UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GRAZIELLA ELIZA RONSEIN

**Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no
estado singlete [$O_2 (^1\Delta_g)$]: estudos mecanísticos
envolvendo marcação isotópica, espectrometria de
massa e quimiluminescência**

São Paulo

**Data do Depósito na SPG:
31/03/2008**

GRAZIELLA ELIZA RONSEIN

**Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no
estado singlete [O₂ (¹Δ_g)]: estudos mecanísticos
envolvendo marcação isotópica, espectrometria de
massa e quimiluminescência**

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
2008

Graziella Eliza Ronsein

Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no estado singlete $[O_2(^1\Delta_g)]$: estudos mecanísticos envolvendo marcação isotópica, espectrometria de massa e quimiluminescência

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, pelo exemplo
de integridade, perseverança e trabalho.
Pelo apoio incondicional e dedicação constante.

Ao Mau, pelas discussões científicas, incentivo, apoio,
experimentos até tarde da noite e nos fins de semana,
pelas corridas, mergulhos, viagens e trilhas.

Por me fazer mais feliz.

AGRADECIMENTOS

- À vida, pelas oportunidades constantes de crescimento e aprendizado.
- Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pela oportunidade oferecida, respeito, confiança depositada, paciência, pelas brincadeiras e pela amizade.
- À Profa. Dra. Sayurinha, o lírio que não sabe dizer não.
- À Profa. Dra. Marisa pelas críticas construtivas e apoio.
- Aos Professores Dr. Josef Wilhelm Baader e Dr. Luiz Henrique Catalani por me aceitarem em suas disciplinas, as quais foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Etelvino Bechara pelo exemplo de competência profissional.
- Aos colegas de laboratórios Agda, Izaura, Ivone, Thaís, Lys, Kerolyn, Flávia, Zé, Fernandão (o monstro da Bioquímica), Miriam, Janice, Lydia, Patrícia, Tatiana, Camila, Lívea, Osmar, Rafael e Ale pela convivência e pelos momentos agradáveis de descontração.
- À Fê, pela competência como técnica do espectrômetro de massa e pela grande amizade.
- À Fefê, pela amizade e companheirismo nesta paulicéia desvairada.
- Aos meus irmãos, Juanna e Giovanni pelo apoio, carinho, cumplicidade e amizade.

APOIO FINANCEIRO

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

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CNPq - Instituto do Milênio - Redoxoma.

Agradecimento especial à FAPESP pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

" De tudo ficam três coisas:
a certeza de que estou apenas começando,
a certeza de que é preciso continuar e
a certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo uma escola,
do sonho uma ponte e
da procura um encontro.

E assim...terá valido a
pena existir"

Fernando Sabino

RESUMO

Ronsein, G.E. **Oxidação do triptofano pelo oxigênio molecular no estado singlete [$O_2 (^1\Delta_g)$]: estudos mecanísticos envolvendo marcação isotópica, espectrometria de massa e quimiluminescência.** 2008. 141p. Tese – Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As proteínas são consideradas importantes alvos para os oxidantes, devido à abundância em sistemas biológicos e às altas constantes de reações com estas espécies. Adicionalmente, têm-se demonstrado que o triptofano (W) é um aminoácido extremamente susceptível a oxidação, inclusive pelo oxigênio singlete (1O_2). A reação do W com o 1O_2 tem despertado o interesse de diversos pesquisadores. Recentemente, esta reação tem atraído mais atenção, uma vez que produtos de oxidação do W tais como *N*-formilquinurenina (FMK) e quinurenina (kn) têm sido associados com algumas condições patológicas, tais como o desenvolvimento de catarata e a formação de agregados covalentes da superóxido dismutase envolvidos na esclerose lateral amiotrófica. Entretanto, há poucos trabalhos enfocando detalhadamente as reações, com estudos de estabilidade, identificação de subprodutos e propostas mecanísticas. Desta forma, pretendemos com este trabalho contribuir no esclarecimento do mecanismo de oxidação do triptofano pelo 1O_2 , através da análise e caracterização de produtos de oxidação gerados. Com este intuito, dois hidroperóxidos de triptofano isômeros (WOOH *cis* e *trans*, em relação ao grupamento carboxila) foram completamente caracterizados por análises de HPLC/espectrometria de massa e RMN como os principais produtos de oxidação do W pelo 1O_2 . Estes hidroperóxidos demonstraram ser relativamente estáveis às temperaturas ambiente e fisiológica, decompondo lentamente para os alcoóis correspondentes. O aumento do pH e/ou o aquecimento das soluções contendo os WOOH leva a decomposição quimiluminescente dos WOOH à FMK. Utilizando hidroperóxidos isotopicamente marcados com [^{18}O] (W $^{18}O^{18}OH$) foi possível confirmar que a FMK formada durante esta decomposição era marcada com dois átomos de oxigênio. Este resultado demonstra que os dois átomos da FMK são derivados do grupamento hidroperóxido. Em adição, estas reações são quimiluminescentes, sugerindo o envolvimento de um intermediário dioxetano. Este mecanismo foi confirmado uma vez que o espectro de quimiluminescência da decomposição dos WOOH pode ser sobreposto ao espectro de fluorescência da FMK, inequivocamente identificado a FMK como a espécie emissora. Dioxindoilalaninas diastereoisoméricas também foram caracterizadas como produtos de oxidação do triptofano pelo 1O_2 ; uma possível via radicalar foi excluída. Em suma, este estudo contribuiu na elucidação das bases químicas envolvidas na oxidação do triptofano por 1O_2 , através da caracterização dos produtos formados e da investigação detalhada dos mecanismos de decomposição destes produtos.

Palavras-chave: Oxigênio singlete, oxidação do triptofano, marcação isotópica, espectrometria de massa, quimiluminescência.

ABSTRACT

Ronsein, G.E. **Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$]: Mechanistic studies using isotopic labelling, mass spectrometry analysis and chemiluminescence.** 2008. 141p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Proteins have been considered important targets for reactive oxygen species. Indeed, tryptophan (W) has been shown to be a highly susceptible amino acid to many oxidizing agents, including singlet molecular oxygen (1O_2). The reaction of 1O_2 with W has long been a matter of concern, and has recently attracted considerably more attention because W-derived oxidation products such as *N*-formylkynurenine (FMK) and kynurenine (kn) have been associated with some pathological conditions such as the development of cataracts and the formation of covalent aggregates of superoxide dismutase, which has been implicated in amyotrophic lateral sclerosis. Despite the intense interest in the mechanism of W oxidation, there are a lot of gaps that remains to be elucidated. In this context, the current study was undertaken to investigate the chemical basis involved in W oxidation by 1O_2 . We are concerned about the chemistry of the initially formed hydroperoxides, their stability, further reactions and the mechanism leading to FMK conversion. With this purpose, two *cis* and *trans* tryptophan hydroperoxide (WOOH) isomers were completely characterized by HPLC/mass spectrometry and NMR analyses as the major W-oxidation photoproducts. Also, they were shown to be relatively stable at ambient and physiological temperatures, leading to a slow decomposition to the corresponding alcohols. Increasing the pH or heating the solutions gives rise to a luminescent decomposition of the WOOH to FMK. Using ^{18}O -labeled hydroperoxides ($W^{18}O^{18}OH$), it was possible to confirm the formation of a two-oxygen-labeled FMK molecule derived from $W^{18}O^{18}OH$ decomposition. This result shows that both oxygen atoms in FMK are derived from the hydroperoxide group. In addition, these reactions are chemiluminescent (CL), indicating a dioxetane cleavage pathway. This mechanism was confirmed since the CL spectrum of the WOOH decomposition matched the FMK fluorescence spectrum, unequivocally identifying FMK as the emitting species. Diastereoisomeric dioxindoyalanine were also characterized as oxidation products derived from the reaction of W with 1O_2 . The involvement of radicals in this reaction was excluded. In summary, this work offers further insights into the chemistry involved in W-oxidation, through the characterization of photoproducts and the detailed investigation about the decomposition mechanism of these products.

