do O₃ permanecerem em grande parte desconhecidos, essas evidências fundamentaram a proposta deste trabalho, no qual se iniciou um estudo mecanístico com o intuito de investigar a importância da toxicidade proveniente das reações do O₃, a contribuição do O₂ (¹Δ_g) e seus produtos de oxidação.

5.1 Geração e concentração do O₃

O sistema de geração de ozônio é baseado no método de descarga elétrica por efeito corona. Simplificadamente, esse processo é fundamentado em uma diferença de potencial de alta voltagem com dois eletrodos assimétricos. Desta forma alguns parâmetros podem alterar o rendimento do ozonizador. Em sistemas alimentados por um fluxo de gás oxigênio comercial com grau de pureza de 99,9% o rendimento é de 4 a 11% e na sua ausência cai para 1 a 4%, EPA Guidance Manual, (1999). Dentre esses parâmetros podem ser citados o fluxo de gás oxigênio, o potencial de redução aplicado ao eletrodo e a umidade. Sendo assim, a concentração de O₃ poderia ser controlada de forma simples, porém o rendimento da geração de ozônio não se apresentou linear durante os experimentos. A grande dificuldade apresentada foi controlar o ozonizador com os melhores parâmetros do arranjo experimental. Dentre os parâmetros ajustados o que apresentou menor erro experimental foi composto por fluxo de gás oxigênio de 6 mL por minuto com concentração 50 mg por hora de O₃ o que equivale a 25% do potencial de redução do gerador tanto no método por titulação iodométrica como por espectrometria do UV-Visível, item 4.1. O intuito não foi comparar a concentração de O₃ entre uma técnica com a outra, visto que, por iodometria ocorrem reações de oxirredução e por espectrofotometria há a solubilização do ozônio em H₂O ou D₂O. Assim constatou-se a dificuldade de controlar a quantidade de O₃ gerada. Desta forma, optamos por não quantificar as modificações e sim detectá-las e caracterizá-las. A ozonização das amostras foi conduzida de forma branda (25 % do ozonizador) para detectar os produtos primários da reação e não os seus subprodutos, uma vez que o O₃ é uma

espécie altamente reativa. Para as análises de luminescência a saturação da D₂O ou H₂O foi realizada a 75% do ozonizador.

5.2 Medidas da emissão monomolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação de O₃ com moléculas orgânicas.

Nas duas últimas décadas tem-se enfatizado a contribuição das reações secundárias aos danos biológicos causados pelo ozônio. Algumas espécies intermediárias foram apontadas como importantes nessas reações secundárias, tais como, H₂O₂, hidroperóxidos, radical hidroxila e ânion radical superóxido. Contudo recentemente na literatura é intensamente discutida a geração de O₂ (¹Δ_g) a partir das reações de ozônio com uma função potencial de um papel intermediário de importância na toxicidade do O₃.

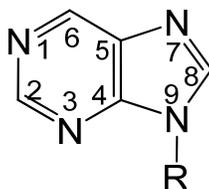
Nas reações de O₃, o O₂ (¹Δ_g) é gerado quando o O₃ reage pela transferência de um átomo de oxigênio, o qual é incorporado na molécula formando um produto oxidado, enquanto os dois outros átomos de oxigênio resultantes do O₃ são liberados como O₂ (¹Δ_g). Este processo ocorre pela regra da conservação do *spin*, onde determina que o dióxigênio resultante esteja em seu estado eletronicamente excitado, pois a molécula orgânica e o O₃ assim como os produtos estão em seu estado fundamental singlete (Muñoz *et al.*, 2001). O mecanismo molecular desse processo tem como intermediário o ânion trióxido, o qual quando possui um tempo de vida maior e energia favorável se decompõe a O₂ (¹Δ_g), ademais a protonação do ânion trióxido pela água pode competir com a sua decomposição e outras reações podem acontecer.

De forma geral, um estudo teórico do ânion HO—OO^- demonstrou que a ligação HO—OO^- dessa espécie possui um comprimento de 1,88 Å indicando predominantemente uma ligação não covalente ou ligação covalente muito fraca ($4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), sugerindo a interação entre ânion HO^- e $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, Cerkovnik J, 2001.

Estratégias experimentais comumente utilizadas para demonstrar a presença de $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ são elas: captação química; supressão física; uso de solventes deuterados e estudos de luminescência. Contudo para não haver a geração de artefato, o que nos levaria a uma interpretação equivocada, nossos aliados para desvendar as questões estudadas nesse trabalho são o estudo de luminescência monomolecular, bimolecular e solventes deuterados, por prologarem o tempo de vida do $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$.

5.2.1 Medidas de emissão monomolecular do $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ na reação da Guanina e da 2'-desoxiguanosina com O_3 .

A figura 5.1 apresenta a estrutura molecular da purina para um auxílio durante a discussão.



R = 2- desoxirribose (dR)

R = H (purina)

Figura 5.1 – Estrutura molecular purínica.

A quimiluminescência observada para a Guanina e seus derivados apontou um perfil semelhante em todos os pH's analisados. Dentre eles a maior intensidade da emissão de luz em 1270 nm foi proveniente das reações em meio ácido, pH 2,0. Curiosamente a constante de velocidade para as reações do O₃ com a Gua e seus derivados aumenta cerca de 250 vezes quando desprotonadas (Sonntag, 2001). Assim a desprotonação ocorre no nitrogênio-1 da guanina, na faixa de pH entre 9.2 - 9.6, ambos com menor energia livre, ou seja, a forma tautomérica mais estável, formando uma ressonância entre o nitrogênio-1 com o carbono-6 (Bernhard Schlegel, *et. al.* 2003), figura 5.2. Entretanto constatou-se a menor emissão de luz mesmo com a formação do ânion na estrutura, figura 5.2. É interessante notar que compostos desprotonados, os quais possuem uma densidade eletrônica maior favorecem a formação do O₂ (¹Δ_g), como o ânion fenolato que reage aproximadamente seis vezes mais rápido do que o fenol com o O₃ e conseqüentemente observa-se a mudança de mecanismo formando o trióxido e o outro envolve o radical hidroxila, respectivamente.

Na faixa de pH entre 2,0 - 3,5 o sítio de protonação preferencialmente ocorre no nitrogênio-7, formando um cátion. Essa mudança tautomérica na estrutura altera a densidade eletrônica da Gua e seus derivados, essa evidência pode ser interpretada de duas formas quanto à contribuição de O₂ (¹Δ_g) no sistema: o favorecimento da geração do intermediário ânion trióxido, devido ao arranjo da densidade eletrônica da molécula e em baixo pH exista uma contribuição para a protonação do ânion trióxido favorecendo sua decomposição em O₂ (¹Δ_g). Além disso, a Gua e seus derivados apresentam menor potencial de redução entre as bases o que seria esperada a reação por transferência de elétrons, no entanto Sonntag demonstrou justamente o contrário, com a adição de álcool *tert* butílico foi

constatado a ausência do radical hidroxila. Continuando, a luminescência foi observada em todos os pH's estudados para a Gua e seus derivados não observando a contribuição da 2-desoxirribose na ausência de emissão de luz, figura 4.15.

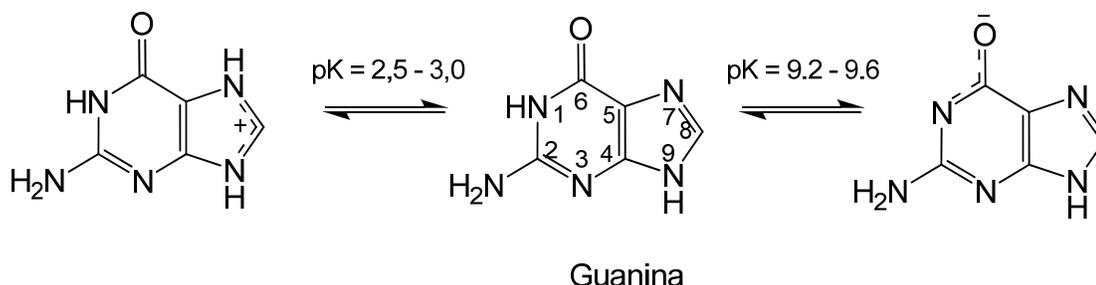


Figura 5.2 – Formas tautoméricas da Guanina em função do pH.

A quimiluminescência foi detectada exclusivamente para dGuo utilizando NaN_3 como supressor físico O_2 ($^1\Delta_g$), a figura 4.11 mostra o efeito da supressão da luminescência em aproximadamente 80%, mesmo observando a ausência de emissão de luz em 1270 nm para o controle da reação com NaN_3 (figura 4.12) é prematuro sugerir o efeito da supressão física do O_2 ($^1\Delta_g$), visto que a maioria dos supressores físico do O_2 ($^1\Delta_g$) reagem rapidamente com ozônio, assim a redução da luminescência causada pela adição do supressor pode ser devido ao consumo do mesmo pelo ozônio ao invés do efeito supressor, tabela 1.7.

Ademais o efeito da geração de O_2 ($^1\Delta_g$) em função da concentração da 2'-desoxiguanosina na reação com ozônio foi estudada, desta forma a luminescência se mostrou dependente da concentração da dGuo linearmente, é importante observar que partiu-se de pequenas concentrações de dGuo 0,15 μM , desta forma observou-se que o ozônio não foi totalmente consumido na primeira adição de dGuo,

sendo assim na mesma solução de O_3 foi injetada uma segunda solução da mesma concentração de dGuo e a luminescência foi observada com menor intensidade. Assim o perfil de emissão de luz nesse experimento manteve-se igualmente em todas as concentrações, mostrando uma luminescência instantânea, figura 4.13.

A luminescência dos produtos de reação da dGuo com O_3 foi realizada para avaliar se são hidroperóxidos estáveis. Desta forma, ao se adicionar Ce^{4+} há a formação de radicais peroxilas, os quais formam um intermediário tetróxido levando à formação de $O_2 (^1\Delta_g)$, pelo mecanismo de Russell. Como resultado observou-se a ausência de emissão de luz a 1270 nm (figura 4.19).

5.2.2 Medidas de emissão monomolecular na reação da Adenina e 2'-desoxiadenosina com O_3 .

Interessantemente a adenina e seus derivados têm um perfil distinto da guanina. A figura 4.15 apresenta bem esse perfil, no qual nota-se uma maior intensidade de emissão de luz em pH 9,0 (pK_2 adenina = 9.0 - 9.8) e em pH 2,0, (pK_1 Adenina = 4.2) observa-se a ausência da emissão de luz em 1270 nm. As formas tautomérica da Ade são apresentadas na figura 5.3.

A adenina é a única base que reage substancialmente com ozônio pelo mecanismo radicalar. Apesar de seu potencial de redução elevado, que não permitiria que a transferência de elétrons ocorresse na reação. No entanto, o radical hidroxila é formado em aproximadamente 60% (Sonntag, 2001) na reação. Desta forma, deve haver outra possibilidade para a formação do $\cdot OH$, sendo a probabilidade que seu precursor seja o $O_2^{\cdot -}$ (consequentemente ocorre a

transferência de elétron para o O_3 formando $O_3^{\cdot-}$). Assim a velocidade de reação da Ade e seus derivados dependem do grau de desprotonação. Sendo assim, uma possível justificativa para a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ ser mais intensa sob a desprotonação seria o aumento da densidade eletrônica da molécula. Permitindo o ataque eletrofílico do O_3 de forma que o fechamento do ciclo seria desfavorecido pela carga negativa localizada. Deste modo, favorecendo a reação pelo mecanismo envolvendo o intermediário trióxido.

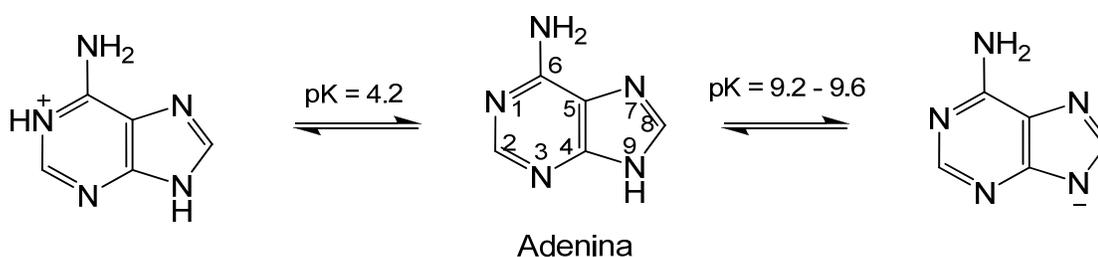


Figura 5.3 – Formas tautoméricas da Adenina em função do pH.

5.2.3 Medidas de emissão monomolecular na reação da Xantina com O_3 .

Com o intuito de obtermos mais informações sobre a proposta de mecanismo da dGuo e 8-oxodGuo com ozônio na geração de $O_2 (^1\Delta_g)$ a luminescência da xantina foi avaliada. Deste modo, observou-se um perfil de emissão de luz semelhante ao da Ade e seus derivados mostrando uma luminescência intensa (somente em pH 9,0). Contudo nos outros pH's avaliados observa-se a ausência da emissão de luz. Neste ponto, a característica difere da adenina e guanina, pois para a primeira em solução neutra há uma emissão de luz e a segunda em todos pH's é evidenciado a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$. A xantina possui um $pK_1 = 0,8$, a sua protonação está localizada no N9 e N7 do anel imidazol, formando um monócation, o $pK_2 = 7.7$ a

desprotonação do N3 leva a formação de uma oxopurina, visto que o ânion formado em N3 está em ressonância com o a carbonila em C2 (Kulikowska E., et. al., 2004). A figura 5.4 exhibe as estruturas desprotonadas e protonadas. Estas diferenças na estrutura causam um favorecimento entre o tipo de mecanismo de geração da luminescência. Visto que os sítios mais prováveis da reatividade com O_3 são a dupla ligação entre os carbonos 4 e 5, tão bem como o carbono 2 da carbonila e por fim o carbono 8 do anel imidazóico.

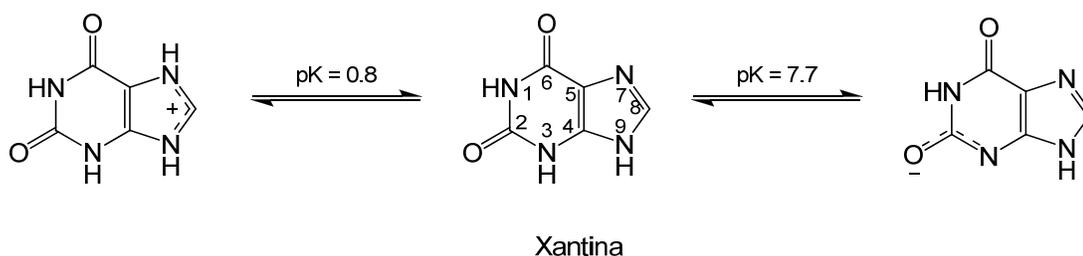


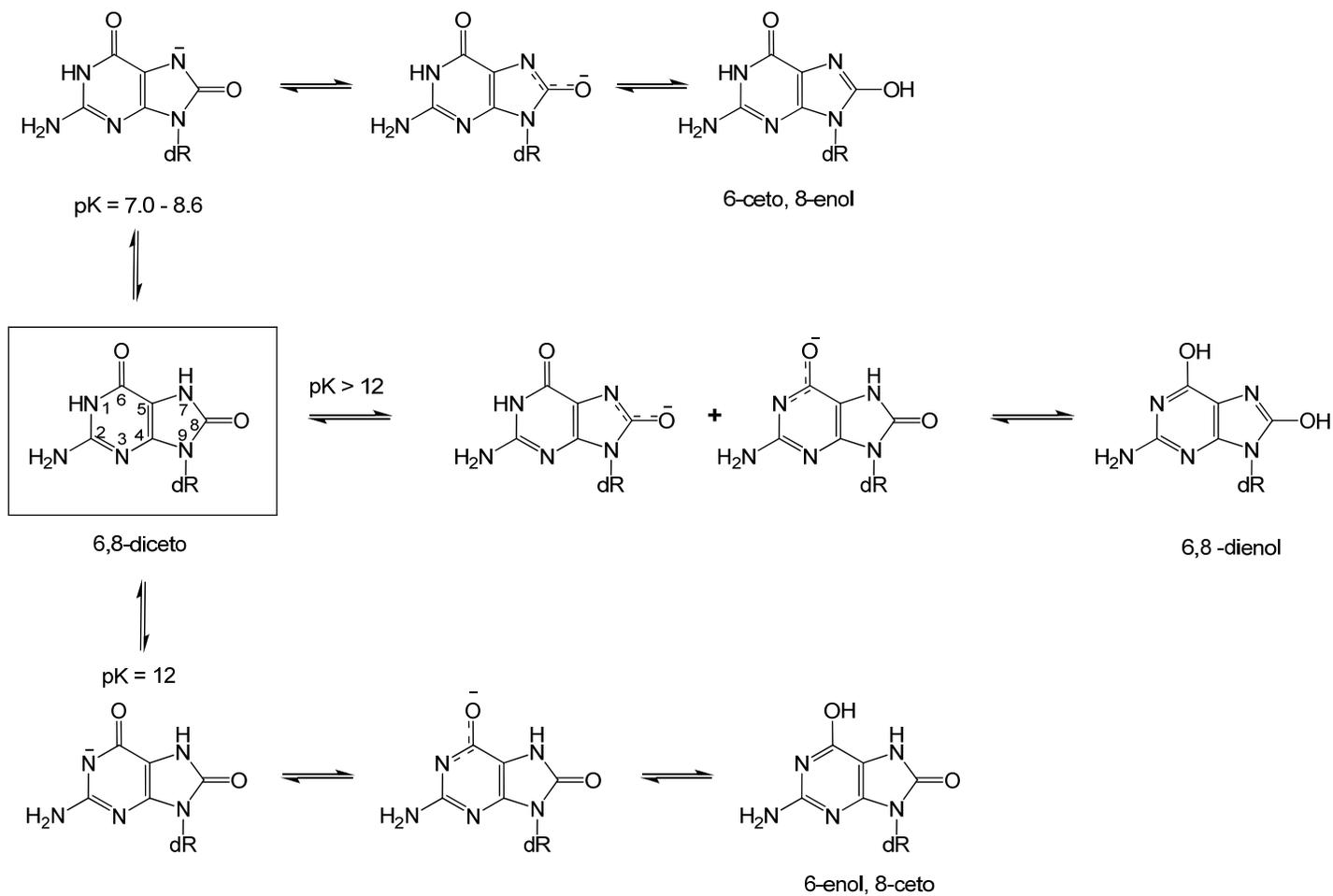
Figura 5.4 – Formas tautoméricas da Xantina em função do pH.