Keywords: Singlet oxygen, tryptophan oxidation, isotopic labelling, mass spectrometry, chemiluminescence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\Delta_g$	primeiro estado excitado do oxigênio molecular (delta)
$^1\Sigma_g^+$	segundo estado excitado do oxigênio molecular (sigma)
^{18}O	isótopo 18 do átomo de oxigênio
$^3\Sigma_g^-$	estado triplete do oxigênio molecular (sigma)
5 α -OOH	3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ene-5-hidroperóxido
6 α -OOH	3 β -hidroxicolestano-4-ene-6 α -hidroperóxido
6 β -OOH	3 β -hidroxicolestano-4-ene-6 β -hidroperóxido
7 β -OOH	3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 β -hidroperóxido
7 α -OOH	3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 α -hidroperóxido
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
CI	conversão interna
CIEEL	luminescência induzida quimicamente pela troca de elétron (<i>chemically initiated electron exchange luminescence</i>)
CIS	cruzamento intersistemas
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
D ₂ O	água deuterada
DBA	9,10-dibromoantraceno
DHPN	<i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
DHPNO ₂	endoperóxido do <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida
DiOia	dioxindoilalanina - (R,S e R,R α -amino-2,3-dihidro-3-hidroxi-2-oxo-1H-indol 3-ácido propanóico
DMN	1,4-dimetilnaftaleno
DMNO ₂	endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno

DMSO	dimetilsulfóxido
dOxa	ácido oxalúrico
dOz	2,2-diamino-4[-(2-desoxi-β-eritro-pentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona
DPA	9,10-difenilantraceno
DPAO ₂	endoperoxído do 9,10-difenilantraceno
dSp	espiroiminodihidantoínas
EAS	9,10-dietilantraceno disulfonato
EASO ₂	endoperoxído do 9,10-dietilantraceno disulfonato
ESI+	electrospray positivo
F ₀	fotossensibilizador no estado fundamental
F ₁ *	fotossensibilizador no estado singlete excitado
F ₃ *	fotossensibilizador no estado triplete excitado
FMK	<i>N</i> -formilquinurenina
HETCORR	<i>Heteronuclear Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HOHICA	3α-hidroxi-6-oxo-2,3,3α,6,7,7α-hexahidro-1H-indol-2-ácido carboxílico
HOMO	orbital molecular ocupado mais alto (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
k	constante de velocidade
kn	quinurenina
LUMO	orbital desocupado mais baixo (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MRM	modo de monitoramento de reações múltiplas (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	espectrometria de massa
NDP	3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

NDPO ₂	endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio
RMN	ressonância magnética nuclear
RO•	radical alcóxila
ROO•	radical peróxila
ROOH	peróxido orgânico
RV	relaxação vibracional
S	número quântico total de spin
S ₀	estado fundamental singlete
S ₁	estado excitado singlete
T ₁	estado triplete excitado
U.A.	unidades arbitrárias
V ₀	velocidade inicial
W	triptofano
WOH	2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol
WOOH	hidroperóxido de triptofano - 2-carboxi-3a-hidroperoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol
Δ	ativação térmica
ε	coeficiente de absortividade molar
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Oxigênio	19
1.2 Oxigênio singlete.....	20
1.2.1 Estratégias para a identificação e detecção do $^1\text{O}_2$	21
1.2.2 Fontes de $^1\text{O}_2$	24
1.2.3 Alvos biológicos do $^1\text{O}_2$	28
1.2.3.1 Reações do $^1\text{O}_2$ com o DNA.....	29
1.2.3.2 Reações do $^1\text{O}_2$ com lipídeos	31
1.2.3.2.1 Oxidação dos ácidos linoléico e araquidônico	31
1.2.3.2.2 Oxidação do colesterol	31
1.2.3.3 Aminoácidos e peptídeos como alvos para o $^1\text{O}_2$	33
1.2.3.3.1 Reação com resíduos de tirosina	33
1.2.3.3.2 Reação com resíduos de histidina.....	34
1.2.3.3.3 Reação com resíduos de metionina	35
1.2.3.3.4 Reação com resíduos de cisteína	36
1.2.3.3.5 Reação com resíduos de triptofano.....	37
1.3 Estudos envolvendo o mecanismo de decomposição do triptofano oxidado à FMK.....	37
1.4 Estados excitados, dioxetanos e reações quimiluminescentes.....	39
1.4.1 Estados excitados.....	39
1.4.2 Decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos.....	40
1.4.3 Classificação das reações quimiluminescentes	41
1.4.4 Decomposição catalisada de peróxidos	42
1.4.4.1 Catálise Intermolecular.....	42
1.4.4.2 Catálise Intramolecular.....	43
1.5 Propagação do dano e consequências biológicas da oxidação de resíduos de aminoácidos em proteínas.....	43
1.5.1 Modificações oxidativas em proteínas: um enfoque em resíduos de triptofano.....	45
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 Objetivo geral	47
2.2 Metas	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48

3.1 Materiais	48
3.2 Equipamentos	49
3.3 Síntese dos foto-produtos do triptofano (W)	49
3.4 Síntese dos foto-produtos do W marcados com $^{18}\text{O}_2$	50
3.5 Quantificação dos hidroperóxidos (WOOH) gerados na foto-oxidação do W.....	50
3.6 Análise da formação dos foto-produtos do W por HPLC	50
3.7 Análise dos foto-produtos do W por HPLC/MS/MS	51
3.8 Análise dos foto-produtos do W por RMN	51
3.9 Purificação dos foto-produtos do W por HPLC	51
3.10 Avaliação da decomposição dos WOOH por um agente redutor.....	52
3.11 Avaliação da estabilidade térmica dos WOOH	52
3.12 Avaliação da decomposição dos WOOH por metais	52
3.13 Avaliação da estabilidade dos WOOH em diferentes pHs.....	52
3.14 Experimentos de espectrometria de massa e marcação isotópica para caracterizar a FMK suas fragmentações.....	53
3.15 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à <i>N</i> -formilquinurena (FMK)....	54
3.15.1 Estudos envolvendo marcação isotópica da FMK.....	54
3.15.1.1 Análise da decomposição dos $\text{W}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ para FMK por HPLC/MS/MS	54
3.15.1.2 Estudos das trocas envolvendo a FMK e a água	54
3.15.1.3 Análise da decomposição dos $\text{W}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ para FMK em etanol seco.....	54
3.15.2 Estudos envolvendo quimiluminescência obtida pela decomposição dos WOOH.....	55
3.15.2.1 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH por adição de base	55
3.15.2.2 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH por aquecimento.....	55
3.15.2.3 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição de cada WOOH isolado e em solvente orgânico	56
3.15.2.4 Determinação da velocidade inicial de conversão de cada WOOH à FMK.....	56
3.15.2.5 Determinação da natureza da espécie excitada.....	56
3.15.2.6 Determinação dos espectros de emissão de luminescência para a decomposição de cada WOOH isolado.....	57
3.16 Medidas do espectro de fluorescência da FMK.....	58

3.17 Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$	58
3.17.1 Elucidação estrutural dos fotoprodutos	58
3.17.2 Investigação da origem dos novos fotoprodutos	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Análise da formação dos fotoprodutos do triptofano (W).....	59
4.2 Redução dos foto-produtos formados.....	60
4.3 Caracterização por marcação isotópica e HPLC/MS/MS dos foto-produtos formados	61
4.3.1 Análise da fragmentação dos WOOH por HPLC/MS/MS utilizando $^{18}\text{O}_2$	61
4.3.2 Análise da fragmentação dos WOH por HPLC/MS utilizando $^{18}\text{O}_2$	62
4.4 Caracterização dos foto-produtos por RMN.....	63
4.4.1 Análise dos WOH por RMN (^1H ; COSY e HMBC)	63
4.4.2 Análise dos WOOH por RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR).....	64
4.5 Avaliação da estabilidade dos WOOH	66
4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica dos WOOH	66
4.5.2 Avaliação da decomposição dos WOOH por metais.....	67
4.5.3 Avaliação da estabilidade dos WOOH em diferentes pHs.....	69
4.6 Espectrometria de massa e marcação isotópica como ferramentas para caracterizar a FMK e suas fragmentações	71
4.7 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK.....	76
4.7.1 Experimentos envolvendo marcação isotópica da FMK	76
4.7.2 Estudos envolvendo quimiluminescência dos WOOH.....	81
4.7.2.1 Determinação da velocidade inicial de conversão de cada WOOH à FMK.....	83
4.7.2.2 Determinação da natureza da espécie excitada.....	86
4.7.3 Comparação entre a fluorescência da FMK e o espectro de quimiluminescência gerado na decomposição dos WOOH	87
4.8. Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$	88
4.8.1 Análise por HPLC/MS/MS e marcação isotópica	88
4.8.2 Análise dos novos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$ por RMN.....	91
4.8.3 Investigação da origem dos novos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$	92
5 DISCUSSÃO	95

5.1 Caracterização dos produtos de oxidação do W por HPLC/MS/MS utilizando produtos com [^{18}O] incorporado e por RMN.....	95
5.2 Avaliação da estabilidade térmica, em diferentes pHs e da decomposição por metais dos WOOH.....	96
5.3 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK.....	97
5.3.1 Experimentos envolvendo marcação isotópica da FMK.....	97
5.3.2 Estudos envolvendo a decomposição quimiluminescente dos WOOH.....	99
5.4 Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$	104
6 CONCLUSÕES	109
7 PERSPECTIVAS	110
8 REFERÊNCIAS	111
Apêndices	123
Apêndice A - Espectros de RMN (^1H ; COSY; HMBC) do WOH <i>trans</i>	123
Apêndice B - Espectros de RMN (^1H ; COSY; HMBC) do WOH <i>cis</i>	126
Apêndice C - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR) do WOOH <i>trans</i>	129
Apêndice D - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR) do WOOH <i>cis</i>	133
Apêndice E - Espectro de RMN (^1H) da FMK.....	137
Apêndice F - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; HSQC) da R,S DiOia	138
Apêndice G - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; HSQC) da R,R DiOia	140

1 INTRODUÇÃO

1.1 Oxigênio

O elemento oxigênio é uma molécula diatômica que constitui 21 % da atmosfera atual. Em 1929, Giauque e Johnston descobriram que o oxigênio consiste em três isótopos de pesos atômicos 16, 17 e 18 (Giauque e Johnston, 1929). Em 1952, Dole considerava que a demonstração da existência dos diferentes isótopos, a invenção de métodos que possibilitassem medir suas massa e abundâncias, e a descoberta dos métodos de separação dos isótopos constituíam um dos maiores campos da descoberta científica da primeira metade do século vinte (Dole, 1952). Além disso, este mesmo autor já demonstrava aplicações desta descoberta, tais como o uso dos isótopos de oxigênio no estudo dos mecanismos de reações orgânicas e inorgânicas, e estudo das trocas dos isótopos de oxigênio entre compostos orgânicos e a água. Os isótopos de oxigênio com suas abundâncias relativas e pesos atômicos estão resumidos na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Isótopos do oxigênio molecular

Isótopo	Porcentagem no ar	Peso atômico
^{16}O	99,7587	15,99555
^{17}O	0,0374	16,99977
^{18}O	0,2039	17,99980

Exceto para algumas espécies anaeróbicas e aero tolerantes, todos os organismos precisam do O_2 para uma produção eficiente de energia. Entretanto, esta necessidade de oxigênio mascara o fato que esta molécula é um gás tóxico, mutagênico e inflamável, sendo que os aeróbios sobrevivem nesta atmosfera apenas porque desenvolveram defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007).

1.2 Oxigênio singlete

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado tripleto ($^3\Sigma_g^-$). Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete, pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante do que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singlete do oxigênio: (i) o primeiro estado excitado, $^1\Delta_g$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 10^{-6} s; (ii) o segundo estado excitado, $^1\Sigma_g^+$, tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado $^1\Sigma_g^+$ tem um tempo de vida muito curto (10^{-11} s) em meio aquoso, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$ (Kasha, 1985; Monroe, 1985). Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos e será denotado por 1O_2 (Tabela 1.2).

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

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

1.2.1 Estratégias para a identificação e detecção do $^1\text{O}_2$

Talvez as formas mais simples de se avaliar o envolvimento do $^1\text{O}_2$ em uma determinada reação sejam o uso de supressores físicos e/ou a substituição do solvente pelo equivalente deuterado. Os supressores físicos podem atuar por dois mecanismos: transferência de energia ou de carga. O mecanismo de transferência de energia foi primeiramente sugerido para a supressão do $^1\text{O}_2$ pelo β -caroteno (Foote e Denny, 1968). Este mecanismo envolve a formação do supressor no estado triplete e oxigênio no estado fundamental. Para ser eficiente, necessita que o estado triplete do supressor esteja bem próximo ou abaixo da energia do $^1\text{O}_2$ (22,5 Kcal/mol) (Foote *et al.*, 1970a, 1970b). O mecanismo por transferência de carga envolve a interação do $^1\text{O}_2$ (pobre em elétrons) com espécies doadoras de elétrons, para formar um complexo de transferência de carga (ou em alguns casos, uma transferência completa de elétrons). Compostos que provavelmente suprimem ou reagem por este mecanismo incluem azida, aminas e fenóis (Foote, 1979).