5.2.4 Medidas de emissão monomolecular na reação da 8-oxodGuo com O_3 .

A quimiluminescência da 8-oxodGuo apresenta um padrão de emissão de luz que difere na intensidade quando comparado ao da dGuo nos pH's avaliados. Em pH 2,0 a dGuo tem uma intensidade maior do que em relação aos outros pH's analisados, contudo para a 8-oxodGuo observa-se uma maior intensidade em pH 9,0, uma característica da xantina e Ade e seus derivados. A 8-oxodGuo apresenta uma carbonila localizada no C8, isso pode excluir um sítio de reação de ataque do O_3 , uma vez que a dupla ligação entre o N7=C8, foi oxidada formando C=O (a função

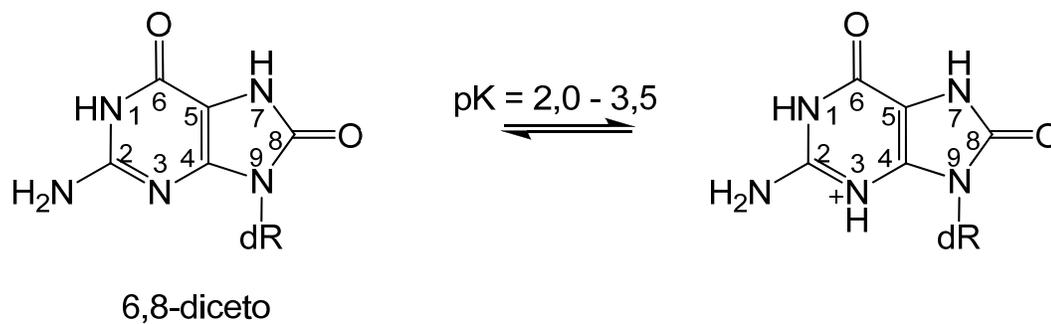
cetona), como o ozônio é um agente altamente eletrofílico ele preferencialmente reage onde exista maior densidade eletrônica. Sendo excluído um possível sítio de reação da molécula, a possibilidade de ataque direto do O_3 se localizaria na dupla ligação $C4=C5$, levando à formação de um ânion trióxido. A figura 5.15 apresenta a rota de reação com marcação isotópica envolvendo o intermediário trióxido. O favorecimento da luminescência em pH alcalino é sugerido devido à desprotonação do N7 proporcionando um aumento da carga negativa em $pH = 7,0 - 8,6$, e em $pH \sim 12$ há a desprotonação do N1, este nitrogênio se torna básico devido a dissociação do N7-H, como não há carga positiva no C5 para um rápido fechamento do ciclo, o que levaria a formação do intermediário Criegee. Desta forma aumentaria o tempo de vida do hidrotrioxo levando a geração de $O_2 (^1\Delta_g)$. As formas tautoméricas da 8-oxodGuo em função do pH podem ser vistas na figura 5.5, partindo da 8-oxodGuo (6,8-diceto).

Em $pH 6,0$ e $2,0$ a intensidade observada é a mesma, entretanto o tempo de decaimento em $pH 6,0$ se apresenta cerca de 100 segundos o que difere de todos os outros sistemas estudados. Em $pH 2,0 - 3,5$ há a protonação do N3, conferindo uma carga positiva na estrutura, figura 5.6.



dR = 2-desoxirribose.

Figura 5.5 – Formas tautoméricas da 8-oxodGuo em função do pH alcalino.

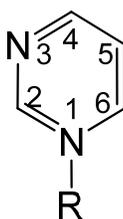


dR = 2-desoxirribose

Figura 5.6 – Formas tautoméricas da 8-oxodGuo (6,8-diceto) em função do pH ácido.

5.2.5 Medidas de emissão monomolecular na reação da timina e timidina com O₃.

A figura 5.7 apresenta a estrutura molecular da pirimidina para um auxílio durante a discussão.



R = 2- desoxirribose (dR)

R = H (pirimidina)

Figura 5.7 – Estrutura molecular do ciclo pirimidico.

De modo geral, segundo Cadet *et al.*, 1996, as pirimidinas possuem uma rota de oxidação preferencialmente via intermediário de Criegee com abertura do anel. Esta abertura está condicionada aos seus substituintes, quanto a sua influência de doador de elétrons ou sequestrador de elétrons. Embora a ozonólise da timina e timidina possuam vários aspectos mecanísticos em comum, há uma influência perceptível do substituinte em N1, 2-desoxirribose. Para a timidina o ozônio se adicionará na dupla ligação do carbono 5 e 6, e as características do N1 como doador de elétrons irá influenciar na abertura do anel, como também pode influenciar os intermediários formados (Flyunt *et. al.*, 2002).

Os aspectos mecanísticos da emissão de luz também estão condicionados ao substituinte do N1. Desta forma, em pH 9,0 a timina está desprotonada no N1 (figura 5.8) sua velocidade de reação é consideravelmente mais rápida, concomitantemente o mecanismo de reação deve ser parcialmente alterado, uma vez que observa-se a geração de oxigênio molecular singlete exclusivamente em pH alcalino. No caso da timidina observa-se a ausência da luminescência em todos os pH's avaliados.

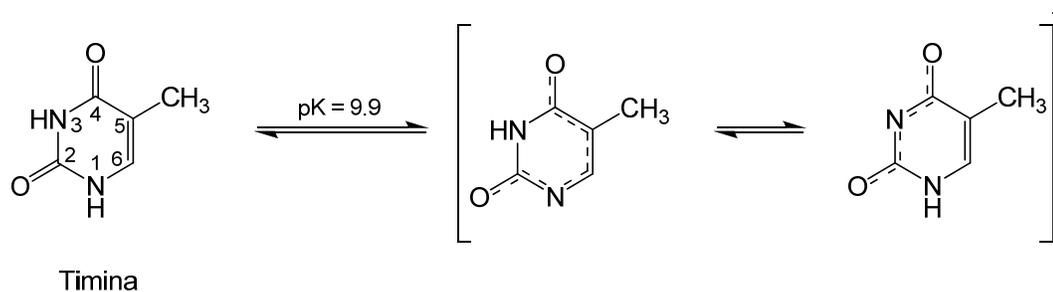


Figura 5.8 – Formas tautoméricas da timina em pH 9.9.

5.2.6 Medidas de emissão monomolecular na reação da citosina e 2'-desoxicitidina com O₃.

A 2'-desoxicitidina reage um pouco mais rápido do que a citosina, esse fato é mais provável devido ao efeito indutivo da 2-desoxirribose. Desta forma, o aspecto na quimiluminescência apresenta uma emissão de luz em pH 9,0, tanto para dCyd como para citosina. Exclusivamente em pH 6,0 observa-se uma leve luminescência para a dCyd. As formas tautoméricas estão apresentadas na figura 5.9.

Cadet *et al.*, caracterizou e identificou alguns produtos da oxidação das pirimidinas (2'-desoxicitidina e timidina) com o ozônio. Propondo a contribuição majoritária da rota via geração de um intermediário instável, o ozonida (Criegee), que leva a abertura da dupla ligação 5,6, figura 1.21.

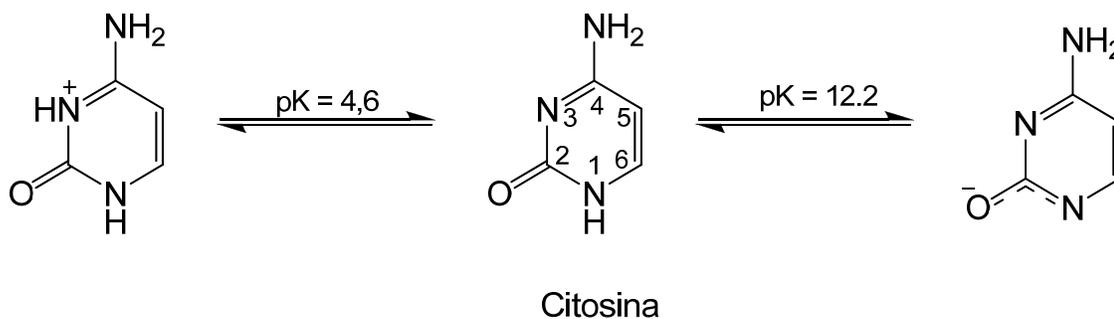


Figura 5.9 – Formas tautoméricas da citosina em função do pH.

A protonação e a desprotonação podem influenciar na contribuição da rota do mecanismo das reações com O₃. Um exemplo é observado, figura 5.10, o mecanismo de formação de um intermediário trióxido partindo da 5-clorouracila em pH alcalino, onde o nitrogênio (N1) da molécula está desprotonada. E em pH neutro

prevalece à espécie molecular neutra, mostrando a reatividade do ozônio via intermediário de Criegee, figura 5.11, (Muñoz *et al.*, 2001).

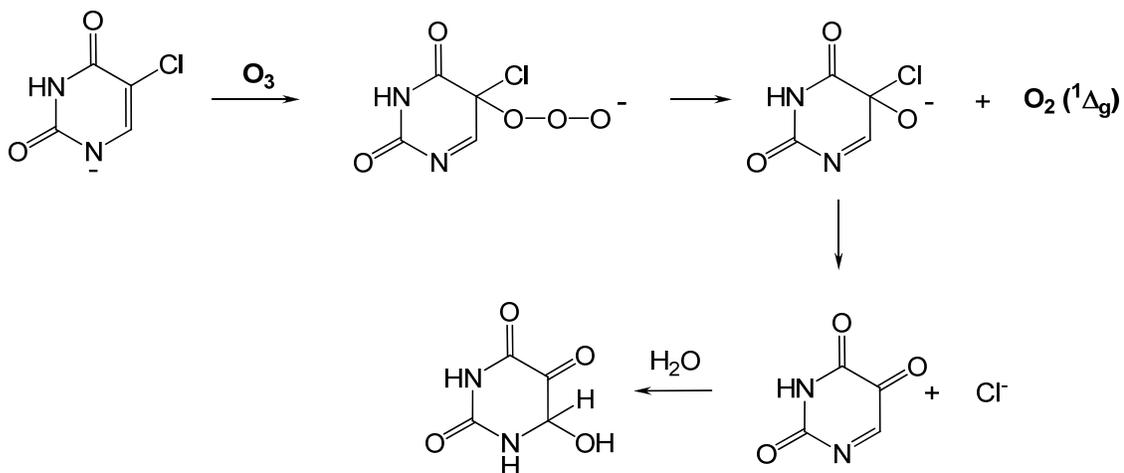


Figura 5.10 - Formação do intermediário trióxido e geração de oxigênio molecular singlete proveniente da 5-clorouracila em pH alcalino. (Muñoz *et. al.*, 2001).

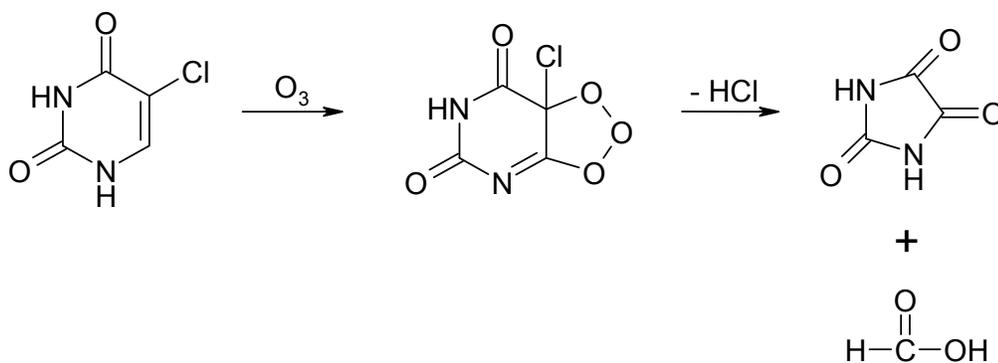


Figura 5.11 – Ciclo adição 1,3-dipolar do ozônio entre os carbonos cinco e seis da dupla ligação da 5-clorouracila. Subseqüentemente formando o intermediário de Criegee, produzindo ácido Clorídrico, ácido parabânico e ácido Fórmico.

5.2.7 Medidas de emissão monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) na reação das poliaminas: Espermina e Espermidina com ozônio.

As poliamidas são conhecidas por estar próximas ao DNA e estudos mostram a sua capacidade de desativação do O_2 ($^1\Delta_g$) e assim prevenindo danos ao DNA, por possuírem como função orgânica aminas primárias e secundárias (Wilson *et al.*, 1992). Elas também atuam como captadores de espécies reativas.

A constante da reação do ozônio com aminas depende fortemente do pH da solução, uma vez que apenas as aminas livres em equilíbrio reage com o ozônio, enquanto que as aminas protonadas não mostram praticamente reatividade. Assim quando a maioria das aminas está protonada a constante de velocidade de reação com O_3 é baixa, como consequência os radicais livres, o cátion amina radical e O_3^- são gerados, e, portanto, o O_3 e amina são consumidos na reação, implicando na redução da geração de O_2 ($^1\Delta_g$).

De forma geral, em solução aquosa, aminas terciárias, reagem com o ozônio, principalmente com a formação de aminóxido e O_2 ($^1\Delta_g$) e, em menores quantidades de aminas secundárias e do aldeído correspondente. A adição de álcool *tert*-butílico mostrou a redução das aminas livres e do aldeído correspondente, isso sugere que além da reação por transferência de um átomo de oxigênio para amina, existe a competição pelo mecanismo de transferência de elétrons (Muñoz *et. al.*, 2000).

Desta forma os aspectos da luminescência das poliaminas se mostraram dependentes do pH, de acordo com as características das reações das aminas com O_3 estudadas por Muñoz ,2000. Assim a figura 4.18 (A) e (B) retrata a ausência de

emissão de luz em pH 2,0, de forma que a maioria das aminas estão protonadas, como consequência há o favorecimento de outros mecanismos de reação. Em pH alcalino é observada a maior intensidade de luz tanto para a espermina como para a espermidina. Essas reações foram conduzidas em H₂O.

A forte evidência da geração de O₂ (¹Δ_g) é vista quando a reação é conduzida em D₂O, emissão de luz se torna bem intensa, como esperado 4.18.

5.3 Medidas da emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g)

5.3.1 Medidas da emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) na reação de ozônio com a 2'-desoxiquanosina.

A investigação do decaimento bimolecular ([O₂ (¹Δ_g)]₂) é muito complexa devido ao curto tempo de vida e a sua baixa concentração estacionária. Portanto a única forma de se obter informações sobre o decaimento do [O₂ (¹Δ_g)]₂ é o estudo de suas características de emissão na região vermelha do espectro em 634 e 703 nm. A formação do [O₂ (¹Δ_g)]₂ está em equilíbrio com o seu precursor O₂ (¹Δ_g). Portanto a emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) foi monitorada utilizando um filtro “cut-off” que permite apenas a passagem de luz de comprimento de onda maior que 570 nm. Desta forma, no sistema estudado foi possível observar a emissão de luz do [O₂ (¹Δ_g)]₂ em todos os pH's estudados, seguindo o mesmo perfil de emissão, no qual é visto uma maior intensidade em pH 2,0. Contrariamente ao esperado, a medida da luminescência na reação em D₂O resultou em uma supressão da emissão de luz.

Essa constatação sugere a possibilidade de mais de uma espécie eletronicamente excitada esteja emitindo acima de 570 nm, não sendo favorecida em D₂O, a carbonila excitada foi descartada, pois essa espécie emite abaixo de 570 nm. Ademais, de forma mais específica à luminescência no decaimento bimolecular foi adquirida por uma fotomultiplicadora juntamente com um monocromador, o qual seleciona o comprimento de onda escolhido, e neste caso, a emissão bimolecular foi medida em 634 nm, a figura 4.23 apresenta um sinal referente ao decaimento do [O₂ (¹Δ_g)]₂.

5.3.2 Medidas da emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) com as poliaminas.

A emissão bimolecular do O₂ (¹Δ_g) na presença das poliaminas apresentou um padrão de emissão de luz diferenciado quando comparado ao padrão de emissão em 1270 nm. Em pH ácido, o qual não favorece a geração de O₂ (¹Δ_g) foi observado uma luminescência neste pH tanto para a espermina como para espermidina. Além disso, o efeito do solvente deuterado, D₂O, a quimiluminescência foi suprimida igualmente como foi constatado para as reações da dGuo. Essas evidências não descartam a geração do [O₂ (¹Δ_g)]₂, porém sugere-se que possa haver emissão de luz proveniente de outras espécies eletronicamente excitadas. Assim um estudo adicional da química das reações do O₃ em meio aquoso precisam ser realizadas tão bem como um estudo complementar da quimiluminescência da região do visível.

5.3.3. Quimiluminescência durante a decomposição do ozônio e captação química do $O_2 (^1\Delta_g)$ por EAS.

A cinética da decomposição do ozônio durante 15 minutos foi adquirida por espectrometria do UV-Visível em $\lambda = 259$ nm. Destacou-se uma menor taxa de decomposição em D_2O , essa evidência pode ser explicada pelo fato da ligação O-D da D_2O apresentar uma menor energia vibracional, conseqüentemente para haver a quebra da ligação é necessário uma maior energia do sistema tornando o início da reação mais lenta, figura 4.26. Pode ser considerado também a velocidade de dissociação da H_2O ser cerca de três vezes maior que de D_2O , item 4.9.1. De forma contrária é observado em H_2O , onde a decomposição é mais rápida e, ao adicionar álcool *tert*-butílico a decomposição se torna mais lenta, porém maior do que em D_2O . A função do álcool *tert*-butílico é bloquear a propagação da reação em cadeia reagindo com radical hidroxila gerado. Como já mencionado anteriormente o mecanismo da decomposição do O_3 em água inicia-se pelos íons hidroxilas e inclui reações em cadeias sucessivas produzindo espécies reativas de oxigênio, ânion radical superóxido, ânion radical ozonida e radical hidroxila que propagam a reação em cadeia, às reações 1.17 a 1.20. Atualmente o mecanismo de decomposição é bem discutido e aceito, porém ainda não se apontou o estado eletrônico excitado do oxigênio molecular gerado durante a reação em cadeia.

A luminescência durante a decomposição do ozônio em D_2O e H_2O na região do visível com um filtro “*cut-off*” 570 nm revelou em meio aquoso ser mais lenta e constante durante 12 minutos, porém o perfil em D_2O apresenta uma menor decomposição. Desta forma uma justificativa pode ser fundamentada no experimento analisado medindo a absorvância do UV-Visível, pois claramente,

observa-se que a quantidade de ozônio manteve constante durante o 15 minutos. Interessantemente ao utilizar o filtro “*cut-off*” 570 nm, o qual permite selecionar a passagem de luz com comprimento de onda superior a 570 nm, era esperado um comportamento diferente em D₂O para a emissão do [O₂ (¹Δ_g)]₂, essa luminescência não descarta a formação do [O₂ (¹Δ_g)]₂, mas também indica que outra espécie eletronicamente excitada pode emitir acima de 570 nm, figura 4.27. Vale a pena ressaltar a complexidade da química do O₃.

De uma forma mais específica e característica a detecção da quimiluminescência na transição monomolecular em 1270 nm durante a decomposição do O₃ em D₂O foi constatada, sendo, portanto observado a contribuição do O₂ (¹Δ_g) no sistema estudado. De forma inequívoca um espectro na faixa de 1150 a 1350 nm foi adquirido pela primeira vez, o qual apresenta o espectro de emissão característico do O₂ (¹Δ_g), sendo mais intenso em D₂O quando comparado em H₂O, figura 4.28. Esse espectro pode ser comparado com a termodecomposição do DMNO₂, figura 4.4. Finalmente concluímos que o O₂ (¹Δ_g) é gerado na decomposição do O₃, adicionalmente outra espécie eletronicamente excitada é responsável pelo menos em parte pela luminescência proveniente da emissão no visível.

Com a finalidade de confirmar a formação de O₂ (¹Δ_g) na decomposição durante a decomposição do ¹⁶O₃, utilizamos a captação química. O EAS foi escolhido, deste modo a captação foi realizada em uma única fase. Sendo assim obtivemos a formação do EASO₂ analisado por HPLC-ESI/MS/MS no modo SRM na transição 228 → 212, claramente é vista a captação do O₂ (¹Δ_g) ao compararmos os cromatogramas obtidos em D₂O aproximadamente 30 vezes mais intenso do que

H₂O. O espectro de massas do íon precursor com m/z 228 exibe um íon fragmento com m/z 212 referente à perda do endoperóxido. Portanto demonstrado a presença do O₂ (¹Δ_g) durante a decomposição do O₃, figura 4.79.

Em busca de informações valiosas sobre a origem dos isótopos dos átomos de oxigênio presentes na molécula de O₂ (¹Δ_g), a captação química foi utilizada como ferramenta. Para este fim desenvolveu-se uma metodologia para a geração de ozônio marcado isotopicamente a partir do ¹⁸O₂ (³Σ_g⁻), figura 3.2. Nesse sistema avaliou-se a contribuição da formação do EAS¹⁸O¹⁸O proveniente da reação da dGuo com ozônio. A captação do átomo de oxigênio-18 pelo EAS gerando EAS¹⁸O¹⁸O foi bem sucedida como apresentado o cromatograma detectado no modo SRM na transição 230 → 212, e confirmado pelo seu espectro de massas do íon precursor com m/z 230 exibe um íon fragmento com m/z 212. De forma específica, a maior contribuição foi obtida a partir do EAS¹⁸O¹⁸O, o qual apresentou uma intensidade de aproximadamente 11 vezes maior do que o EAS mono marcado com ¹⁸O, EAS¹⁶O¹⁸O (m/z 229) e de forma pouco significativa o EAS não marcado, EAS¹⁶O¹⁶O foi detectado, figura 4.80.

Possivelmente o O₃ tenha reagido preferencialmente com EAS, entretanto o endoperóxido formado é proveniente da captação do ¹⁸O₂ (¹Δ_g) já mencionado acima pelo efeito do solvente deuterado. As reações do ozônio direta não poderiam formar o endoperóxido derivado. A adição 1,3-dipolar a dupla ligação do antraceno levaria ao intermediário de Criegee, o qual abriria o anel formando cetona ou aldeído.

De qualquer forma o experimento realizado da captação química do ¹⁸O₂ (¹Δ_g) proveniente do ¹⁸O₃ contribui para informações valiosas sobre o mecanismo de geração do O₂ (¹Δ_g), mostrando que a maior corroboração da captação provém dos dois átomos de oxigênio isotopicamente marcados. Pode haver também

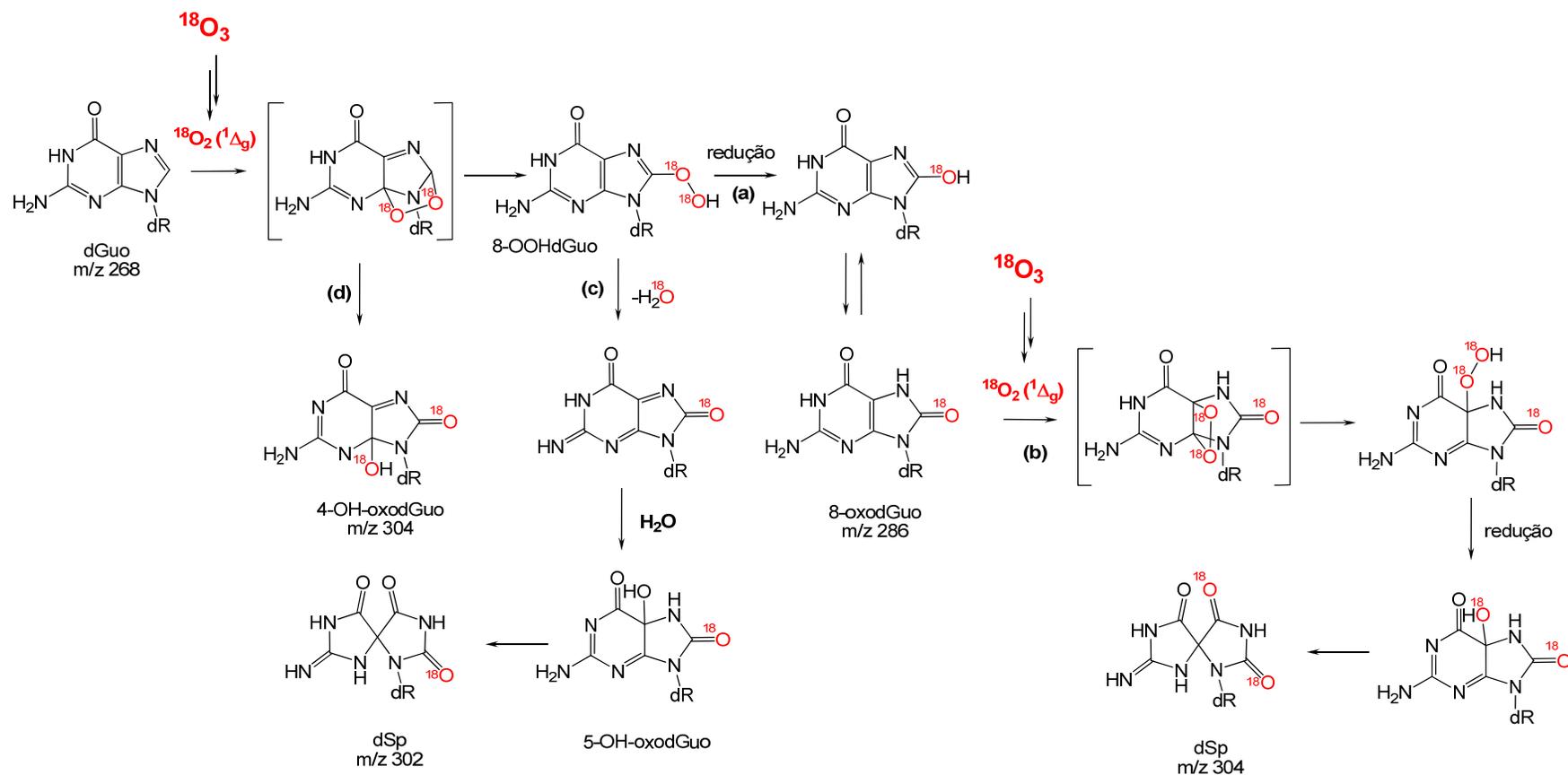
transferência de energia do $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) para o $^{16}\text{O}_2$ ($^3\Sigma_g^-$), Martinez *et al.*, 2004, o que justificaria a formação do EAS $^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ em baixíssimas proporções.

5.5 Aspectos mecanísticos e caracterização dos produtos formados das reações do ozônio com 2'-desoxiguanosina e derivados.

5.3.4 Caracterização da 8-oxodGuo

A 8-oxodGuo é uma modificação da 2'-desoxiguanosina comumente detectada pela ação de vários agentes oxidantes e é altamente susceptível a oxidações por várias espécies reativas. Desta forma, o presente estudo abordou aspectos mecanísticos da formação da 8-oxodGuo proveniente da reação da dGuo com O_3 . Sendo assim, com o auxílio da marcação isotópica foi gerado $^{18}\text{O}_3$ em um sistema descrito no item 3.15. Foi possível identificar a ^{18}O -8-oxodGuo (m/z 286) com relativa abundância e, de forma pouco significativa a 8-oxodGuo não marcada (m/z 284). Adicionalmente mais uma evidência da formação da 8-oxodGuo foi atribuída da ozonização da 2'-desoxiguanosina marcada com átomo de ^{15}N , [$^{15}\text{N}_5$]-dGuo, onde constatou-se a formação da [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodGuo (m/z 289). A caracterização dos produtos com m/z 284, 286 e 289 foi analisado no modo MS^2 . Levando em consideração os resultados obtidos da captação química no sistema composto por dGuo + EAS + $^{18}\text{O}_3$ foi caracterizado a formação de EAS $^{18}\text{O}^{18}\text{O}$. Juntamente com os experimentos da quimiluminescência foi apontada a geração de O_2 ($^1\Delta_g$) tanto no decaimento monomolecular como bimolecular em todos os sistemas estudados para a dGuo, ressaltando que dentre todas as bases

nitrogenadas e os nucleosídeos a dGuo reage com ozônio e preferencialmente gera $O_2 (^1\Delta_g)$. Estas evidências até aqui demonstradas sugerem que a formação da 8-oxodGuo é proveniente da reação com $O_2 (^1\Delta_g)$, o qual é gerado nas reação da dGuo com O_3 , figura 5.12 (a). Contudo a contribuição do radical hidroxila na formação da 8-oxodGuo não pode ser descartada, uma vez que, a oxidação da dGuo envolve a formação de um transiente a 8-hidroxi-7,8-dihidroguanina, este intermediário é formado pela adição do $\cdot OH$ no carbono 8, de forma que o nitrogênio-7 está na forma radicalar. Conseqüentemente este transiente é reduzido para gerar a 8-oxodGuo (Cadet, *et. al.*, 2003), sendo assim no modelo químico aqui estudado não há um agente redutor no meio reacional para transferir um elétron para o transiente formado, contudo em meio biológico não é descartada a contribuição do $\cdot OH$. A contribuição por transferência de elétrons talvez seja improvável por falta de um agente redutor, desta maneira, o cátion radical da 2'-desoxiguanosina formado por abstração de um elétron, o qual gera o transiente 8-hidroxi-7,8-dihidroguanina após uma hidratação e somente uma redução poderia levar a formação da 8-oxodGuo. Além disso, Sonntag demonstrou através de um estudo do perfil da constante de velocidade do O_3 com a Gua e seus derivados com adição de álcool *tert*-butílico e na sua ausência nenhum efeito, portanto, foi excluída a contribuição por transferência de elétrons ou $\cdot OH$.



dR = 2-desoxirribose

Figura 5.12 – Mecanismo de reação da oxidação da dGuo pelo $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ proveniente do $^{18}\text{O}_3$.

Finalmente, uma consideração da contribuição do ataque direto do O_3 a dGuo ainda não está muito clara, devido ao sítio preferencialmente de reação com O_3 . Preferencialmente o ataque seria na dupla C4=C5 na pirimidina ao C8 do imidazol, contudo para formar a 8-oxodGuo seria mais provável a adição ser no C8, de forma cautelosa, o mecanismo resultaria no intermediário Criegee, a característica dessa rota se dá pela adição 1,3-dipolar, o qual abriria o anel resultando em um zwitterion subsequentemente a formação de um hidroxihidroperóxido, figura 5.13. O qual é resultante da adição de uma molécula de água gerando um composto com adição de dois átomos de oxigênio (Molko, 1993 ; Flyunt, 2002 e Lener, 2003) de forma que o esperado para formar a 8-oxodGuo seria o acréscimo de um átomo de oxigênio. Em vista do experimento realizado da ozonização da dGuo na presença da $H_2^{18}O$ apontou uma irrelevante contribuição na formação da ^{18}O -8-oxodGuo (m/z 286) quando comparada a formação da molécula não marcada (m/z 284), figura 4.32. Um ataque direto do O_3 para formar a 8-oxodGuo não pode ser descartado, de forma geral, o O_3 poderia reagir no carbono 8 formando o intermediário trióxido com consequente geração de O_2 ($^1\Delta_g$). Contudo os estudos ainda são inconclusivos.

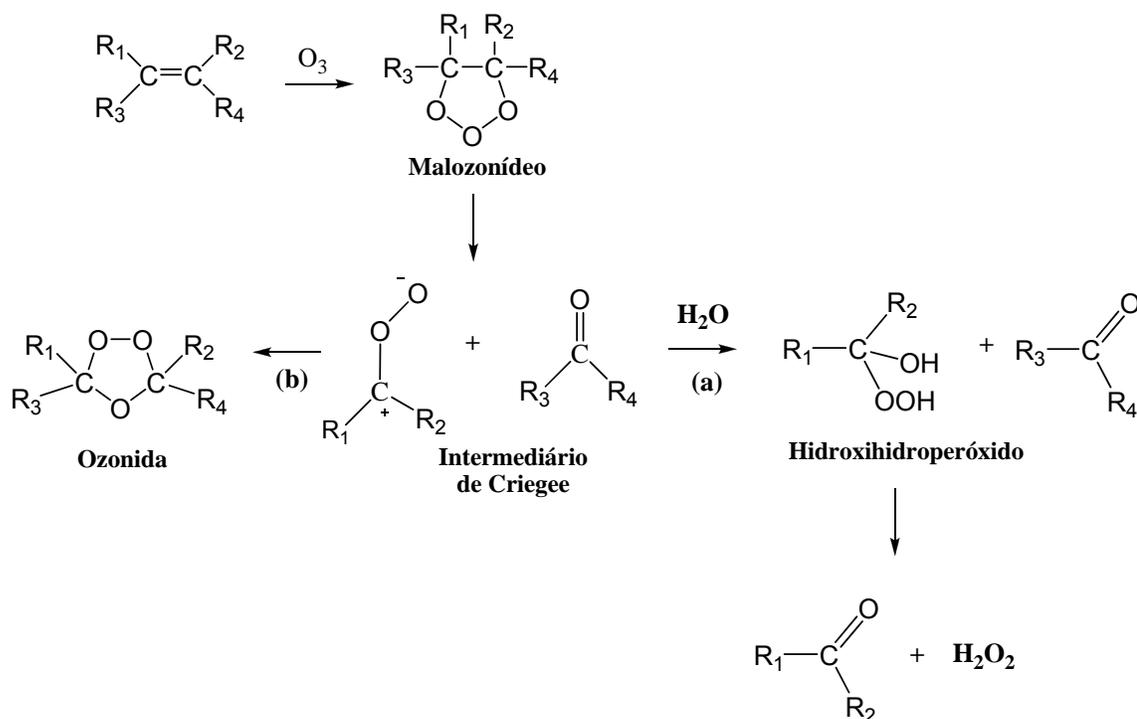


Figura 5.13 – Mecanismo geral da rota de oxidação do O₃ via intermediário de Criegee. R um substituinte, (Criegee, 1957) .

5.3.5 Caracterização da dSp

Os diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína foram identificados e caracterizado nas reações com O₃ a partir da ozonização da dGuo, [¹⁵N₅]-dGuo, 8-oxodGuo e 8-MeOdGuo. Com a finalidade de se obter mais informações sobre o tipo de mecanismo que leva à formação da ¹⁶O¹⁶O-dSp (m/z 300) utilizou-se como ferramenta a geração de ¹⁸O₃, figura 3.2. Sendo assim, nas reações a partir da dGuo identificou-se a ¹⁶O¹⁸O-dSp (m/z 302) e ¹⁸O¹⁸O-dSp (304) e a partir da 8-oxodGuo foi detectada ¹⁶O¹⁸O-dSp (m/z 302). Ademais, os padrões de fragmentação no modo MS² foram obtidos para o íon precursor com m/z 302 e 304 e para os íons produtos

m/z 184,186 e 188, referentes à clivagem da ligação *N*-glicosídica. Portanto, constatou-se os íons fragmentos característicos dos diastereoisômeros da dSp anteriormente descritos por Wenchen Luo, 2000 e Martinez, 2007, inclusive com os incrementos de massas esperados pela incorporação dos átomos de oxigênio-18. De forma que, os diastereoisômeros identificados na reação com O₃ foram caracterizados como a dSp e não como os diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo (Ravanat e Cadet, 1995). Posteriormente foi verificado que eles eram, na verdade, uma mistura de diastereoisômeros da dSp (Niles *et. al.*, 2001, Cadet, 2006).

Discutindo os aspectos mecanísticos primeiramente será abordada a formação da dSp proveniente da dGuo. Avaliando a contribuição do O₂ (¹Δ_g) através do efeito do solvente observa-se claramente a dependência da formação da dSp em D₂O (figura 4.46), ou seja, um produto característico do O₂ (¹Δ_g). Em vista dessa abordagem mecanística buscou-se indícios da proporção de formação da ¹⁶O¹⁸O-dSp (m/z 302) e ¹⁸O¹⁸O-dSp (304) proveniente do ¹⁸O₃, de forma esperada, a dSp duplamente marcada (m/z 304) foi detectada em maiores proporções em relação a dSp mono marcada (m/z 302), devido a complexidade do sistema não é possível inferir a formação da dSp em função do consumo da dGuo, pois inúmeros produtos oxidados são formados nesse sistema, mesmo sendo uma ozonização branda. Baseado nessas informações analisou-se a formação da dSp na presença da H₂¹⁸O, sendo assim, identificou-se a dSp não marcada aproximadamente 5 vezes mais do que a dSp com a incorporação de um átomo de oxigênio-18, esse resultado indica, portanto a participação da água na rota de formação da dSp em um mecanismo minoritário.