Outra estratégia muito comumente utilizada é o uso de solventes deuterados, uma vez que estes aumentam o tempo de vida do $^1\text{O}_2$. Mekel e Kearns sugeriram que as vibrações das ligações C-H e O-H são importantes na relaxação do $^1\text{O}_2$ (Merkel e Kearns, 1972a, 1972b). Dessa forma explicaram o efeito dos solventes deuterados no tempo de vida do $^1\text{O}_2$. Estes autores sugerem que a constante de velocidade para a transferência de energia do $^1\text{O}_2$ é diretamente correlacionada com a densidade ótica do solvente em regiões que correspondem às transições do oxigênio (por exemplo, 1270 nm). Entretanto, Ogilby e Foote sugerem que apesar de uma tendência qualitativa dos efeitos de absorção do solvente ser evidente, ainda falta uma correlação quantitativa entre o tempo de vida calculado e experimentalmente determinado (Ogilby e Foote, 1981, 1983). Estas ponderações podem ser melhor observadas ao analisarmos a Tabela 1.3, que trás a absorbância de vários solventes no comprimento de onda de emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ (1270 nm) e compara com o tempo de meia-vida (τ) obtido experimentalmente para esta molécula em cada solvente.

Tabela 1.3 Correlação do τ do $^1\text{O}_2$ com a absorbância de cada solvente a 1270 nm

Solvente	τ ($^1\text{O}_2$) μs	Abs ₁₂₇₀
acetona-h ₆	46,5 $\pm$ 2,0	7,3
acetona-d ₆	690 $\pm$ 20	0,24
CH ₃ CN	54,4 $\pm$ 1,3	6,1
CD ₃ CN	600 $\pm$ 33	---
benzeno-h ₆	26,7 $\pm$ 1,3	3,9
benzeno-d ₆	550 $\pm$ 11	0,72
H ₂ O	4	166
D ₂ O	68,1 $\pm$ 2,5	21

adaptada da referência (Ogilby e Foote, 1983).

O uso de supressores físicos e solventes deuterados é uma boa maneira para indicar a presença do $^1\text{O}_2$. Entretanto, não há especificidade no uso destes métodos. Uma forma de detecção que sofre menos interferências é a detecção da luminescência do $^1\text{O}_2$. Por se tratar de uma espécie eletronicamente excitada, o $^1\text{O}_2$ decai para o estado fundamental emitindo luz. A investigação espectroscópica da luminescência vermelha que acompanha a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de hipoclorito (OCl^-) realizada por Khan e Kasha revelou a existência de duas bandas de emissão centradas em 634 e 703 nm, atribuídas ao decaimento para o estado fundamental do $^1\text{O}_2$ gerado na reação (Equação 1.1) (Khan e Kasha, 1963).

Atualmente, está bem estabelecido que essas bandas correspondem à transição simultânea de duas moléculas de $^1\text{O}_2$ ao estado fundamental tripleto, também conhecida como emissão bimolecular (Equação 1.2). Esta emissão pode ser monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível à região do vermelho do espectro visível, termoeletricamente resfriada, conectada a um sistema discriminador e amplificador (Boveris *et al.*, 1981). Um problema apresentado na detecção da emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$ é que outras espécies

também podem emitir nesta região do espectro, como por exemplo, as carbonilas excitadas. Estas espécies serão discutidas em uma seção posterior.

Além do decaimento bimolecular do $^1\text{O}_2$, também existe a transição monomolecular do $^1\text{O}_2$, que ocorre na região do infravermelho próximo, sofrendo menos interferências (Equação 1.3). A luminescência desta transição pode ser detectada por um espectrômetro acoplado a um fotodetector constituído de um fotodiodo de germânio resfriado com nitrogênio líquido (Browne e Ogryzlo, 1964). A intensidade da emissão monomolecular é diretamente proporcional à concentração do $^1\text{O}_2$ e, portanto fornece uma medida direta da quantidade produzida (Khan, 1981).

Emissão bimolecular:

Emissão monomolecular:

Outra forma de se detectar a presença do $^1\text{O}_2$ é utilizando captadores químicos. Esta forma de detecção pode ser aplicada tanto em meio biológico como em reações *in vitro*, e é considerada a forma mais sensível de detecção e quantificação do $^1\text{O}_2$ (Nardello e Aubry, 2000). Os captadores químicos mais seletivos pertencem a uma série de compostos policíclicos aromáticos, que reagem com o $^1\text{O}_2$ através de uma cicloadição [4 + 2], resultando em um endoperóxido altamente específico para o $^1\text{O}_2$ (Nardello e Aubry, 2000). Por exemplo, pode-se utilizar a reação de $^1\text{O}_2$ com o 9,10-difenilantraceno (DPA) (Turro e Chow, 1981) ou com derivados de antraceno solúveis em água, como o 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS) (McCall, 1984; Di Mascio e Sies, 1989; Pierlot *et al.*, 2000) (Figura 1.1). Este composto é interessante uma vez que reage com o $^1\text{O}_2$ para formar o endoperóxido correspondente, EASO₂. Além disso, sua solubilidade independe do pH e é maior que o valor β (concentração na qual 50 % do $^1\text{O}_2$ disponível será capturado) para todos os valores de pH. Outras

características favoráveis são a alta estabilidade (até 120 °C) e a facilidade de detecção por HPLC (McCall, 1984; Di Mascio e Sies, 1989).

Figura 1.1 Reação do $^1\text{O}_2$ com seus captadores. 9,10-difenilantraceno (DPA) e 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS), gerando os respectivos endoperoxídeos (DPAO₂ e EASO₂).

1.2.2 Fontes de $^1\text{O}_2$

Em laboratório, o $^1\text{O}_2$ é geralmente gerado por reações de fotossensibilização. Nestas reações, são utilizadas moléculas conhecidas como fotossensibilizadores (tais como azul de metileno e rosa bengala). Alguns dos fotossensibilizadores mais comuns estão listados na Tabela 1.4, juntamente com alguns parâmetros foto-físicos relevantes (Kochavar e Redmond, 2000).

Quando um fotossensibilizador (F) é irradiado com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, esta molécula absorve energia e passa a um estado excitado singlete (F_1^*). Este estado F_1^* pode decair para o estado fundamental singlete (F_0) com emissão de fluorescência, ou decair para um estado tripleto excitado (F_3^*) por inversão espontânea do spin do elétron excitado (cruzamento intersistemas). Uma vez formado o F_3^* , esta espécie pode participar em várias reações: pode decair ao estado F_0 com emissão de fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. Na reação do tipo I, o F_3^* pode reagir com um substrato orgânico ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por transferência de elétrons ou hidrogênio. No tipo II, o fotossensibilizador F_3^* pode transferir energia para o oxigênio molecular, gerando F_0 e $^1\text{O}_2$. Estes processos podem ocorrer

simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do sensibilizador para o O_2 e da concentração de O_2 (Foote, 1968; Straight e Spikes, 1985; Foote, 1991) (Figura 1.2).

Tabela 1.4 Fotossensibilizadores utilizados na geração de 1O_2

Fotossensibilizador	Faixa de absorção (nm)	Rendimento quântico (ϕ_Δ) de 1O_2	Solvente
<p>Rosa Bengala</p>	450-580	0,76	Água, alcoóis
<p>Azul de Metileno</p>	550-700	0,52	Água, alcoóis
<p>Fenalenona</p>	< 400	0,95	Solventes orgânicos

adaptada da referência (Kochavar e Redmond, 2000).