Os resultados obtidos fornecem um apoio consistente para o mecanismo de formação da dSp ser proveniente de duas possíveis rotas: (I) a adição de água em

um intermediário da rota de formação da dSp através da reação da dGuo com uma molécula de O_2 ($^1\Delta_g$), Kang e Foote (2002b), figura 5.12 rota (c) e (II) a $^{18}O^{18}O$ -dSp poderia ser explicada pelo ataque de outra molécula de $^{18}O_2$ ($^1\Delta_g$) sobre a ^{18}O -8-oxodGuo o que levaria à formação da dSp duplamente marcada, figura 5.12 rota (b).

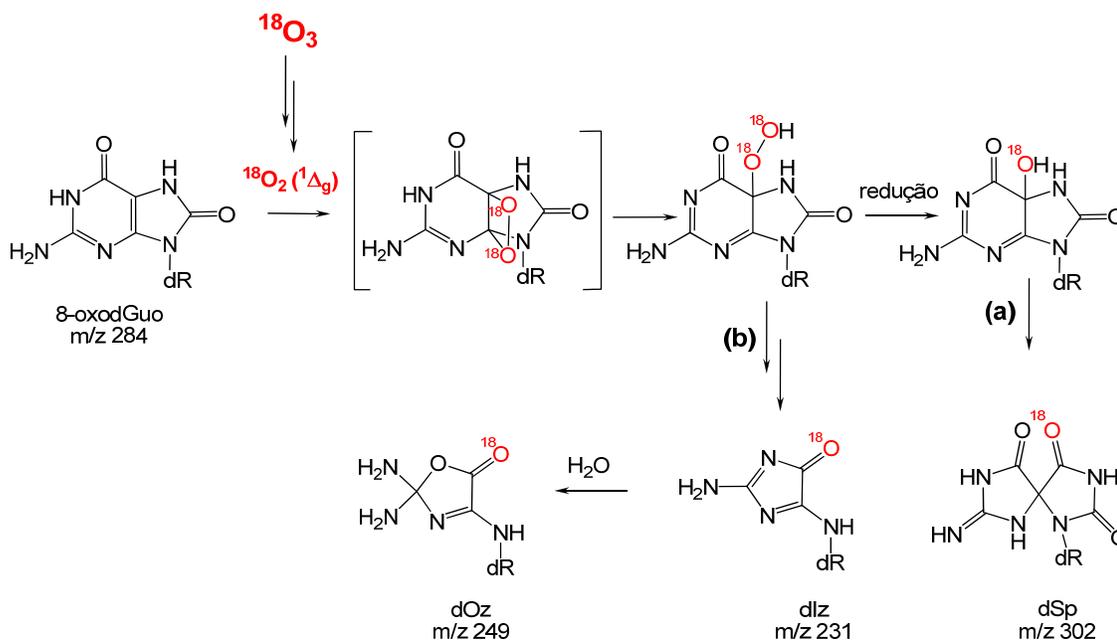
A possibilidade da contribuição da formação da dSp pelo ataque direto do O_3 ainda não é clara, pois seria necessário duas moléculas de O_3 para formar a dSp, ou seja, um ataque na dupla C4=C5, e o outro no N7=C8 pelo mecanismo via o intermediário trióxido.

Como proposto na literatura a reação da dGuo com O_2 ($^1\Delta_g$) gera dois diastereoisômeros da dSp majoritariamente e em menores proporções a 8-oxodGuo. E vista deste fato e dos resultados até aqui apresentados a ozonização da 8-oxodGuo foi realizada com a finalidade de mais informações do mecanismo de reação do O_3 com a dGuo. Como esperado foi detectado a dSp majoritariamente, igualmente as análises provenientes do $^{18}O_3$ resultaram na formação da $^{16}O^{16}O$ -dSp (m/z 300) em menores proporções cerca de 10 vezes menos do que $^{18}O^{18}O$ -dSp (m/z 304). Ademais reação da 8-oxodGuo com O_3 na presença da $H_2^{18}O$ confirmou uma pequena participação da H_2O no mecanismo. A partir deste ponto buscamos informação da contribuição de O_2 ($^1\Delta_g$) na formação da dSp, desta forma avaliou-se o efeito do solvente, sendo assim as análises procederam em D_2O , a qual resultou a formação da dSp aproximadamente 3 vezes maior do que em H_2O .

Os aspectos mecanísticos da reação da 8-oxodGuo com O_3 , duas propostas podem ser elaboradas baseadas nas evidências experimentais apresentadas acima. Adicionalmente, a quimiluminescência evidenciada na geração de O_2 ($^1\Delta_g$) no decaimento monomolecular para a reação da 8-oxodGuo com O_3 : (I) a contribuição do O_2 ($^1\Delta_g$) no mecanismo de reação já é conhecido, o qual ocorre pela cicloadição

do tipo [2+2] do O_2 ($^1\Delta_g$) na ligação C4=C5 gerando um hidroperóxido no C5, via um dioxetano (Sheu e Foote, 1995b). Subsequentemente formando a 5-OOH-8-oxodGuo com a sua redução leva a formação da 5-OH-8-oxodGuo e finalmente as dSp diastereoisoméricas (Raoul e Cadet, 1996; Martinez (Raoul e Cadet, 1996; Martinez *et al.*, 2002) , figura 5.14 rota (a) e (II) a proposta mecanística é fundamentada no ataque direto do O_3 na dupla ligação C4=C5, subsequentemente formaria o trióxido, o qual liberaria O_2 ($^1\Delta_g$) e com rearranjos dos elétrons geraria a 5-OH-8-oxodGuo e finalmente a dSp, figura 5.15 rota (a). Dentro dessa proposta o intermediário formado na dupla ligação C4=C5 poderia ser um epóxido com geração de O_2 ($^1\Delta_g$). O intermediário epóxido é susceptível ao ataque nucleofílico da água e consequentemente o anel é aberto com adição de um átomo de oxigênio proveniente da água, perdendo um íon hidroxila no C4 formando o intermediário 5-OH-8-oxodGuo, finalmente a dSp, 5.15 rota (b). Ademais, a incorporação do átomo de oxigênio derivado da água depende da propensão do epóxido ao abrir o anel via ataque no C4 ou a perda de ^-OH no C5, dessa forma podendo haver uma possibilidade de formação da 4-OH-8-oxodGuo. Alguns mecanismos foram propostos na oxidação da 8-oxodGuo por transferência de um elétron com subsequente ataque nucleofílico da H_2O para formar dSp (Luo, *et. al.*, 1999 e Slade G P, 2007). Adicionalmente uma segunda posposta da oxidação por um elétron da 8-oxodGuo utilizando um complexo de cromo, o qual forma um epóxido como intermediário com posterior ataque nucleofílico da H_2O (Slade G P, 2007). A formação da dSp proveniente da reação da 8-oxodGuo com ácido hipocloroso ou em um sistema composto por mieloperoxidase- H_2O_2 - Cl^- , segundo Suzuki T, 2001 apontou que o átomo de Cl do OCl^- se comporta como Cl^+ , um forte agente eletrofílico, o qual se

adiciona a dupla ligação entre o C4 e C5, seguido de um ataque de uma molécula de H₂O no C5 formando a 5-OH-8-oxodGuo e finalmente a dSp.

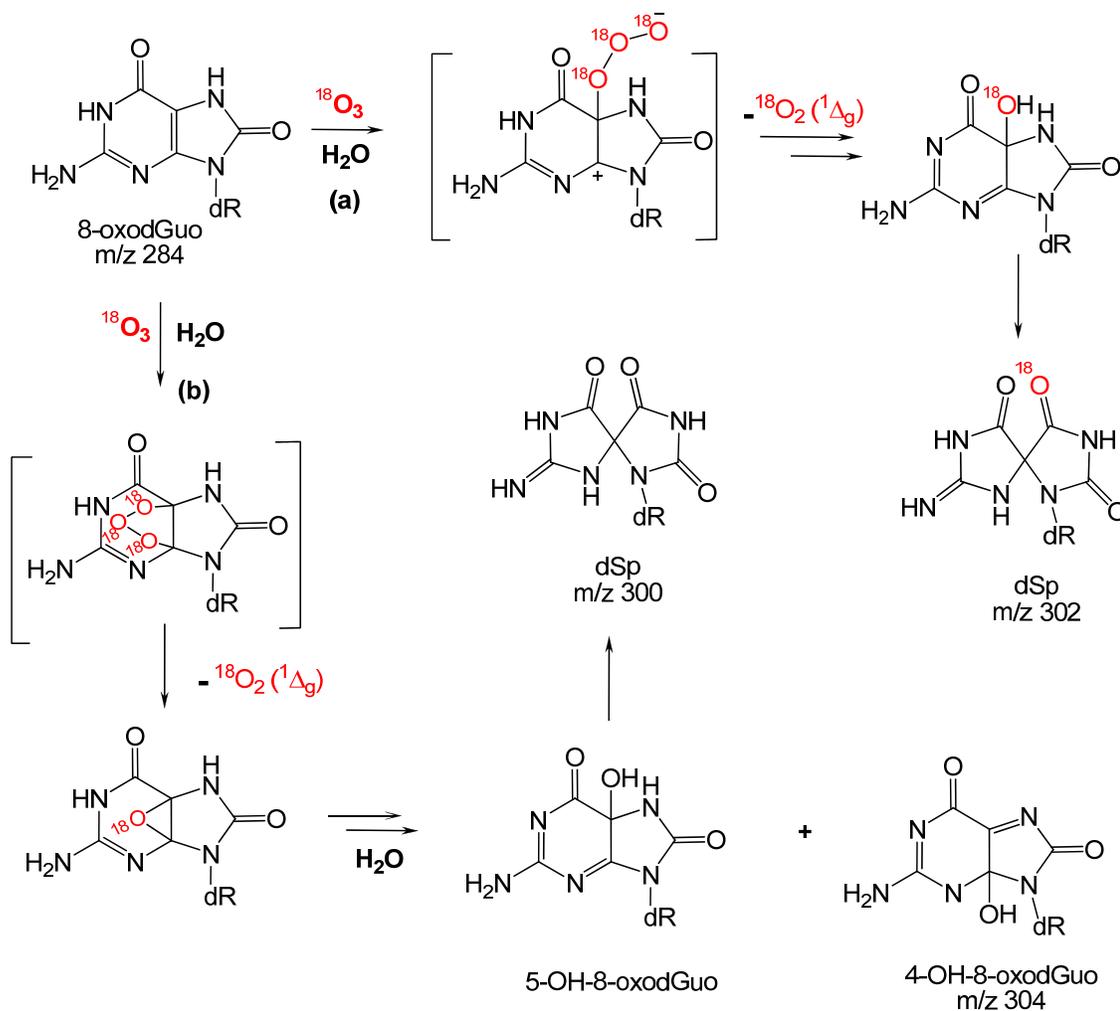


dR = 2-desoxirribose

Figura 5.14 – Mecanismo de reação da oxidação da 8-oxodGuo pelo

$^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) proveniente do $^{18}\text{O}_3$.

A ozonização da MeOdGuo resultou na formação dos diastereoisômeros da MeOdSp, os quais foram identificados e caracterizados por HPLC-MS/MS. O seu perfil de fragmentação apresenta-se igualmente ao da dSp. De forma característica a clivagem da ligação *N*-glicosídica resultando no íon produto mais intenso referente à m/z 189, o qual possui 14 Daltons a mais da dSp. Surpreendentemente não foi observado significativamente o efeito do solvente, desta forma poderia haver uma contribuição maior da reação direta do O₃ na dupla ligação C4=C5 da MeOdGuo.



dR = 2-desoxirribose

Figura 5.15 – Mecanismo de reação da oxidação da 8-oxodGuo pelo $^{18}\text{O}_3$.

5.3.6 Caracterização da Imidazolona e Oxazolona

Os principais produtos da oxidação da dGuo por transferência de um elétron e pelo $\cdot\text{OH}$ em solução aerada foram evidenciados como a dOz e sua precursora a dlz, Cadet, 1994 e Raoul, 1996. O mecanismo é representado pela formação de um transiente radical (cátion radical da dGuo e adição do $\cdot\text{OH}$ no C4) subsequentemente outros intermediários são formados, seguido da adição de O_2 ou

O_2^- e um ataque nucleofílico da H_2O , com alguns rearranjos leva a perda de CO_2 e de formamida, conseqüentemente a formação da dlz, Vialas, 1998), que sofre hidrólise acompanhada da incorporação de uma molécula de água levando à formação da dOz (figura 4.64) (Raoul, 1995 e Cadet, 2003), figura 5.16, Ademais, a dlz e dOz são formadas pelo mecanismo clássico da oxidação da dGuo com o O_2 ($^1\Delta_g$) mais especificamente a partir do intermediário formado a 5-OOH-8-oxodGuo, o processo envolve a abertura do anel da pirimidina na ligação entre o carbono 5 e 6 do hidroperóxido, depois de rearranjos há a formação da dlz que forma a dOz, (Raoul, 1997) figura 5.14 rota (b).

As reações da 8-oxodGuo e a MeOdGuo por transferência de um elétron também resultam na formação da dlz e dOz, proveniente do intermediário 5-OH-8-oxodGuo e pelo O_2 ($^1\Delta_g$) derivado do intermediário 5-OOH-8-oxodGuo, Martinez e Cadet, 2003. Nestas reações esses produtos foram detectados em menores proporções quando comparados a dSp.

Desta forma a dlz e sua precursora foram identificadas e caracterizadas em todos os sistemas estudados, ou seja, a partir da ozonização da dGuo, 8-oxodGuo e 8-MeO-oxodGuo.

Em relação aos aspectos mecanísticos ainda é prematuro inferir uma contribuição preferencial das possíveis rotas de mecanismo do O_3 . Contudo através dos resultados obtidos provenientes da marcação isotópica do $^{18}O_3$, a proporção relativa da formação da $^{16}Odlz$ é aproximadamente seis e três vezes menor do que a $^{18}Odlz$ a partir da dGuo e 8-oxodGuo, respectivamente. A formação da dOz segue as proporções de forma análoga, adicionalmente não foi observado o efeito da D_2O em suas formações e nem a contribuição da $H_2^{18}O$ na formação da dlz. Sendo assim, estas evidências não suportam a contribuição O_2 ($^1\Delta_g$). A imidazolona e sua

precursora (oxazolona) são geradas pelo intermediário a 5-OOH-8-oxodGuo a partir da dGuo e 8-oxodGuo, figura 5.15 (b), juntamente com o mecanismo de transferência de um elétron (figura 5.16) e a contribuição do ataque direto do O₃ a partir da reação com 8-oxodGuo, figura 5.15.

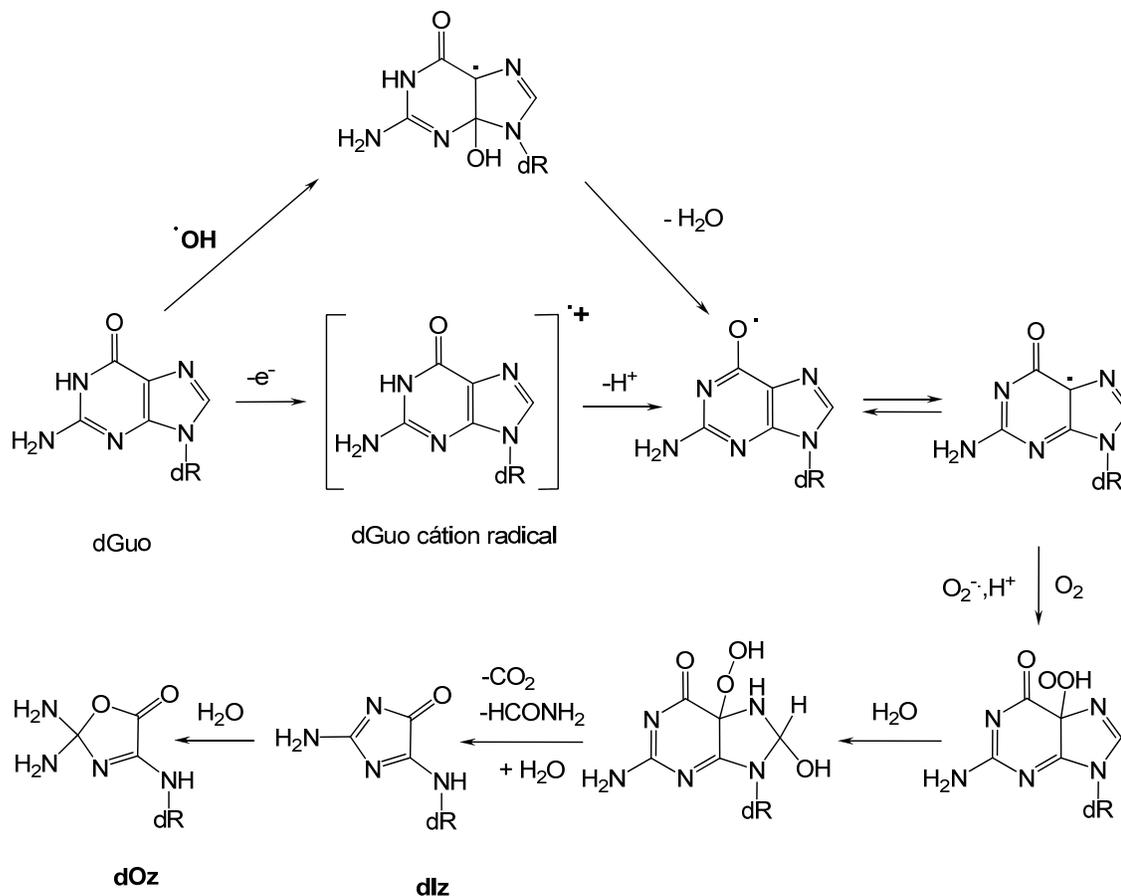


Figura 5.16 - Mecanismo de formação da dOz e sua precursora proveniente da oxidação da dGuo por transferência de um elétron e pelo radical hidroxila, adaptado, Cadet *et. al.*, 2003.

5.3.7 X_1 e X_2

X_1 e X_2 são dois produtos que parecem ser exclusivamente da reação da dGuo com O_3 ainda não identificados. Esses produtos possuem o mesmo espectro de absorção e a mesma razão massa/carga, o que sugere serem dois isômeros ou duas formas em equilíbrio, uma aberta e a outra fechada. Interessantemente X_1 e X_2 são os produtos majoritários da reação, contudo se apresentam pouco estáveis. A grande dificuldade de elucidar a sua estrutura molecular se dá justamente no processo de purificação, secagem do solvente orgânico e remoção da água (fase móvel para purificação), desta forma se torna difícil fazer experimentos de RMN.