Figura 1.2 Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos do tipo I e do tipo II. Abreviaturas: $h\nu^1$: radiação incidente; $h\nu^2$: emissão de fluorescência; $h\nu^3$: emissão de fosforescência; F_0 : fotossensibilizador no estado fundamental; F_1^* : fotossensibilizador no estado singlete excitado; F_3^* : fotossensibilizador no estado triplete excitado; $F^{\bullet-}$: radical ânion do fotossensibilizador; $F^{\bullet+}$: radical cátion do fotossensibilizador; R: substrato orgânico; $R^{\bullet-}$: radical ânion do substrato orgânico; $R^{\bullet+}$: radical cátion do substrato orgânico; ISC: cruzamento intersistemas.

Como exemplos de geração química de 1O_2 podem ser citadas as reações de H_2O_2 com OCI^- ou peroxinitrito ($ONOO^-$), respectivamente demonstradas nas Equações 1.1 e 1.4 (Held *et al.*, 1978; Di Mascio *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 2000).

O 1O_2 pode ainda ser formado através da termólise de endoperóxidos. Estes compostos são quimicamente inertes e, portanto apropriados para o uso em sistemas biológicos. Alguns exemplos destes geradores são o endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno ($DMNO_2$), o endoperóxido aniônico do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato de sódio ($NDPO_2$) e o endoperóxido não iônico do N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropnamida ($DHPNO_2$) (Pierlot *et al.*, 1996; Pierlot *et al.*, 2000) (Figura 1.3).

Figura 1.3 Exemplos de endoperóxidos geradores de ${}^1\text{O}_2$; DMNO_2 , NDPO_2 e DHPNO_2 , os quais sob aquecimento moderado liberam ${}^1\text{O}_2$, ${}^3\text{O}_2$ e DMN , NDP ou DHPN , respectivamente.

O NDPO_2 foi utilizado em um ensaio mutagênico com cepas de *Escherichia coli* para avaliar o aparecimento de lesões mutagênicas. Contrastando com o DHPNO_2 , que pode ultrapassar a barreira das membranas devido a seu caráter não-iônico, o NDPO_2 , um endoperóxido aniônico, libera o ${}^1\text{O}_2$ fora das células bacterianas. Apesar desta característica, os autores sugeriram que a interação do ${}^1\text{O}_2$ com as membranas celulares gera produtos secundários que podem reagir com o DNA, levando a dano e lesões mutagênicas (Cavalcante *et al.*, 2002).

A geração de ${}^1\text{O}_2$ também tem sido evidenciada em meio biológico por reações que envolvem enzimas como as peroxidases, tais como lactoperoxidase (Kanofsky, 1983), mieloperoxidase (Kanofsky *et al.*, 1984; Kanofsky *et al.*, 1985), cloroperoxidase (Kanofsky, 1984) e peroxidase de raiz forte (Kanofsky, 1988). Da mesma forma, também foram relatadas evidências da geração de ${}^1\text{O}_2$ na fagocitose (Steinbeck *et al.*, 1992), na reação de ozônio (O_3) com biomoléculas (Kanofsky e Sima, 1991) e no processo de lipoperoxidação (Russell, 1957; Howard e Ingold, 1968; Miyamoto *et al.*, 2003). A formação de ${}^1\text{O}_2$ na lipoperoxidação ocorre principalmente por meio do mecanismo discutido 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 $^1\text{O}_2$ (Russell, 1957) (Figura 1.4).

Figura 1.4 Formação de $^1\text{O}_2$ através do processo de lipoperoxidação.

1.2.3 Alvos biológicos do $^1\text{O}_2$

O $^1\text{O}_2$ pode interagir com outras moléculas de duas maneiras: através de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para estas moléculas e retornando ao estado fundamental. O último processo é conhecido como supressão física do $^1\text{O}_2$ e pode ser realizado por carotenóides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis e azida (Foote, 1979). Algumas reações químicas do $^1\text{O}_2$ podem ser destacadas: adição a dienos conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, $4 + 2$) geralmente resultando na formação de endoperoxídeos (Bloodworth e Eggelte, 1985); adição 1,3 a uma dupla ligação, formando “ene” hidroperóxidos (Foote e Denny, 1971); e com alcenos substituídos por grupos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre, formando 1,2-dioxetanos (adição do tipo $2 + 2$) (Baumstark, 1985) (Figura 1.5). O $^1\text{O}_2$ pode ainda reagir com compostos fenólicos para formar hidroperoxidienonas (Foote *et al.*, 1976) e com sulfetos formando sulfóxidos (Ando e Takata, 1985).

Figura 1.5 Reação do $^1\text{O}_2$ com biomoléculas. (A) Reação do tipo ene. (B) Reação do tipo $[4+2]$; (C) Reação do tipo $[2+2]$.

1.2.3.1 Reações do $^1\text{O}_2$ com o DNA

Dentre as bases do DNA, a guanina é a única que reage significativamente com o $^1\text{O}_2$ em pH neutro (Steenken e Jovanovic, 1997). Postula-se que a reação principal envolva a formação de um 4,8-endoperóxido instável, através de uma cicloadição do tipo Dies-Alder [4+2] na ligação 4,8 do anel imidazólico (Figura 1.6 A). O endoperóxido formado decompõe-se formando 8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina, a qual através de intermediários instáveis dá origem a duas espiroiminodihidantoínas diastereoisoméricas (dSp, Figura 1.6 A₂). Estes produtos finais foram atribuídos por experimentos de RMN (Niles *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2002). A 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) foi detectada com um baixo rendimento, quando comparada as dSp (Cadet *et al.*, 1997) (Figura 1.6 A₁).

Contrastando com a oxidação da base guanina isolada, a 8-oxodGuo é o único produto detectado na oxidação de DNA dupla fita pelo $^1\text{O}_2$ (Ravanat *et al.*, 2001) (Figura 1.6 A₁). Têm-se postulado que os 4,8 endoperóxidos diastereoisoméricos iniciais rearranjam em 8-hidroperoxi-2'-desoxiguanosina antes de serem reduzidos a 8-oxodGuo (Sheu e Foote, 1993; Kang e Foote, 2002).

A oxidação da 8-oxodGuo pelo $^1\text{O}_2$ também têm sido estudada. Propõe-se que ocorra uma cicloadição do tipo [2+2] do $^1\text{O}_2$ na ligação entre os carbonos 4 e 5 da 8-oxodGuo gerando um hidroperóxido no C4, via um dioxetano transitório (Sheu e Foote, 1995b). O hidroperóxido formado dá origem ao ácido cianúrico, juntamente com 2,2-diamino-4[-(2-desoxi- β -eritro-pentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (dOz) e as dSp diastereoisoméricas (Raoul e Cadet, 1996; Martinez *et al.*, 2002) (Figura 1.6 B₁ e B₂). Quando a 8-oxodGuo é inserida em um DNA de fita simples, têm-se demonstrado que o hidroperóxido dá origem a um derivado da dehidroguanidinohidantoína. Este composto é posteriormente hidratado na base de Schiff, levando a mais uma hidrólise, liberação da guanidina e formação do ácido oxalúrico (Figura 1.6 B₁). Apenas o nucleosídeo do ácido oxalúrico (dOxa) é observado no DNA de fita simples (Duarte *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que a 8-oxodGuo é um substrato

muito melhor que a dGuo para a oxidação pelo $^1\text{O}_2$ (Sheu e Foote, 1995a; Sheu e Foote, 1995b).