Supreendentemente esses produtos possuem a mesma razão massa carga da dSp e conseqüentemente o perfil de fragmentação de m/z 300 apresenta semelhança, sendo assim, o fragmento mais intenso corresponde a m/z 184, geralmente observado para os 2'-desoxirribonucleosídeos referente à clivagem da ligação *N*-glicosídica, apesar do íon fragmento m/z 117 (2-desoxirribose) aparece mais intenso para a dSp. Do mesmo modo os padrões de fragmentação no modo MS^2 do íon produto com m/z 184 para a dSp apresentam 5 íons fragmentos, dos quais apenas dois exibem a mesma razão massa/carga do perfil de fragmentação dos X's.

A marcação isotópica no oxigênio-18 ($^{18}O_3$) e nitrogênio-15 ($[^{15}N_5]$ -dGuo), confirmou o perfil de fragmentação obtido para os X's não marcados (m/z 300).

Em termos de mecanismo, o estudo envolvendo a marcação isotópica do oxigênio-18 foi possível detectar os produtos X_1 e X_2 com a incorporação de dois átomos de ^{18}O (m/z 304) e a incorporação de um átomo de ^{16}O e ^{18}O (m/z 302), o qual se torna insignificativo devido à diferença da intensidade relativa da formação

de m/z 302 (figura 4.72). Esta evidencia descarta o mecanismo clássico de Criegee, (figura 5.14), o O_3 reagiria via adição 1,3-dipolar (adição $2\pi + 4\pi$) na dupla ligação entre o carbono 4 e 5 gerando o malonozídeo, instável em água, seguido da clivagem do intermediário de Criegee, formando um aldeído ou cetona e o intermediário de Criegee. Subsequentemente um ataque nucleofílico da água no intermediário de Criegee proporciona a formação de um hidroxihidroperóxido com perda de H_2O_2 , gerando uma dicetona. Consequentemente os átomos de oxigênio do H_2O_2 são provenientes do O_3 , portanto apenas um átomo de oxigênio do O_3 é incorporado na estrutura, sendo que o outro é derivado da água. Lener *et al.*, 2003 demonstrou a ozonização do índigo carmine via intermediário de Criegee em $H_2^{18}O$ levou a formação do produto final com incorporação de um átomo de ^{18}O .

6. CONCLUSÃO

O ozônio é um poderoso agente oxidante caracterizado pela sua complexa reatividade química, no que diz respeito às possibilidades das rotas mecanísticas de suas reações, as quais estão intrinsicamente envolvidas na formação de espécies reativas secundárias, que fortemente podem contribuir para as principais causas de sua toxicidade.

Devido a pouca disponibilidade de dados estruturais relacionando os danos causados pela ação do O_3 às bases do DNA. O presente trabalho teve como proposta contribuir com um modelo químico envolvendo a reação do O_3 com a 2'-desoxiguanosina, uma vez que estudos anteriores apontaram que as lesões promovidas pelo ozônio ao DNA ocorrem preferencialmente na guanina. Sabendo-se que a reatividade do O_3 com biomoléculas geram quantidades significativa de O_2 ($^1\Delta_g$), conseqüentemente buscou-se elucidar a contribuição dessa espécie secundária nas modificações da dGuo no sistema estudado e os detalhes mecanísticos envolvidos. Desta forma, como ferramenta foi desenvolvida uma metodologia para a geração de ozônio marcado isotopicamente com átomos de oxigênio-18 a partir do $^{18}O_2$ ($^3\Sigma_g^-$), foi possível evidenciar a formação da dSp duplamente marcada e mono marcada, juntamente com a ^{18}O -8-oxodGuo, ^{18}O -dlz e ^{18}O -dOz, ademais dois novos produtos ainda não identificados foram detectados, as modificações foram analisadas por HPLC/MS/MS. Evidências espectroscópicas na geração de O_2 ($^1\Delta_g$) foram obtidas medindo o decaimento da emissão monomolecular na região do infravermelho próximo (1270 nm) e na emissão bimolecular na região vermelha do espectro (634 nm) para todas as bases

nitrogenadas e seus derivados, contudo a dGuo preferencialmente gerou $O_2 (^1\Delta_g)$ em diferentes condições experimentais. Adicionalmente a detecção do $^{18}O_2 (^1\Delta_g)$ durante a decomposição do $^{18}O_3$ foi obtida por captação química do $O_2 (^1\Delta_g)$ com EAS detectando o endoperóxido corresponde à adição de dois átomos de ^{18}O na posição 9,10 do anel antracênico do EAS. Além disso, mais uma evidência da presença do $O_2 (^1\Delta_g)$ foi inequivocamente demonstrada pela caracterização do espectro de emissão em 1270 nm.

De acordo com os dados obtidos, conclui-se que a contribuição da reatividade do $O_2 (^1\Delta_g)$ nas reações da dGuo e 8-oxodGuo com O_3 na formação dos produtos, não sendo possível excluir a contribuição de outras espécies reativas comumente associadas a oxidação proveniente do O_3 . Sendo assim, propusemos algumas possibilidades de mecanismo de reação. Tendo em vista que esse trabalho pretende contribuir para os esclarecimentos dos detalhes mecanísticos da rota de reação promovida pelo O_3 direta ou indiretamente, obtidos através da detecção do $O_2 (^1\Delta_g)$. Contudo ainda existem muitas questões a serem abordadas perante a complexidade da química do O_3 .

7. PERPECTIVAS

Diante das evidências apontadas neste trabalho é importante continuar a investigação da reatividade do ozônio direta ou indiretamente com as bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos, oligonucleotídeos possuindo sequencias de bases diferentes, DNA de *calf thymus* e em células como a pulmão. Desta forma, informações valiosas podem ser obtidas provenientes da geração de oxigênio molecular singlete nestes sistemas mais complexos. Tão bem como a identificação e caracterização dos produtos de oxidação provenientes do O_3 (diastereoisômeros da dSp, 8-oxodGuo, imidazolona, oxazolna, ácido oxalurico e dehidroguanidinohidantoína). Ademais a elucidação estrutural de X_1 e X_2 , os quais parecem ser produtos exclusivos da reação da dGuo com O_3 . Seria uma assinatura da presença do ozônio? Como ferramenta para avaliar a possível produção endógena de O_3 em sistema biológico assim como proposto na literatura.

Resultados preliminares foram obtidos provenientes da luminescência na transição monomolecular do O_2 ($^1\Delta_g$) da reação de DNA de *Calf Thymus* com O_3 , ademais uma evidência inequívoca da presença do O_2 ($^1\Delta_g$) foi obtida através do espectro da emissão de luz, figura 7.1 (A) e (B), respectivamente.

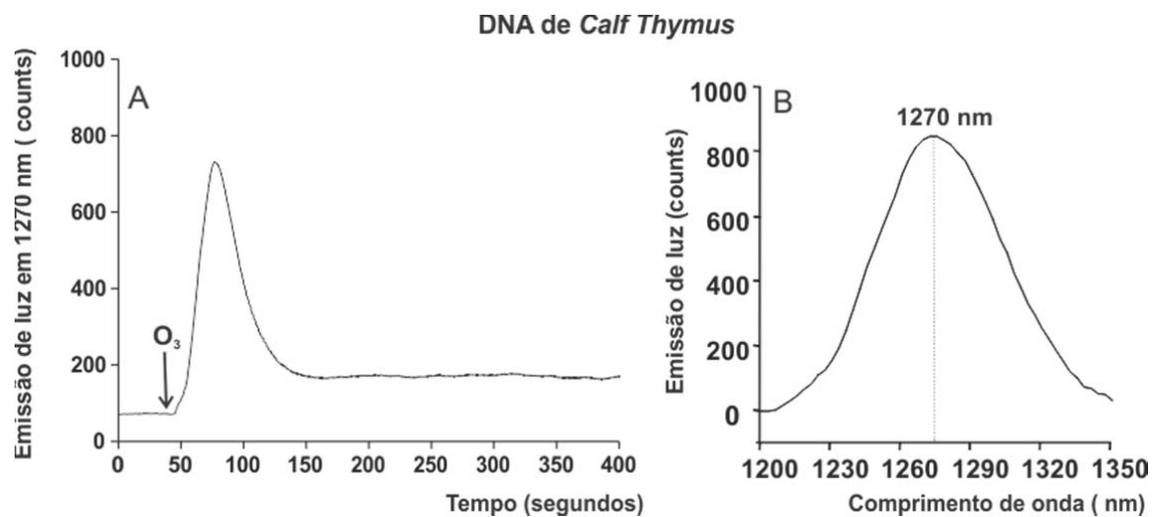


Figura 7.1 – Quimiluminescência obtida da reação do O_3 com DNA de *Calf Thymus*

(A) emissão de luz em 1270 nm e (B) espectro de emissão de luz do $O_2 (^1\Delta_g)$

8. BIBLIOGRAFIA

Abrantes, R.; Assunção, J. V. de & Hirtai, E. Y (2005). Emission of Aldehydes from Light Duty Diesel Vehicles. *Rev. Saúde Pública*, 39, (3), p. 479 – 485.

Adam, W., (1982). Determination of chemiexcitation yields in the thermal generation of electronic excitation from 1,2-dioxetanes, in *Chemical and biological generation of excited states*, Adam, W., Cilento, G., Eds, Academic Press, New York, 115.

Adam, W., Arnold, M.A., GrUne, M., Nau, W.M., Pischel, U., Saha-Möller, R., (2002). Spiroiminodihydantoin is a major product in the photooxidation of 2'-deoxyguanosine by the triplet states and oxyl radicals generated from hydroxycetophenone photolysis and dioxetane thermolysis, *Org. Letters*, 4, 537.

Almeida E.; Assalin M. R.; e Rosa, M. P., (2004). Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quim. Nova*, 27, No. 5, 818-824.

Aubry, J-M., Rigaudy, J., Cuong, N.K., (1981). Kinetic-studies of self-sensitized photo oxygenation in H₂O and D₂O of a water soluble rubrene derivative, *Photochem. Photobiol.*, 33, 155.

Aubry, J-M. and Cazin, B., (1988). Chemical sources of singlet oxygen. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions, *Inorg. Chem.*, 27, 2013.

Aubry, J.-M., Cazin, B., Duprat, F., (1989). Chemical sources of singlet oxygen. 3. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with the hydrogen peroxide-molybdate system, *J. Org. Chem.*, 54, 726.

Aubry, J.M., (1991), New chemical sources of singlet oxygen, In *Membrane Lipid Oxidation*, Vigo-Pelfrey, C., Ed., CRC Press, Boca Raton, vol. 2, 65.

- Aubry, J.M.; Cazin, B.; Rougee, M.; Bensasson, R.V. **(1995)**. Kinetic studies of singlet oxygen [4+2]-cycloadditions with cyclic 1,3-dienes in 28 solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 9159.
- Aubry, J.-M., Pierlot, C., Rigaudy, J., Schmidt, R., **(2003)**. Reversible binding of oxygen to aromatic compounds, *Acc. Chem. Res.*, 36, 668.
- Avzyanova, E. V.; Timerghazin, Q. K.; Khalizov, A. F.; Khursan, S. L.; Spirikhin, L. V.; Shereshovets, V. V. **(1999)** *J. Phys. Org. Chem.* 2000, 13, 87.
- Babior B., **(1994)**. Activation of the Respiratory Burst Oxidase. *Environmental Health Perspectives*. 102, p 53-56.
- Babior B.M, **(1999)**. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93:1464-1476.
- Babior, B. M.; Takeuchi, C.; Ruedi, J.; Gutierrez, A. & Wentworth, P., Jr. **(2003)**. Investigating Antibody-catalyzed Ozone Generation by Human Neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, p. 3031-3034.
- Bader, L.W. e Ogryso, E.A., **(1964)**. Reactions of $O_2 (^1\Delta_g)$ and $O_2 (^1\Sigma_g^+)$, *Discuss Faraday Soc.*, 37, 46.
- Baumbach G.E and U. Vogt, **(1995)**. A tethered balloon measurement system for the determination of the spatial and temporal distribution of air pollutants like O_3 , NO_2 , VOC, particles and meteorological parameters, *EUROTRAC Newsletter* 16,95, pp. 23–29.
- Baumbach G.E. and U. Vong, **(1999)**. Experimental determination of the effect of mountain-valley breeze circulation on air pollution in the Freiburg, *Atmospheric Environment*, 33, pp. 4019–4027.
- Bartlett, P.D. e Landis, M.E., **(1979)**. The 1,2-Dioxetanos, in Singlet Oxygen, Wasserman, H.H. e Murray, R.W., Eds, Academic Press, New York, 244.
-

- Bailey P. S., (1978). Ozonation in Organic Chemistry Vol. 1 (New York; San Francisco; London: Academic Press.
- Beckman, K. B. & Ames, B. N. (1997). Oxidative Decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272, (32), p. 19633 -19636.
- Bonnett, R., (1995). Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, 24, 19.
- Boveris, A., Cadenas, E., Chance, B. (1981). Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Federation Proceedings* 40(2): 195-8.
- Bowen E.J., (1953). Photochemistry of anthracene.I. The photooxidation of anthracene in solution. *Discuss. Faraday Soc.*, p 143.
- Buchko, G.W.; Wagner, J.R.; Cadet, J.; Raoul, S.; Weinfeld, M. (1995) Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1263, 17.
- Bromberg P. A. and H. S. Koren, (1995). Ozone-induced human respiratory dysfunction and disease *Toxicology Letters*, 82-83, December, Pages 307-316.
- Browne, R.J. e Ogryzlo, E.A., (1964). Chemiluminescence from reactions of chlorine with aqueous hydrogen peroxide, *Proc. Chem. Soc. London*, 117.
- Buege, J. A. & Aust, S. D, (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, p. 302-310.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., Vitamin-E application of the principles of physical organic-chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19, 194.
- Brigelius-Flohé, R., (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 951.
-

- Bocci, V. A.; **(2006)**. Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Archives of Medical Research*, 38; 265-267.
- Bocci, V. A.; **(2008)**. Oxidative Stress, the Paradigm of Ozone Toxicity in Plants and Animals. *Water Air Soil Pollut*, 187; 285–301.
- Bocci, V. A.; Borrelli, E., Travagli V. and Zanardi I., **(2009)**. The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews*, 29, 4, 646-682.
- Cadenas, E.; Boveris, A. & Chance, B. **(1980)**. Chemiluminescence of Lipid Vesicles Supplemented with Cytochrome c and Hydroperoxide. *Biochem. J.*, 188, p. 577-583.
- Cadenas, E. & Sies, H., **(1984)**. Low-level Chemiluminescence as an Indicator of Singlet Molecular Oxygen in Biological Systems. *Methods Enzymol.*, 105, p. 221-231.
- Cadenas, E., e Davies, K.J.A., **(2000)**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 222.
- Cadet, J. e Teoule, R., **(1978)**. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals, *Photochem. Photobiol.*, 28, 661.
- Cadet, J. **(1994)**. DNA Adducts: Identification Biological Significance; Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D. E. G., Kadlubar, F. F., Segerback, D., Bartsch, H., Eds.; IARC Scientific Publications: Lyon. 125, 245-276.
- Cadet, J., Berger, M., Buchko, G.W., Joshi, P.C., Raoul, S., Ravanat, J.L., **(1994)**. 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-b-D-erithro-pentofuranosyl)amino] -5-(2H)-oxazolone: A novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-di-O-acetyl-2'-deoxyguanosine, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7403.
-

- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.L-. **(1997)**. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biological significance, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131, 1.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparuto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L., Sauvaigo, S., **(1999)**. Hydroxyl radicals and DNA base damage, *Mut. Res.*, 424, 9.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparuto, D., Ravanat, J.L-., **(2003)**. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features, *Mut. Res.*, 531, 5.
- Cadet, J., Sage, E., Douki, E., **(2005)**. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutat. Res.*, 571, 3.
- Cadet, J. e Di Mascio, P., **(2006)**. Peroxides in biological systems, in the chemistry of peroxides, Rappoport, Z., Ed., Wiley & Sons, Ltd, vol. 2, 915.
- Cadet J, Douki T e Ravanat J.L, **(2010)**. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radical Biology & Medicine* 49, 9–21.
- Cadet, J.; Girault, I.; Molko, D.; **(1993)**. Oxydation de la Thymidine par l'Ozone: Comparaison avec l'Action des Radicaux Hydroxyles. *J. Chim Phys.*, 90, p. 863-870.
- Cadet, J. Girault, I.; Molko, D.; **(1994)**. Ozonolysis of Thymidine: Isolation and Identification of the Main Oxidation Products. *Free Rad. Res.*, 20, (5), p. 315-325.
- Candeias, L.P., Patel, K.B., Stratford, M.R.L., Wardman, P., **(1993)**. Free hydroxyl radicals are formed as reaction between the neutrophyl-derived species superoxide and hypochlorous acid, *FEBS Lett.*, 333, 151.
- Cataldo F., On the action of ozone on proteins. **(2003)**. *Polymer Degradation and Stability*. 82, p.105–114.
-

- Cataldo F., DNA degradation with ozone. **(2006)**. *International Journal of Biological macromolecules*. 38, p. 248–254.
- Cerkovnik, J.; Erzen, E.; Koller, J. & Plesnicar, B. **(2002)**. Evidence for HOOO Radicals in the Formation of Alkyl Hydrotrioxides (ROOOH) and Hydrogen Trioxide (HOOOH) in the Ozonation of C – H Bonds in Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (3), p. 404-409.
- Chamulitrat, W. & Mason, R. P. **(1989)**. Lipid Peroxyl Radical Intermediates in the Peroxidation of Polyunsaturated Fatty Acids by Lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, 264, p. 20968-20973.
- Chance , B. **(1979)**. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Ver.* 59, 527.
- Colin Baird, (2004). *Química Ambiental*. Capítulo 2-4. Segunda edição, Bookman.
- Colussi A. J., Shinichi Enami and Michael R. Hoffmann. **(2009)**. How Phenol and α -Tocopherol React with Ambient Ozone at Gas/Liquid Interfaces. *J. Phys. Chem. A*, 113, 7002–7010.
- Colussi A. J., Shinichi Enami and Michael R. Hoffmann **(2008)**. Ozonolysis of Uric Acid at the Air/Water Interface. *J. Phys. Chem. Letters B*, Vol. 112, No. 14.
- Colussi A. J., Shinichi Enami and Michael R. Hoffmann **(2009)**. Simultaneous Detection of Cysteine Sulfenate, Sulfinatate, and Sulfonate during Cysteine Interfacial Ozonolysis. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 113, No. 28.
- Cilento, G. **(1982)**. Electronic excitation in dark biological processes. In *Chemical and biological generation of excited states* (ed W. Adam and G Cilento), pp 277-307. Academic Press, New York.
- Criegee, R. **(1957)**. The course of ozonation of unsaturated compounds. *Record of Chemical Progress*, 18, 110–120.
-