Figura 1.6 Principais produtos da oxidação do DNA pelo $^1\text{O}_2$ DNA. (A) Oxidação da dGuo: (A₁) Oxidação da dGuo isolada e inserida no DNA; (A₂) Oxidação da dGuo isolada. (B) Oxidação da 8-oxodGuo: (B₁) Oxidação da 8-oxodGuo isolada e inserida no DNA fita simples; (B₂) Oxidação da 8-oxodGuo isolada.

1.2.3.2 Reações do $^1\text{O}_2$ com lipídeos

Sabe-se que o $^1\text{O}_2$ adiciona-se aos lipídeos insaturados através de uma reação do tipo “ene” produzindo hidroperóxidos isoméricos (Foote, 1968; Foote e Denny, 1971). Estes hidroperóxidos estão muito bem caracterizados para uma série de lipídeos, e apenas alguns exemplos serão discutidos abaixo.

1.2.3.2.1 Oxidação dos ácidos linoléico e araquidônico

A reação do $^1\text{O}_2$ com o ácido linoléico gera quatro hidroperóxidos nas posições 9, 13 (isômeros contendo dienos conjugados), 10 e 12 (Terao e Matsushita, 1977; Frankel *et al.*, 1979) (Figura 1.7 A 1 e 2). Em contraste, a oxidação do ácido linoléico por radicais gera apenas os isômeros nas posições 9 e 13 (Figura 1.7 A₂). Desta forma, a identificação dos hidroperóxidos não conjugados é uma evidência da oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$. De uma maneira similar, a reação do $^1\text{O}_2$ com o ácido araquidônico, dá origem a oito hidroperóxidos, sendo que apenas dois são não conjugados (Frankel *et al.*, 1979; Terao *et al.*, 1981).

1.2.3.2.2 Oxidação do colesterol

A reação do $^1\text{O}_2$ com o colesterol também já foi investigada e postula-se que a mesma ocorra através de um mecanismo do tipo “ene”, gerando três hidroperóxidos: 3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ene-5-hidroperóxido (5 α -OOH), 3 β -hidroxicolestano-4-ene-6 α -hidroperóxido (6 α -OOH) e 3 β -hidroxicolestano-4-ene-6 β -hidroperóxido (6 β -OOH) (Kulig e Smith, 1973) (Figura 1.7 B₁). O rendimento da geração em membranas fotooxidadas do isômero 5 α -OOH é pelo menos cinco vezes mais alto do que a geração dos isômeros 6 α -OOH e 6 β -OOH (Korytowski e Girotti, 1999). A oxidação por $^1\text{O}_2$ não gera o 3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 α -hidroperóxido (7 α -OOH) nem o 3 β -hidroxicolestano-5-ene-7 β -hidroperóxido (7 β -OOH) diretamente, mas estes hidroperóxidos podem derivar de um rearranjo alílico do hidroperóxido 5 α -OOH (Beckwith *et al.*, 1989). Por outro lado, reações radiculares envolvendo o colesterol levam apenas a formação dos hidroperóxidos 7 α -OOH e 7 β -OOH,

sendo que a detecção dos hidroperóxidos 5α -OOH ou 6α -OOH/ 6β -OOH têm sido usada como um marcador para a oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$ (Figura 1.7 B₂) (Yamazaki *et al.*, 1999).

Figura 1.7 Principais produtos da oxidação de lipídeos pelo $^1\text{O}_2$. (A) Oxidação do ácido linoléico: (A₁) Oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$; (A₂) Oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$ e por radicais. (B) Oxidação do colesterol: (B₁) Oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$; (B₂) Oxidação mediada pelo $^1\text{O}_2$ e por radicais.

1.2.3.3 Aminoácidos e peptídeos como alvos para o $^1\text{O}_2$

A maioria das interações do $^1\text{O}_2$ com aminoácidos, peptídeos e proteínas ocorre via rotas químicas e não através de supressão física, sendo que ambos os mecanismos concorrem significativamente somente no caso do triptofano (Matheson *et al.*, 1975). As constantes para a reação química do $^1\text{O}_2$ com as cadeias laterais dos aminoácidos livres variam consideravelmente, resultando em um dano seletivo a certos resíduos. Dos aminoácidos comuns, apenas o triptofano, a histidina, a tirosina, a metionina, a cisteína e a cistina reagem significativamente com $^1\text{O}_2$ em pH fisiológico (Monroe, 1985; Wilkinson *et al.*, 1995). A Tabela 1.5 apresenta as constantes de velocidade de reação (k) do $^1\text{O}_2$ com alguns aminoácidos (Davies, 2004).

Tabela 1.5 Constantes de velocidade de reação do $^1\text{O}_2$ com cada aminoácido.

Aminoácido	k ($10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
triptofano	3 ^a 2 - 7 ^b
histidina	10 ^a
tirosina	0,8 ^a
cisteína	0,9 ^a
metionina	1,6 ^a

^areação química; ^bsupressão física. Adaptada da referência (Davies, 2004)

1.2.3.3.1 Reação com resíduos de tirosina

Com o aminoácido livre, demonstrou-se a formação de 3 α -hidroxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexahidro-1H-indol-2-ácido carboxílico (HOHICA) na reação com o $^1\text{O}_2$. Acredita-se que este produto seja gerado via um intermediário endoperóxido instável, pela cicloadição [4 + 2] do $^1\text{O}_2$. A subsequente abertura do anel forma um hidroperóxido no C₁, o qual via uma reação do tipo de Michael sofre ciclização resultando em um peróxido cíclico (Criado *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2002) (Figura 1.8). A reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de

tirosina em peptídeos gera como produto principal um hidroperóxido no C₁, que, em baixas temperaturas, decai lentamente para seu álcool correspondente (Wright et al., 2002).

Figura 1.8 Reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de tirosina. HOHICA: 3 α -hidroxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexahidro-1H-indol-2-ácido carboxílico.

1.2.3.3.2 Reação com resíduos de histidina

A oxidação de histidina livre pelo $^1\text{O}_2$ parece envolver a formação inicial de um ou mais endoperóxidos instáveis, através da 1,4 cicloadição do $^1\text{O}_2$ aos carbonos 2,4 e/ou 2,5 do anel imidazólico (Tomita et al., 1969). Evidências desta formação foram obtidas quando endoperóxidos de derivados imidazólicos foram identificados em temperaturas extremamente baixas (Kang e Foote, 2000). Utilizando a N-benzoil-histidina, Tomita e colaboradores (Tomita et al., 1969) detectaram a formação de uréia e derivados benzilados de asparagina e ácido aspártico. Recentemente, Agon e colaboradores (Agon et al., 2006) detectaram hidroperóxidos como intermediários na fotossensibilização e sugerem que estes produtos resultem da decomposição dos endoperóxidos iniciais. Os hidroperóxidos decompõem-se em poucas horas e esta decomposição parece ser seguida por um ataque nucleofílico intra ou intermolecular dependendo da disponibilidade de nucleófilos. No caso de adição intramolecular há a formação de um produto cíclico (Figura 1.9).

Figura 1.9 Reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de histidina.