- Deneke, C.F. e Krinsky, N.I., **(1977)**. Inhibition and enhancement of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) dimol chemiluminescence, *Photochem. Photobiol.*, 25, 299.
- Denny R. W. and Nickon A., **(1973)**. Sensitized photo-oxygenation of olefins. *Organic React.*, 20, 133.
- Diplock, A.T. **(1985)**. Fat-soluble Vitamins. Heineman London.
- Duarte, V., Gasparutto, D., Yamaguchi, L.F., Ravanat, J. L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Cadet, J., **(2000)**. Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediate oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12622.
- Di Mascio, P, e Sies, H., **(1989a)**. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2909.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H., **(1989b)**. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher, *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 532.
- Di Mascio, P., Wefers, H., Do-Thi, H-P., Lafleur, M.V.M., Sies, H., **(1989c)**. Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces singlet-strand breaks, *Bioch. Bioph. Acta*, 1007, 151.
- Di Mascio, P., Menck, C.F.M., Nigro, R.G., Sarasin, A., Sies, H., **(1990)**. Singlet molecular oxygen induced mutagenicity in a mammalian SV40-based shuttle vector, *Photochem. Phtobiol.*, 51, 293.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., **(1991)**. Antioxidant systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols, *Am. J. Clinical Nutrition*, 53, 194S-200S.
-

- Di Mascio, P., Sundquist, A.R., Devasagayan, T.P.A., Sies, H., **(1992a)**. Assay of lycopene and other carotenoids as singlet oxygen quenchers, *Methods Enzymol.*, 213, 429.
- Di Mascio, P., Bechara, E.J.H., Rubim, J.C., **(1992)**. Dioxygen NIR FT-emission ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) and Raman spectra of 1,4-dimethylnaphthalene enoperoxide: a source of singlet molecular oxygen, *Applied Spectroscopy*, 46, 236-239.
- Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., **(1991)**. Antioxidant systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols, *Am. J. Clinical Nutrition*, 53, 194S-200S.
- Dizdaroglu, M.; Jaruga, P.; Birincioglu, M. & Rodriguez, H. **(2002)**. Free Radical-induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biol. Med.*, 32, (11), p. 1102-1115,
- Deneke, C.F. e Krinsky, N.I., **(1977)**. Inhibition and enhancement of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) dimol chemiluminescence, *Photochem. Photobiol.*, 25, 299.
- 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 modifications of LDL, *Free Radic. Biol. Med.*, 13, 341.
- Environmental Protection Agency, EUA. EPA Guidance Manual, **(1999)**. Ozone, Alternative Disinfectants and Oxidants, 3-52 April.
- Fasman, G. D., **(1975)**. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Nucleic acids, CRC Press, Cleveland.
- Flyunt, R.; Theruvathu, J. A.; Leitzke, A. & Sonntag, C. von. The Reactions of Thymine and Thymidine with Ozone. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 1572-1582, 2002.
-

- Foote, C.S. e Denny, Chemistry of singlete ozygen. **(1968b)**, VII Quenching by b-carotene, *J. Am. Chem. Soc.*, (90) 6233-6235.
- Foote, C.S., Peterson, E.R., Lee, K.-W., **(1972)**. Chemistry of singlet oxygen. XVI. Long lifetime of singlet oxygen in carbon disulfide, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1032.
- Foote, C.S e 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. e Clennan, E.L. **(1995)** Properties and reactions of singlet dioxygen, in *In Active Oxygen in Chemistry*, editado por Foote, C.S., Valentine, J.S., Greenberg, A., Liebman, J. F., Blackie Academic & Professional: New York, N.Y., Vol. 2, 105.
- Foote, C.S., **(1968a)**. Chemistry of singlet oxygen. IV. Oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 975.
- Foote, C.S. e Denny, R. W., **(1968b)**, Chemistry of singlet oxygen. VII Quenching by β -carotene, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6233.
- Foote, C.S., **(1968b)**. Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen, *Acc. Chem. Res.*, 1, 104.
- Foote, C.S., **(1979)**, Quenching of singlet oxygen, in *Singlet Oxygen*, editado por Wasserman, H.H. e Murray, R.W., Academic Press, New York, 139.
- Foote, C.S., Chang, Y.C., Denny, R.W., **(1970a)**. Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels protection, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5216.
-

- Foote, C.S., Chang, Y.C., Denny, R.W., **(1970b)**. Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-Trans isomerization of carotenoids by singlet oxygen and the probable quenching mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5218.
- Foote, C.S., Peterson, E.R., Lee, K.-W., **(1972)**. Chemistry of singlet oxygen. XVI. Long lifetime of singlet oxygen in carbon disulfide, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1032.
- Foote, C.S., Shook, F.C., Abakerli, R.A., **(1984)**. Characterization of singlet oxygen, *Methods Enzymol.*, 105, 36.
- Foote, C.S., **(1991)**. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 54,659.
- Foote, C.S.; Clennan, 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, 105.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. **(2005)**. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 1866–1875.
- Firmer A. A, **(1985)**. Singlet O₂ physical-Chemical Aspects, CRC Press, volume 1, Chapter 5 p 177.
- Frank, R., Liu, M. C., Spannhake, E. W., Mlynarek, S., Macri, K., & Weinmann, G. G. **(2001)**. Repetitive ozone exposure of young adults. *American Journal of Respiratory Critical Care and Medicine*, 164, 1253–1260.
- Fridovich, I., **(1995)**. Superoxide radical and SODs. *Ann. Rev. BioChem.* 64, 97.
- Girault, I.; Molko, D.; Cadet, J. **(1997)**. Ozonolysis of 2'-Deoxycytidine: Isolation and Identification of the Main Oxidation Products. *Free Rad. Res.*, 26, p. 257-266.
-

- Girotti, A., **(1998)**. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J. Lipid Res.*, 39, 1529.
- Gorman, A.A. e Rodgers, M.A.J., **(1989)**. Singlet oxygen, in CRC Handbook of organic photochemistry, J.C. Scaiano Ed., Boca Raton, Florida, Vol.II, 229.
- Gordon S. A., Chughtai A. R. and Smith D. M., (2000). Revisiting iodometric estimation as a r e f e r e n c e method for ozone in laboratory gas streams. AMERICAN LABORATORY.
- Gracy, R. W.; Talent, J. M.; Kong, Y. & Conrad, C. C. **(1999)**. Reactive Oxygen Species: The Unavoidable Environmental Insult. *Mut. Res.*, 428, p. 17-22.
- Graziano, M. L., Iesce, M.R., Carli, B., and Scarpati, R. **(1982)**. Photosensitized oxidation of furans. V. An efficient general methods for the synthesis of 2-aryloxy esters, *Synthesis*, 736.
- Graziano, M. L., Iesce, M.R., Carli, B., and Scarpati, R. **(1980)**. Photosensitized oxidation of furans. I. Synthesis and properties of furan endoperoxide, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*.
- Graziano, M. L., Iesce, M.R., Carli, B., and Scarpati, R. **(1981)**. Unusual thermal rearrangement of the endoperoxides of 2-5, dimethylfurans, *J. Chem. Soc.*, 720.
- Gorman, A.A. e Rodgers, M.A.J., **(1989)**. Singlet oxygen, in CRC Handbook of organic photochemistry, J.C. Scaiano Ed., Boca Raton, Florida, Vol.II, 229.
- Guertens, G.; De Boeck, G.; Highley, M.; van Oosterom, A. T. & de Bruijn, E. A. **(2002)**. Oxidative DNA Damage: Biological Significance and Methods of Analysis. *Critical Rev. in Clin. Lab. Sci.*, 39, (4-5), p. 331-457.
- Gollnick, K. e Kuhn, H.J., **(1979)**. Ene-reactions with singlet oxygen, in Singlet Oxygen, Wasserman, H.H. e Murray, R.W., Eds, Academic Press, New York, 287.
-

- Gunten U. von **(2003)**. Ozonation of drinking water. Part I. Oxidation kinetics and product formation, *Water Res.*, in press.
- Gunten U. von **(2003)**. Ozonation of drinking water. Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide and chlorine. *Water Res.*, in press.
- Hall, R. D.; Chamulitrat, W.; Takahashi, N.; Chignell, C. F. & Mason, R. P. **(1989)**. Detection of Singlet Oxygen Phosphorescence During Chloroperoxidase-catalyzed Decomposition of Ethyl Hydroperoxide. *J. Biol. Chem.*, 264, p. 7900-7906.
- Hart, E. J.; Sehested, K. & Holcman, J. **(1983)**. Molar absorptivities of ultraviolet and visible bands of ozone in aqueous solutions. *Anal. Chem.*, 55, p. 46-49.
- Hasset, C.; Mustafa, C. G.; Coulson, W. F. & Elashoff, R. M. **(1985)**. Murine Lung Carcinogenesis Following Exposure to Ambient Ozone Concentrations. *J. Natl. Câncer Inst.*, 75, p. 771-777.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., **(2007)**. *Free radicals in biology and medicine*, 3^a ed., Oxford University press, Inc., New York.
- Hoigné, J.; Staehell, J. **(1985)**. Decomposition of Ozone in Water in the Presence of Organic Solutes Acting as Promoters and Inhibitors of Radical Chain. Reaction *Environ. Sci. Technol.*, 79, 1206-1213.
- Höppe, P., Praml, G., Rabe, G., Linder, J., Fruhmann, G., & Kessel, R. **(1995)**. Environmental ozone field study on pulmonary and subjective responses of assumed risk groups. *Environmental Research*, 71, 109-121.
- Howard, J. A. & Ingold, K. U. **(1968)**. The Self-reaction of Sec-butylperoxy Radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, 90, p. 1056-1058.
-

- Hurst J.R, McDonald, J.D and Schuster G. B., **(1982)**. Lifetime of singlet oxygen in solution directly determined by laser spectroscopy. *J Am. Chem. Soc.*, 104, 2065.
- Ito, K.; Inoue, S.; Hiraku, Y. & Kawanishi, S. **(2005)**. Mechanism of Site-specific DNA Damage Induced by Ozone. *Mut. Res.*, 585, p. 60-70.
- Ingold, K.U., **(1969)**. Peroxy radicals. *Accts. Chem. Res.* 2, 1- 9.
- Jessup, W.; Dean, R. T. & Gebicki, J. M. **(1994)**. Iodometric Determination Of Hydroperoxides in Lipids and Proteins. *Methods Enzymol.*, 233, p. 289-303.
- Jorge, S. A. C.; Menck, C. F. M.; Sies, H.; Osborne, M. R.; Philips, D. H.; Sarasin, A. & Sary, A. **(2002)**. Mutagenic Fingerprint of Ozone in Human Cells. *DNA Repair*, 1 p. 369-378.
- Kochevar, I.E., Redmond, R.W., **(2000)**. Photosensitized production of singlet oxygen, *Methods Enzymol.*, 319, 20.
- Kajiwara, T.; Kearns, D.R., **(1973)**, Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 5886.
- Kanofsky, J. R. & Axelrod, B., **(1986)**. Singlet Oxygen Production by Soybean Lipoxygenase Isozymes. *J. Biol. Chem.*, 261, p. 1099-1104.
- Kanofsky, J. R., **(1989)**. Singlet Oxygen Production by Biological Systems. *Chem. Biol. Interact.*, 70, p. 1-28.
- Kanofsky, J. R. & Sima, P., **(1991)**. Singlet Oxygen Production from the Reactions of Ozone with Biological Molecules. *J. Biol. Chem.*, 266, (14), p. 9039 - 9042.
-

- Kanofsky, J. R.; Sima, P. D. (1993). Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces - a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reaction. *Photochem. Photobiol.*, 58, 335.
- Kanofsky, J.R., (1983), Singlet oxygen production by lactoperoxidase, *J. Biol. Chem.*, 258, 5991.
- Kanofsky, J.R., (1986). Singlet oxygen production from the reaction of alkylperoxy radicals. Evidence from 1268 nm chemiluminescence, *J. Org. Chem.*, 51, 3386.
- Kanofsky, J., (2000). Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone: Methods in Enzymology; Academic Press: New York, 2000; Vol.319; pages 59-67.
- Khan, A.U., Kasha, M., (1963). Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution, *J. Chem. Phys.*, 40, 605,2105.
- Khan, A.U. e Kasha, M., (1970). Chemiluminescence arising from simultaneous transitions in pairs of singlet oxygen molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 3293.
- Khan, A.U. e 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.*, 76, 6047.
- Khan, A.U., (1980). Direct spectroscopic observation of 1.27 μm and 1.58 μm emission of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen in chemically generated and dye-photosensitized liquid solutions at room temperature, *Chem. Phys. Letters*, 72, 112.
- Khan, A.U., (1981). Direct spectral evidences of the generation of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) in the reaction of potassium superoxide with water, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6516.
-

- Khan, A.U., (1985). Singlet molecular oxygen spectroscopy: chemical and photosensitized, In Singlet O₂, Frimer, A.A. Ed., CRC Press, Boca Raton, vol. 1, 39.
- Kahn, A.U., Kasha. M., (1963). Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution, *J. Chem Phys.*, 39, 2105.
- Kahn, A.U., Kasha. M., (1964). Erratum: red quimilunescence of molecular oxygen in aqueous solution, *J. Chem. Phys.*, 40, 605.
- Kang, P.; Foote, C.S. (2002a) Formation of Transient Intermediates in Low-Temperature Photosensitized Oxidation of an 8-¹³C-Guanosine Derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4865.
- Kang, P.; Foote, C.S. (2002b) Photosensitized Oxidation of ¹³C,¹⁵N-Labeled Imidazole Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 124; 9629.
- Kettle A.J., Clark B.M., and Winterbourn C. C., (2004). Superoxide Converts Indigo Carmine to Isatin Sulfonic Acid. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 279,18, pp. 18521–18525.
- 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, (16), p. 6496-6502.
- Kolonko K. J., Shapiro R. H., Barkley R. M. and Sievers R. E. (1979). Ozonation of Caffeine in Aqueous Solution. *J. Org. Chem.*, 44, 22.
- Kopczynski S.L., Bufalini, J. J. (1971). Stoichiometry of iodometric analyses of ozone at pH 7.0. *Anal Chem*; 43, 1126–1127.
- Kowaltowski A J., Souza-Pinto Nadja C., Castilho R F., Vercesi A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine* 47 333–343.
-

- Kochevar, I. E., Redmond, R. W. **(2000)**. Photosensitized production of singlete oxygen. *Methods in Enzymology*. (319) 20-28.
- Krinsky, N. I. **(1974)**. Singlet excited oxygen as a mediator of antibacterial action of leukocytes. *Science*. 186, 363-365.
- Kuimova M. K., Yahioglu G, e. Ogilby P. R., **(2009)**. Singlet Oxygen in a Cell: Spatially Dependent Lifetimes and Quenching Rate Constants J. AM. CHEM. SOC., 131, 332–340.
- Kulikowska, E., Kierdaszuk, B., and Shugar, D., **(2004)**. Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *Acta Biochimica Polonic*. 51; 493-531.
- Lardinois, B. **(1995)**. Reaction of bovine liver catalase with $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 . *Free Radical*. 22, 251.
- Lin T.S., Cheng J.C., Ishiguro K., and Sartorelli A. C., **(1984)**, 8-Substituted Guanosine and 2'-Deoxyguanosine Derivatives as Potential Inducers of the Differentiation of Friend Erythroleukemia Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28, 9.
- Li, M.Y., Cline, C.S., Koker, E.B., Carmichael, H.H., Chignell, C.F., Bilki, P., **(2001)**. Quenching of singlet molecular oxygen (1O_2) by azide anion in solvent mixtures, *Photochem. Photobiol.*, 74, 760.
- Lindahl Tomas, **(1993)**. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 362, 709.
- Lippmann M. and R. B. Schlesinger, **(2000)**. *Annual Review of Public Health—Toxicological bases for the setting of health-related air pollution standards* 21, Nelson Institute of Environmental Medicine, New York University School of Medicine 309–333.
-

- Lee, S. D.; Mustafa, M. D. & Mehlman, M. A. The Biochemical Effects of Ozone and Related Photochemical Oxidants. (1983), In "Advances in Modern Environmental Toxicology". 5, p. 1-671. Princeton Scientific Publishers, Princeton, N. J.
- Lerner, A. D. & Eschenmoser, A. (2003). Ozone in Biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, (6,) p. 3013-3015.
- Manach, C and Donovan, J.L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radicals Res.* 38, 771.
- Martinez, G. R.; Loureiro, A. P. M.; Marques, S. A.; Miyamoto, S.; Yamaguchi, L.; Onuki, J.; Almeida, E. A.; Garcia, C. C. M.; Barbosa, L. F.; Medeiros, M. H. G & Di Mascio, P. (2003). Oxidative and Alkylating Damage in DNA. *Mut. Res.*, 544, p. 115-127.
- Martinez, G. R. ; Gasparutto, D. ; Ravanat, J-. L. ; Cadet, J. ; Medeiros, M. H. G. ; DI Mascio, P. (2005) .Identification of the main oxidation products of 8-methoxy-2'-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*, USA, v. 38, n. 11, p. 1491-1500.
- Martinez, G. R. ; Ravanat, J. L. ; Cadet, J. ; Medeiros, M. H. G. ; Di Mascio, p. (2007). Spiroiminodihydantoin nucleoside formation from 2'-deoxyguanosine oxidation by ¹⁸O-labeled singlet molecular oxygen in aqueous solution. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, p. 1326-1332.
- Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., Di Mascio, P., (2000). Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 10212.
- 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.
-

- Martinez, G. R., **(2003)**. Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), e estudos de lesões em DNA, Tese de doutoramento apresentada ao departamento de bioquímica da Universidade de São Paulo.
- Martinez, G.R., Ravanat, J.L., Cadet, J., Miyamoto, S., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., **(2004)**. Energy transfer between singlet ($^1\Delta_g$) and triplet ($^3\Sigma_g^-$) molecular oxygen in aqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 2056.
- Monroe, B. M, **(1985)**. Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants, In Singlet O_2 , Frimer, A.A., Ed., CRC Press, Boca Raton, vol. 1, 177.
- 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*.
- McCallum J. E. B., Kuniyoshi C. Y., and Foote C. S., **(2004)**. Characterization of 5-Hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanosine in the Photosensitized Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine and Its Rearrangement to Spiroiminodihydantoin. *J. AM. CHEM. SOC.*, 126, 16777-16782.
- McCord, J.M., Fridovich, I., **(1969)**. Superoxido dismutase: an enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.* 244, 6049.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P. **(2003a)**. 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.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Martins, A.P., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., **(2003b)**. 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, 4510.
-