1.2.3.3.3 Reação com resíduos de metionina

A fotooxidação de resíduos de metionina é dependente do pH: em $\text{pH} \leq 6$, é proposto que a oxidação ocorre via formação de uma espécie zwitterionica que reage com uma segunda molécula de metionina resultando em duas moléculas de sulfóxido; com o aumento do pH, outras reações podem concorrer: em $\text{pH} \geq 9$ íons hidróxido podem levar a uma substituição no átomo de enxofre da espécie zwitterionica, resultando em um mol de peróxido de hidrogênio para cada mol de sulfóxido formado. Além dessas reações, no caso do aminoácido livre e quando $7 \leq \text{pH} \leq 12$ também pode ser formado um intermediário cíclico estável, chamado

dehidrometionina, e um mol de peróxido de hidrogênio (Sysak *et al.*, 1977; Ando e Takata, 1985; Straight e Spikes, 1985) (Figura 1.10).

Figura 1.10 Reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de metionina.

1.2.3.3.4 Reação com resíduos de cisteína

Resíduos de cisteína livres reagem rapidamente com o $^1\text{O}_2$, produzindo o dissulfeto correspondente de um modo não quantitativo. Além disso, oxiácidos como o ácido cistéico também podem ser formados em algumas condições (Ando e Takata, 1985; Straight e Spikes, 1985; Davies, 2004).

1.2.3.3.5 Reação com resíduos de triptofano

A reação do $^1\text{O}_2$ com o triptofano (W) produz um hidroperoxipirroloindol isolável, entretanto, o precursor deste composto ainda não foi identificado (Davies, 2004). Postula-se que ele seja um dioxetano formado com a dupla ligação dos carbonos 2 – 3 do anel indólico, ou ainda um hidroperoxido no C₃. A decomposição subsequente destes intermediários via quebra da ligação entre os carbonos 2 – 3 origina 3 α -hidroperoxipirroloindol, 3 α -hidroxipirroloindol e *N*-formilquinurenina (FMK) (Nakagawa *et al.*, 1975; Nakagawa *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1981) (Figura 1.11). Dados cinéticos e propostas mecanísticas defendem que a reação de oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$ em dipeptídios ocorre de forma similar à oxidação do aminoácido livre. Este não é um comportamento comum a outros di e polipeptídios de aminoácidos fotooxidados, nos quais a presença da ligação peptídica influencia consideravelmente a reatividade fotodinâmica. Contudo, parece que a via preferencial de reação para os peptídios contendo triptofano é diferente, formando principalmente hidroperoxipirroloindol e seu álcool correspondente e, em menores quantidades, quinurenina (kn) (Posadaz *et al.*, 2004).

Figura 1.11 Reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de triptofano.

1.3 Estudos envolvendo o mecanismo de decomposição do triptofano oxidado à FMK

Apesar do grande interesse no mecanismo envolvido na oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$, ainda resta muito a ser elucidado. Desta forma, como acima citado, propõe-se que a foto-

oxidação do W dá origem a uma 3-hidroperoxiindolenina instável **(1)** (Figura 1.12), o primeiro intermediário postulado como capaz de rearranjar à FMK **(7)** (Ek *et al.*, 1952; Nakagawa *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981). Entretanto, ao menos três vias têm sido sugeridas para a transformação deste hidróperóxido em FMK (Figura 1.12). Primeiro, uma indolenina hidratada **(2)** e um produto de seu rearranjo **(3)** foram sugeridos como intermediários (Hamilton, 1969; Sundberg, 1970). Propõe-se que este mecanismo envolva a heterólise da ligação O-O do hidróperóxido, seguido de uma migração de grupamento alquila, resultando no produto **(3)**. Subseqüentemente, este produto sofreria decomposição à FMK. Outra via sugerida é a decomposição através de uma homólise ou heterólise da ligação O-O do hidróperóxido tricíclico **(4)**, resultando em uma hidroxiketona intermediária de oito membros **(5)**, que então sofreria decomposição à FMK (Saito *et al.*, 1977). Finalmente, um dioxetano **(6)** derivado de um tautomerismo anel-cadeia entre **(1)** e **(4)** também é considerado um provável intermediário (Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981). Além da via oxidativa que leva à geração de FMK, um álcool **(8)** também tem sido reportado como um produto de decomposição concorrente, derivado da redução da 3-hidroperoxindolenina **(1)** ou do tautômero de anel **(4)** (Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981).

Figura 1.12 Prováveis mecanismos de reação do $^1\text{O}_2$ com triptofano.

1.4 Estados excitados, dioxetanos e reações quimiluminescentes

1.4.1 Estados excitados

A maioria das moléculas orgânicas no estado fundamental possui multiplicidade singlete (S), a qual significa que seus elétrons possuem spins pareados. Esta conclusão é tirada do cálculo de multiplicidade ($2S + 1$), onde S é o número quântico total de spin, que pode ser calculado pela soma vetorial das contribuições individuais de cada elétron. No estado singlete, os spins são opostos ($+1/2$, $-1/2$), $S = 0$ e multiplicidade = 1. Em contraste, no estado triplete, $S = 1$ e multiplicidade = 3.

Quando uma molécula absorve luz (visível ou ultravioleta) pode ocorrer a excitação de um elétron do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, highest occupied molecular orbital) para o orbital desocupado mais baixo (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital). Esta situação é instável quando comparada ao estado fundamental, e o excesso de energia pode ser liberado na forma de energia térmica ou radioativa. As transições que não envolvem a emissão de radiação são chamadas de não emissivas; Por outro lado, as transições que emitem radiação são chamadas radioativas.

A radiação emitida é chamada fluorescência se o elétron no estado excitado possui a mesma multiplicidade do estado fundamental (geralmente de um estado S_1 para S_0). Por outro lado, a radiação é chamada fosforescência se a transição eletrônica ocorre de um estado excitado com multiplicidade diferente do estado fundamental (geralmente de um estado T_1 para S_0). As demais vias de desativação da espécie excitada são não radioativas e incluem conversão interna (para estados de mesma multiplicidade) e cruzamento intersistema (para estados de multiplicidade diferente). Transições radioativas são verticais e envolvem mudança da energia total da molécula, devido à absorção e emissão de um fóton. Por outro lado, transições não radioativas são horizontais, e com energia constante. Estes achados estão sumarizados no diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 1.13. Estes três parágrafos têm apenas um intuito introdutório para os temas seguintes, e foram extraídos de livros texto de

fotoquímica. Para uma completa revisão, ver as referências (Gilbert e Baggot, 1991; Turro, 1991).

Figura 1.13 Diagrama de Jablonski. S₀ corresponde ao estado fundamental singlete, S₁, ao estado excitado singlete e T₁ ao estado tripleto excitado. RV: relaxação vibracional; CIS: cruzamento intersistemas; CI, conversão interna; Δ: ativação térmica.