- Miyamoto, S., (2005). Hidroperóxidos de lipídeos como fonte biológica de oxigênio singlete: estudos com marcação isotópica, espectrometria de massa e luminescência. Tese de doutorado defendida pelo departamento de bioquímica da Universidade de São Paulo.
- Miyamoto, S., Martinez, G.R., Rettori, D., Augusto, O., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., (2006). Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid generating peroxy radical intermediates and singlet oxygen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 293.
- Miyamoto S., Ronsein, G. E., Corrêa, T. C., Martinez, G. R, Medeiros, M. H. G. and Di Mascio P., (2009). Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxyxynitrate a decomposition product of peroxyxynitrite, *Dalton Trans.*, 5720–5729.
- Mehlman, M. A. & Borek, C. (1987). Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone. *Environ. Res.*, 42, p. 36-53.
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., (1972a). Remarkable solvent effects on lifetime of $^1\Delta_g$ oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1029.
- Merkel, P.B., Nilsson, R., Kearns, D.R., (1972b). Deuterium effects on singlet oxygen lifetimes in solutions. New test of singlet oxygen reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1030.
- Merkel, P.B., Kearns, D.R., (1972c). Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 7244.
- Misra H. P., Kamuda C. Das, (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 262, 127-133.
- Mudd J.B.; Dawson P.J.; Tseng S.; Liu F.P. (1997). Reaction of Ozone with Protein Tryptophans: Band III, Serum Albumin, and Cytochrome C. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 338, (2), p. 143-149.
-

- Muñoz, F.; Mvula E.; Braslavsky S. E.; and Sonntag C. V. (2001). Singlet dioxygen formation in ozone reactions in aqueous solution. *The Royal society of chemistry*, 2, p. 1109 - 1116.
- Mustafa, M. G.; Elsayed, N. M.; Graham, J. A. & Gardner, D. E. (1983). Effects of Ozone Exposure on Lung Metabolism, Influence on Animal Age, Species, and Exposure Conditions. In "Biomedical Effects of Ozone and Related Photochemical Oxidants", p. 57-73. Princeton Scientific Publishers, Princeton, N. J.
- Navarro, A., Boveris, A. (2009). Brain mitochondrial dysfunction and oxidative damage in Parkinson's disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 41, 517-521.
- Nieva, J. & Wentworth, P., Jr. (2004). The Antibody-catalyzed Water Oxidation Pathway – a New Chemical Arm to Immune Defense. *TRENDS in Biochem. Sci.*, 29, (5), p. 274-278.
- Niles, J.C.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (2001). 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, *Organic Lett.* 3, 963.
- Nishikimi, M. (2003). Recent advances in biochemistry of L-ascorbic acid biosynthesis. *Recent Res. Devel. Biophys Biochem.* 3,18.
- Ogilby, P. R., Foote, C. S. (1981). Chemistry of singlet oxygen. 34. Unexpected solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). *Journal of the American Chemical Society* 103(5): 1219-1221.
- Ogilby, P. R., Foote, C. S. (1983). Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$). *Journal of the American Chemical Society* 105(11): 3423-3430.
-

- Ogilby, P. R., (2010). Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev*, 39, 3181–3209.
- Onuki, J ; Teixeira, P.C. ; Medeiros, MHG ; Di Mascio, P. (2002). Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente.. *Química Nova*, v. 25, p. 594-608.
- Packer, L., Sies, H., Eds., (2000). Singlet Oxygen, UV-A, and Ozone: Methods in Enzymology; Academic Press: New York, 2000; Vol.319.
- Padayatty, S.J. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation os its role in disease prevention. *J Am. Coll. Nutr.* 22.18.
- Palli D, Saieva C, Grechi D, Masala G, Zanna I, Barbaro A, Decarli A, Munnia A, Peluso M. (2003). DNA bulky adducts in a Mediterranean population correlate with environmental ozone concentration, an indicator of photochemical smog. *International Journal of Cancer* . 109 (1), 17 – 23.
- Plesnicar B., (1983). *The Chemistry of Peroxides* (Ed. S Patai) (Chichester: Wiley), 16, p. 483.
- Plesnicar B., (1992). In *Organic Polyoxides* (Ed.W Ando) (New York: Wiley),p. 479.
- Postlethwait, E.; Cueto, R.; Velsor, L. W. & Pryor, W. A. (1998). O₃-induced Formation of Bioactive Lipids: Estimated Surface Concentrations and Lining Layer Effects. *Am. J. Physiol.*, 274 (*Lung Cell. Mol. Pysiol.*, 18), p. 1006-1016.
- Prado, F. M. ; Oliveira, M. C. B. ; Miyamoto, S. ; Martinez, G. R. ; Medeiros, M. H. G. ; Ronsein, G. E. ; Di Mascio, P. (2009). Thymine hydroperoxide as a potential source of singlet molecular oxygen in DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 1, p. 1.
-

- Price C. C., Tumolo A. L, **(1964)**. The course of ozonation of ethers. *J. Am. Chem. Soc.*; 86; 4691-4694.
- Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. & Friedman, M. **(1995)**. A New Mechanism for the Toxicity of Ozone. *Toxicol. Lett.*, 82-83, p. 287-293.
- Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. & Friedman, M. **(1995)**. The Cascade Mechanism to Explain Ozone Toxicity: the Role of Lipid Ozonation Products. *Free Rad. Biol. Med.*, 19, (6), p. 935-941.
- Prat, F., Houk, N., Foote, C.S., **(1997)**. Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in noaqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5051.
- Ouannès, C. e Wilson, T. **(1968)** Quenching of singlet oxygen by tertiary aliphatic amines, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6527.
- Ramos, R. **(2011)**. Ozônio em vários tratamentos pode reduzir custos e uso de remédios. *Correio Braziliense – Caderno Ciência e saúde*. Publicação 29/01/2011.
- Raoul, S.; Cadet, J. **(1996a)** Photosensitized reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: identification of 1-(2-Deoxy-b-erythro-pentofuranosyl) cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 1892.
- Raoul, S., Berger, M., Buchko, G.W., Joshi, P.C., Morin, B., Weinfeld, M., Cadet, J., **(1996b)**. ¹H, ¹³C and ¹⁵N Nuclear magnetic resonance analysis and chemical features of the two main radical oxidation products of 2'-deoxyguanosine: oxazolone and imidazolone nucleosides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 371.
- Ravanat, J.-L., Berger, M., Benard, F., Langlois, R., Ouellet, R., Van Lier, J.E., Cadet, J., **(1992)**. Phthalocyanine and naphthalocyanine photosensitized oxidation of 2'-deoxyguanosine: distinct type I and type II products, *Photochem. Phtobiol.*, 55, 809.
-

- Ravanat, J.-L.; Cadet, J. **(1995)** Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products, *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 379.
- Ravanat, J.-L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., **(2000)**. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA, *J. Biol. Chem.*, 275, 40601.
- Ravanat, J.-L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Cadet, J., **(2001)**. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen, *Helvetica Chimica Acta*, 84, 3702.
- 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.
- Ravanat, J.-L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., Cadet, J., **(2006)**. Singlet oxygen oxidation of 2'-deoxyguanosine. Formation and mechanistic insights, *Tetrahedron*, 62, 10707.
- Ravanat, J.-L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. & Cadet, J. **(2003)**. Mechanistic Aspects of the Oxidation of DNA Constituents Mediated by Singlet Molecular Oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, p. 23-30.
- Robinson, KM. **(2004)**. A novel product of ONOO⁻ mediated oxidation of urate . *Arch. Biochem*, 423, 213.
- Rosal R., Rodríguez A., Perdigón-Melón J.A, Petre A., García-Calvo E., Gómez M. J., Agüera, A., Fernández-Alba A.R, **(2009)**. Degradation of caffeine and identification of the transformation products generated by ozonation. *Chemosphere*. 74, 825–831
- Rosen, H., and Klebanoff, S. J. **(1977)**. Formation of singlet oxygen by myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J. Biol. Chem.* 252, 4803-4810.
-

- Rosen, H., and Klebanoff, S. J. **(1979)**. Bactericidal activity of a superoxide anion-generating system - model for the polymorphonuclear leukocyte. *J. Exp. Med.* 149, 27-39.
- Russell, G. A. **(1957)**. Deuterium-isotope Effectes in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons: Mechanism of the Interaction or Peroxyl Radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, p. 3871-3887.
- Sies, H. e Stahl, W. **(1995)**. Vitamin E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants, *Am. J. Clin. Nutr.*, 62S, 1315S-1321S.
- Simon, M.I. e Van Vunakis, H., **(1962)**. The photodynamic reaction of methylene blue with deoxyribonucleic acid, *J. Mol. Biol.*, 4, 488.
- Simon, M.I. e Van Vunakis, H., **(1964)**. The dye-sensitized photooxidation of purine and pyrimidine derivatives, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105, 197.
- Sharmam, W.M., Allen, C.M., Van Lier, J. E. **(2000)**. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, (319), 376-400.
- Sheu, C. e Foote, C.S., **(1993)**. Endoperoxide formation in a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 10446.
- Sheu, C. e Foote, C.S., **(1995)**. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxuguanosine") formed by photooxidation of a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6439.
- Sary, F. E.; Emge, D. E. & Murray, R. W. **(1976)**. Ozonization of Organic Substrates. Hydrotrioxide Formation and Decomposition to Give Singlet Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, 98, (7), p. 1880-1884.
- Schenck, G.O., **(1949)** Uber die Photosyntheses des Askaridols und verwandter Peroxyde, *Angew. Chem.*, 61, 434.
-

- Schenck, G.O., Neumüller, O.-A., Eisfeld, W., (1958). Δ^5 -Steroid-7 α -hydroperoxide und -7-ketone durch allylumlagerung von Δ^6 -steroid-5 α -hydroperoxiden, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 618, 202.
- 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.
- Stratakis, M. e Orfanopoulos, M., (2000). Regioselectivity in the ene reaction of singlet oxygen with alkenes, *Tetrahedron*, 56, 1595.
- Sonntag C., Muñoz F., (2000). Determination of fast ozone reactions in aqueous solution by competition kinetics. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 661–664.
- Sonntag C. , Leitzke A., Theruvathy J. A, Flyunt R., (2002).The reaction of Thymine and Thymidine with ozone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1572–1582.
- Subke J. A., Toet S., D’Haese D., Crossman Z., Emberson L. D, Barnes J. D., Ashmore M. R., Evershed R P. and Ineson P., (2009). A new method for using ^{18}O to trace ozone deposition. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23; 980–984.
- Sugioka, K. & Nakano, M. A (1976). Possible Mechanism of the Generation of Singlet Molecular Oxygen in NADPH-Dependent Microsomal Lipid Peroxidation. *Biochemical et Biophysical Acta*, 423, p. 203-216.
- Sugiyama H., Kino K., (2005). UVR-induced GC to CG tranversions from oxidative DNA damage, *Mutation Research* 571, 33-42.
- Shugar David, Ewa Kulikowska and Borys Kierdaszuk. 2/ (2004). Xanthine, xanthosine and its nucleotides: solution structures of neutral and ionic forms, and relevance to substrate properties in various enzyme systems and metabolic pathways. *The Journal of the Polish Biochemical*
-

Society and of the Committee of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences. 51, , 493–531.

Schlegel H. Bernhard and Vincenzo Verdolino, Roberto Cammi, Barbara H. Munk. **(2008)**. Calculation of pKa Values of Nucleobases and the Guanine Oxidation Products Guanidinohydantoin and Spiroiminodihydantoin using Density Functional Theory and a Polarizable Continuum Model. *J. Phys. Chem. B.*, 112, 16860–16873.

Terao, J., Minami Y. and Bando N., **(2010)**. Singlet molecular oxygen quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 48, 1.

Toby, S. **(1984)**. Chemiluminescence in the reactions of ozone. *Chem. Rev.*, 84; 277-285.

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.

Uemi, M., Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G. and Di Mascio, P., **(2009)**. Generation of Cholesterol Carboxyaldehyde by the Reaction of Singlet Molecular Oxygen [O₂ (¹Δ_g)] as Well as Ozone with Cholesterol. *Chemical Research in Toxicology*, v. 22, p. 875-884.

Tanaka T, Morino Y. Coriolis, **(1970)**. Interaction and anharmonic potential function of ozone from the microwave spectra in the excited vibrational states. *J Mol Spectrosc*, 33, 538–551.

Theruvathu, J. A.; Flyunt, R.; Aravindakumar, C. T. & Sonntag, C. von. **(2001)**. Rate Constants of Ozone Reactions with DNA, its Constituents and Related Compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, p. 269-274.

Valacchi, G.; Fortino, V. and Bocci, V., **(2005)**. The dual action of ozone on the skin, British Association of Dermatologists - British Journal of Dermatology 153, pp1096–1100.

- Vialas, C., Pratviel, G., Claparols, C., and Meunier, B., **(1998)**. Efficient oxidation to 2'-deosiguanosine by Mn-TMPyP/KHSO₅ to imidazolone dlz without formation of 8-oxodGuoan. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 11548.
- Voet Donald and Voet Judith G., (2006). *Bioquímica*. 3 edição; editor Artmed.
- Wallace, S. S. **(2002)**. Biological Consequences of Free Radical-damaged DNA Bases. *Free Radical Biol. Med.*, 33, (1), p. 1-14.
- Wasserman, H. H.; Larsen, D. L. J., **(1972)**. Formation of 1,4-endoperoxides from the dye-sensitized photo-oxygenation of alkyl-naphthalenes, *Chem. Soc., Chem. Commun*, 253-254.
- Wasserman, H. H.; Yoo, J. U. & Desimone, R. W. **(1995)**. Singlet Oxygen Reactions from the Adducts of Ozone with Heterocyclic Substrates. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, (38), p. 9772-9773.
- Weisiger, R.A., Fridovich, I., **(1973)**. Mitochondrial superoxido dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization, *J. Biol. Chem.* 248, 4793.
- Wentworth, P., Jr.; Jones, L. H.; Wentworth, A. D.; Zhu, X.; Larsen, N. A.; Wilson, I. A.; Xu, X. ; Goddard, W. A., III; Janda, K. D. Eschenmoser, A. & Lerner, R. A. **(2001)**. Antibody Catalysis of the Oxidation of Water. *Science*, 293, p. 1806-1809.
- Wentworth, P.Jr., Nieva, J., Takeuchi, C., Galve, R., Wentworth, A., Dilley, R.B., DeLaria, G.A., Saven, A., Babior, B.M., Janda, K.D., Eschenmoser, A., Lerner, R.A., **(2003)**. Evidence for ozone formation in human arteriosclerotic arterie, 302, 1053.
- Wilson T., Khan A., Mascio Di P., Medeiros, M.H.G., **(1992)**. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 11428-11430.
- Winterbourn, C. C. **(2008)**. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, 4, 278-286
-

Wiseman, H. & Halliwell, B. **(1996)**. Damage to DNA by Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Role in Inflammatory Disease and Progression to Câncer. *Biochem. J.* 313 ; 17-29.

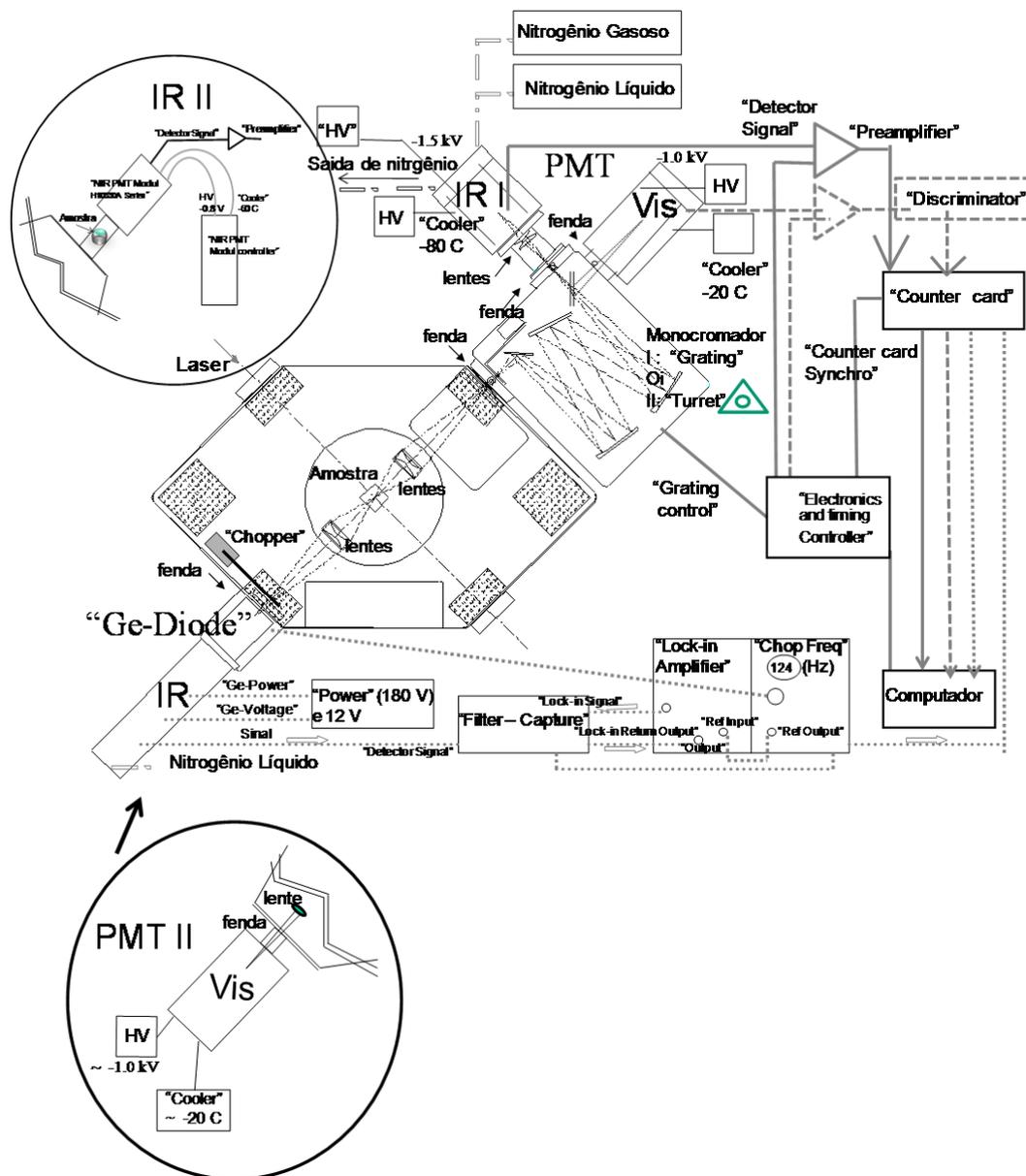
White H. M., Bailey P. S, **(1965)**. Ozonation of aromatic aldehydes. *J. Org. Chem.* 30; 3037-3041.

www.cetesb.sp.gov.br.

<http://ozonewatch.gsfc.nasa.gov/education/index.html>.

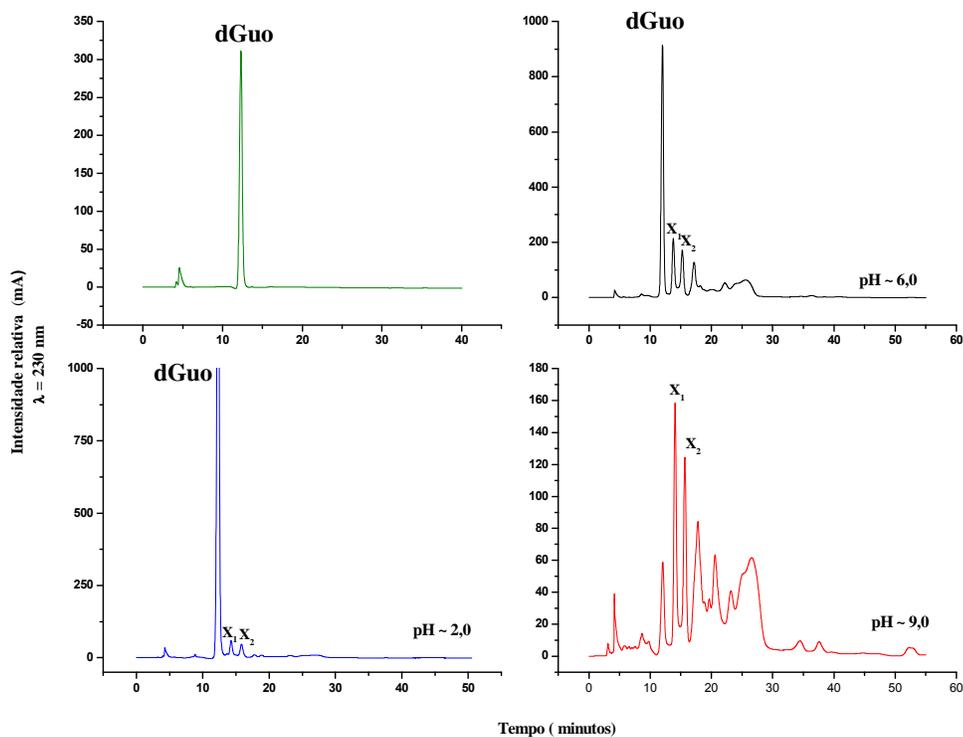
APÊNDICES

Apêndice A - Esquema de dois sistemas de utilizado para detecção de emissão de luz montado no laboratório.



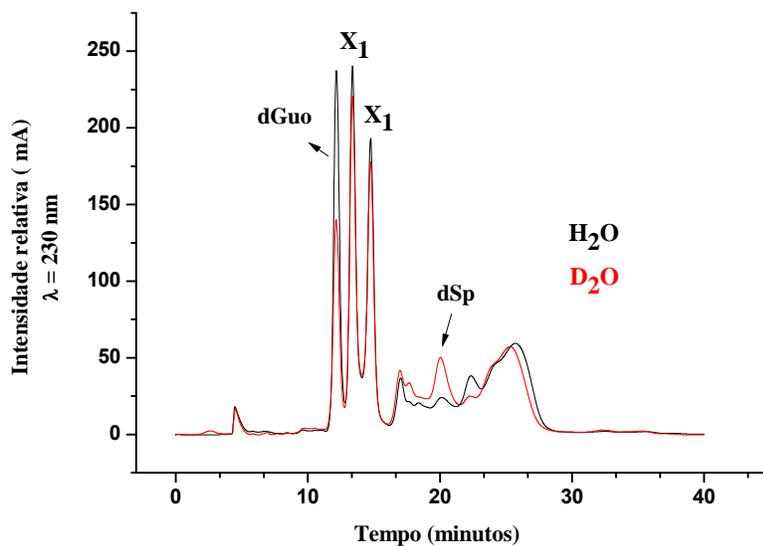
Fotomultiplicadoras sensíveis no infravermelho e na região visível.

Apêndice B - Cromatograma com detecção UV a 230 nm da reação da dGuo com ozônio em diferentes pH's.



Uma solução de dGuo 5mM foi ozonizada durante 5 minutos com fluxo de $6,0 \text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ (100 mg / hora de O_3), O pH foi alterado na solução da dGuo, todas as diluições foram partidas de uma solução estoque de dGuo 10mM. Utilizamos H_2SO_4 e NaOH para atingir os pH's.

Apêndice C - Cromatograma detecção UV a 230 nm da reação da dGuo com ozônio em H₂O e D₂O



Uma solução de dGuo 5mM em D₂O e H₂O foi ozonizada durante 5 minutos, com fluxo de 6,0 mL.s⁻¹ (100 mg / hora de O₃), foi analisada por HPLC coluna LC-NH₂ (250x 4,6 mm, 5µm *phenomenex*) com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, com detector UV programado a 230nm, modo isocrático 85% ACN.

ANEXOS

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Flávia Daniela Motta

São Paulo, 28 de outubro de 1975.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- 2006-2011** Doutorado em Ciências / Bioquímica Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
Orientador: Paolo Di Mascio
Bolsa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- 2002 – 2005** Graduação em Química - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil – 2006.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- 2006** Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil.
Estudante de Doutorado.
Projeto: Geração de ozônio isotopicamente marcado com átomo de oxigênio-18, ($^{18}\text{O}_3$), formando oxigênio-18 molecular singlete, $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), e modificações na 2'-desoxiguanosina.
- 2003 - 2005** Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil.
Iniciação Científica
Projeto – Complexos de isotiocianatos de lantanídeos com o ligante cis/ trans-1,3-ditiano-1,3-dióxido.
-

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Pre - Meeting Workshop. New approaches for examining nitrate and oxidative stresses in biology. (Carga horária: 5 horas). Society for Free Radicals in Biology and Medicine, Orlando, Florida, 2010.

Sunrise Free Radical School (Carga horária: 3 horas), Society for Free Radicals in Biology and Medicine, Orlando, Florida, 2010. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, em Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 2010.

Oxigênio e processos redox. (Carga horária: 6 horas).
Free Radical School. (Carga horária: 5 horas). Society for Free Radicals in Biology and Medicine, Montevideo, Uruguai, 2007.

PRÊMIOS

2011- Scholarship - I São Paulo Advanced School (EPSCA) on Redox Process in Biomedicine – Free Radicals in Brazil 2011.

2007- Travel Award – Free Radicals in Montevideo 2007.

2006 - Diploma de Honra ao Mérito de Melhor Aluno do Curso de Química da Faculdade Oswaldo Cruz de 2002 a 2005, Conselho Regional de Química - IV Região.

PUBLICAÇÕES

Artigos em Revistas Internacionais

Flávia D. Motta, Glaucia R. Martinez, Sayuri Miyamoto, Marisa H. G. Medeiros and Paolo Di Mascio. Isotopically labeled ozone ($^{18}\text{O}_3$) generate ^{18}O -labeled singlet molecular oxygen [$^{18}\text{O}_2$ ($1\Delta_g$)], a model for mechanistic studies: Near-IR emission, ^{18}O -labeled endoperoxides and mass spectrometry. (*em preparação*).

Flávia D. Motta, Glaucia R. Martinez, Alessandra C. Scalfio, Leticia, Leticia F. G. Chorociejus, Sayuri Miyamoto, Marisa H. G. Medeiros and Paolo Di Mascio. 2'-Deoxyguanosine oxidation products induced by ^{18}O -labeled ozone. (*em preparação*).

Marilene S. Oliveira, Divinomar Severino, Fernanda M. Prado, José Pedro F. Angeli, Flávia D. Motta, Maurício S. Baptista, Marisa H. G. Medeiros and Paolo Di Mascio. Singlet molecular oxygen trapping by the fluorescent probe diethyl-3,3'-(9,10-

anthracenediyl)bisacrylate synthesized by the Heck reaction. *Photochemical & Photobiological Science*, 2011, accepted.

Miriam Uemi, Graziella E. Ronsein, Fernanda M. Prado, Flavia D. Motta, Sayuri Miyamoto, Marisa H. G. Medeiros and Paolo Di Mascio. Cholesterol hydroperoxides generate singlet molecular oxygen [$O_2 (^1\Delta_g)$]: Near-IR emission, ^{18}O -labeled hydroperoxides and mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, accepted.

Miyamoto, S. ; Ronsein, G.E. ; Prado, F.M. ; Uemi, M. ; Correa, T.C. ; Toma, I. N. ; Bertolucci, A. ; Oliveira, M.C.B. ; Motta, F.D. ; Medeiros, M.H.G. ; Di Mascio, P. . Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* (London), v. 59, p. 322-331, 2007.

Capítulos de livros

Eduardo Alves de Almeida, Danilo Grunig Humberto Silva, Afonso Celso Dias Bainy, Florêncio Porto Freitas, Flávia Daniela Motta, Osmar Francisco Gomes, Marisa Helena Gennari de Medeiros and Paolo Di Mascio. Evaluation of glutathione status in aquatic organisms. *In press*. *Oxidative Stress in Marine Ecosystems*. Willey-Blackwell. UK. ISBN: 9781444335484.

José Pedro Friedmann Angeli, Glaucia Regina Martinez, Flávia Daniela Motta, Eduardo Alves de Almeida, Marisa Helena Gennari de Medeiros and Paolo Di Mascio. Evaluation of oxidative DNA damage in aquatic animals: comet assays and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) levels. *In press*. *Oxidative Stress in Marine Ecosystems*. Willey-Blackwell. UK. ISBN: 9781444335484.

RESUMOS EM CONGRESSOS

Motta, F.D., Miyamoto, S.; Scalfio, AC; Martinez, G.R.; Medeiros, M. H. G. and Di Mascio, P. Isotopically labeled ozone ($^{18}O_3$) generate ^{18}O -labeled singlet molecular oxygen [$^{18}O_2 (^1\Delta_g)$], a model for mechanistic studies: Near-IR emission, ^{18}O -labeled endoperoxides and mass spectrometry. VII Meeting of South American Group of the SFRBM will be held on August 17 – 21, 2011.

Motta, F.D., Miyamoto, S.; Scalfio, AC; Martinez, G.R.; Medeiros, M. H. G. and Di Mascio, P. Singlet Molecular Oxygen Generation by the Reaction of Ozone with 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine and Formation of Spiroiminodihydantoin Nucleoside. Conference Information: 17th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-Medicine /15th Biennial Meeting of the Society-for-Free-Radical-Research-International, Date: NOV 17-21, 2010 Orlando FL. Source: FREE

RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE Volume: 49 Pages: S213-S213 Published: 2010.

Di Mascio, P. ; Ronsein, G.E. ; Prado, F.M. ; Angeli, J.P.F. ; Motta, F.D. ; Oliveira, M.S. ; Scalfio, A.C. ; Valente, K.S. ; Sena, F ; Miyamoto, S. ; Medeiros, M.H.G., ¹⁸O-labeled hydroperoxides (R¹⁸OOH) and mass spectrometry as valuable tools for studying the role of ROOH and singlet molecular oxygen in biological system. In: EUCHEM Conference on Organic Free Radicals, 2010, bologna. p. 56-57.

Di Mascio, P. ; Ronsein, G.E. ; Prado, F.M. ; Oliveira, M.S. ; Angeli, J.P.F. ; Motta, F.D. ; Scalfio, A.C. ; Sena, F ; Valente, K.S. ; Toma, I. N. ; Bertolucci, A. ; Miyamoto, S. ; Medeiros, M.H.G. ¹⁸O-labeled ¹O₂, mass spectrometry and chemiluminescence as valuable tools for studying the role of ¹O₂ in biological system. In: XXIII IUPAC symposium on Photochemistry, 2010, Ferrara. Abstracts of XXIII IUPAC symposium on Photochemistry, 2010. p. P61-P61.

Motta, F.D., Miyamoto, S.; Martinez, G.R.; Medeiros, M. H. G. and Di Mascio, P. CHEMILUMINESCENCE ORIGINATED BY SINGLET MOLECULAR OXYGEN GENERATION FROM THE OZONE REACTIONS WITH DNA BASES. In: XXIII IUPAC symposium on Photochemistry, 2010, Ferrara. Abstracts of XXIII IUPAC symposium on Photochemistry, 2010.

Motta, F.D.; Miyamoto, S.; Martinez G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P., Singlet Molecular Oxygen Production by the Reactions of Ozone with DNA Components. XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, de 18 a 21 de maio de 2010 em Foz do Iguaçu, PR.

Scalfio, A. C.; Motta, F. D. ; Correa, T. C. ; Miyamoto, S. ; Medeiros, M. H. G. ; Mascio, P. Singlet Molecular Oxygen Generated From Lipid Hydroperoxyde Reaction With Nitronium Tetrafluoroborate And Ozone. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2010, Foz do Iguaçu. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2010.

Motta, F.D.; Miyamoto,S.; Martinez G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio ,P.; Singlet Molecular Oxygen Generated by the reactions of Ozone with 2'-Deoxyguanosine and Polyamine,. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, que se realizará no período de 16 a 19 de maio de 2009 em Águas de Lindóia, SP.

Motta, F.D.; Miyamoto, S.; Martinez G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio,P.; Singlet Molecular Oxygen formation and detection of oxidation products from ozone reactions with 2'-Deoxyguanosine. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira

de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, que se realizará no período de 17 a 20 de maio de 2008 em Águas de Lindóia, SP.

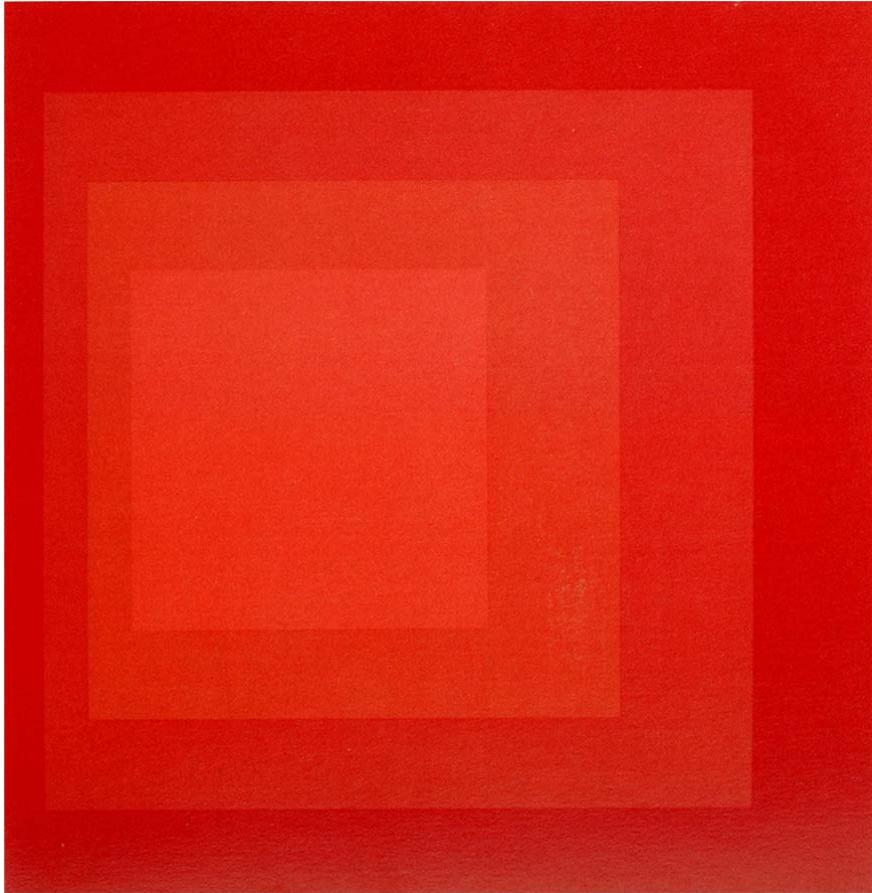
Motta, F.D.; Miyamoto, S.; Martinez G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P.; Ozone Reacts With 2'-Deoxyguanosine and Polyamines Generating Singlet Molecular Oxygen. Conference Information: 15th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-and-Medicine, Date: NOV 19-23, 2008 Indianapolis IN Source: FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE Volume: 45 Pages: S20-S21 Published: 2008.

Motta, F.D.; Miyamoto, S.; Martinez G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P. Ozone induces singlet oxygen production in the presence of purine DNA bases. Free Radicals in Montivideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group and V Internacional Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. In September 2-6, 2007, Montevideo, Uruguay.

Motta, F. D. ; Miranda JR, P. ; Zinner, L. B. ; Aricó, Eliana M ; Martins, Tereza S ; Linardi, M. ; Isolani, Paulo, C . Investigação indireta da isoestruturalidade em complexos de isotiocianatos de Eu(III) e Tb(III) com os ligantes cis e trans-DTSO₂. In: Química para o Desenvolvimento Sustentável e Inclusão Social - Sociedade Brasileira de Química, 2005. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

Motta, F. D. ; Miranda JR, P. ; Zinner, L. B. ; Martins, Tereza S ; Isolani, Paulo, C. XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry - II Joint Brazilian/Italian Meeting on Inorganic Chemistry. In: XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry - II Joint Brazilian/Italian Meeting on Inorganic Chemistry, 2005. XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry - II Joint Brazilian/Italian Meeting on Inorganic Chemistry, 2005.

Motta, F. D. ; Miranda JR, P. ; Zinner, L. B. ; Martins, Tereza S ; Isolani, Paulo, C. Complexos de isotiocianatos de lantanídeos com o ligante trans-1,3-ditiano-1,3-dióxido. In: XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 2004, Salvador - BA - Brasil. XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ, 2004.



Josef Albers, Widmung an das Quadrat: Rot, 1967.