1.4.2 Decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos

Dioxetanos são peróxidos cíclicos de quatro membros, cuja clivagem produz compostos carbonílicos sendo que um deles pode ser formado em um estado eletronicamente excitado (McCapra, 1976). Três mecanismos foram postulados para explicar a decomposição destes compostos: concertado, concertado não sincronizado e birradicalar. O mecanismo concertado foi originalmente proposto por McCapra (McCapra, 1968) e Kearns (Kearns, 1969), e envolve a clivagem simultânea de ambas as ligações, C-C e O-O do anel dioxetânico. Propõe-se que o produto eletronicamente excitado é gerado diretamente no complexo ativado. O mecanismo birradicalar foi proposto originalmente por Richardson (Richardson *et al.*, 1974), que considerou o mecanismo de clivagem em etapas, primeiro ocorrendo o estiramento da ligação O-O para um birradical singlete. Este birradical singlete pode reciclar, sofrer o

rompimento da ligação C-C levando a uma carbonila excitada (n,π^*) ou por cruzamento intersistemas tornar-se um birradical triplete, clivando em um produto triplete excitado (Adam e Zinner, 1982). Em contraste, no mecanismo concertado não-sincronizado (merged) a quebra da ligação O-O é mais avançada que a quebra da ligação C-C (Turro e Chow, 1981; Adam e Baader, 1985). Este mecanismo parece o mais adequado para explicar todos os dados experimentais obtidos até o momento (Baader *et al.*, 2006). Os três mecanismos propostos estão sumarizados na Figura 1.14.

Figura 1.14 Mecanismos de clivagem de dioxetanos. Adaptada da referência (Baader *et al.*, 2006).

1.4.3 Classificação das reações quimiluminescentes

Com relação à natureza do processo que dá origem ao estado excitado de uma espécie emissora, as reações quimiluminescentes podem ser classificadas em três tipos: quimiluminescência direta, quimiluminescência indireta ou intensificada e quimiluminescência ativada (Schuster *et al.*, 1979; Campbell, 1988; Baader *et al.*, 2006).

O termo quimiluminescência direta designa uma reação na qual o produto excitado emite fluorescência e/ou fosforescência diretamente. Na presença de um aceptor apropriado de energia e que possui um alto rendimento quântico de fluorescência, a quimiluminescência

direta pode ser consideravelmente aumentada, e a emissão observada corresponde à fluorescência do acceptor. Este tipo de reação chama-se quimiluminescência indireta ou intensificada (Adam, 1982; Campbell, 1988). Estes aceptores não participam da reação de decomposição e, conseqüentemente, não alteram a velocidade da reação. O 9,10-difenilantraceno (DPA) é o acceptor mais comumente utilizado para espécies geradas na forma singlete. Em contraste, o 9,10-dibromoantraceno (DBA) é utilizado como acceptor triplete. A transferência de energia neste caso, de uma espécie excitada triplete para um acceptor singlete é facilitada pelo efeito do átomo pesado (heavy-atom) neste caso, o átomo de bromo (Wilson e Schaap, 1971; Adam, 1982).

Na quimiluminescência ativada, um composto adicionado também leva a um aumento na intensidade de emissão. Contudo, contrariamente à quimiluminescência indireta, este composto, agora chamado de ativador é diretamente envolvido no processo de excitação, que não envolve transferência de energia. Além disso, as constantes de velocidade e as intensidades de emissão dependem do potencial de oxidação do ativador utilizado, indicando uma transferência de elétron no passo limitante de velocidade (Schuster e Horn, 1982; Campbell, 1988; Baader *et al.*, 2006). Este mecanismo chama-se luminescência induzida quimicamente pela troca de elétron (CIEEL, Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) e foi proposto por Schuster (Koo e Schuster, 1978; Schuster *et al.*, 1979).

1.4.4 Decomposição catalisada de peróxidos

1.4.4.1 Catálise Intermolecular

Parece que a catálise intermolecular inicia-se por um complexo de transferência de carga entre o peróxido e o ativador, seguindo-se de uma transferência de elétron do ativador para o peróxido, provavelmente concomitantemente com a quebra da ligação O-O. Na seqüência, ocorre a quebra da ligação C-C, com perda de fragmento neutro, transformando o peróxido num radical ânion. Na verdade esta perda de fragmento neutro deixa um par de

radicais em contato na gaiola do solvente (o radical cátion do ativador e o radical ânion do peróxido). A transferência de elétron de volta entre estes dois íons radicais pode liberar energia suficiente para formar o ativador em seu estado singlete excitado (Scandola *et al.*, 1981; Schuster e Horn, 1982).

1.4.4.2 Catálise Intramolecular

Geralmente, a clivagem térmica de 1,2-dioxetanos gera duas carbonilas, uma delas podendo ser formada no seu estado excitado, predominantemente triplete (Zimmerman *et al.*, 1976; Koo e Schuster, 1977). Entretanto, quando dioxetanos possuem um substituinte rico em elétrons, obtém-se predominantemente o estado singlete, e acredita-se que ocorra uma CIEEL intramolecular (Nakamura e Goto, 1979a, 1979b; Zaklika *et al.*, 1979). A grande eficiência da produção do estado singlete e da quimiluminescência podem ser explicadas em termos da conjugação de um grupo doador de elétrons e cromóforo altamente fluorescente com o estado excitado da carbonila a ser formada (McCapra, 1977; Nakamura e Goto, 1979b).

1.5 Propagação do dano e conseqüências biológicas da oxidação de resíduos de aminoácidos em proteínas

Estudos têm demonstrado que peróxidos de peptídeos e proteínas têm uma meia vida relativamente longa (várias horas, num ambiente celular) (Wright *et al.*, 2003). Ainda não se sabe claramente qual a razão da longa meia-vida, mas experimentos mostraram que a maioria dos sistemas responsáveis pela remoção de peróxidos nas células não reagem rapidamente com espécies derivadas de proteínas (Morgan *et al.*, 2004).

Os peróxidos de proteínas podem sofrer decomposição térmica ou catalisada por íons metálicos, gerando radicais peroxila (Hawkins e Davies, 2001) (Equação 1.5)

Os peróxidos de proteínas também podem sofrer redução por um elétron gerando radicais alcóxila (reação de Fenton) (Hawkins e Davies, 2001) (Equação 1.6).

Deste modo, a formação de peróxidos em uma proteína pode resultar em danos subseqüentes a outras proteínas. Estes danos incluem inativação enzimática, como a que foi demonstrada quando caspases, cisteíno-proteases que desempenham um papel central na apoptose, foram expostas a hidroperóxidos de triptofano e tirosina (Hampton *et al.*, 2002). Outro exemplo de inativação enzimática é o da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Peróxidos de proteínas demonstraram reagir com o grupo tiol do sítio ativo desta enzima, inativando-a (Morgan *et al.*, 2002). Recentemente, foi demonstrada a oxidação seletiva de certos resíduos de cisteína da ATPase dependente de cálcio do retículo sarco/endoplasmático por peróxidos de triptofano e tirosina. Estes peróxidos foram inclusive mais reativos que o H_2O_2 . Utilizando ferramentas analíticas importantes tais como HPLC acoplado a espectrometria de massa em tandem, foi possível identificar os resíduos de cisteína mais susceptíveis à oxidação e correlacionar estes achados com a estrutura da proteína e o mecanismo de oxidação (Dremina *et al.*, 2007).

Geralmente as modificações oxidativas levam a uma perda de função destas proteínas (ou ganho de uma função indesejada). Com o intuito de evitar o acúmulo em excesso destas proteínas danificadas, as células eucarióticas dispõem de um sistema proteassomal, responsável pela degradação de proteínas oxidadas no citoplasma, núcleo e retículo endoplasmático (Grune *et al.*, 2003).

Uma oxidação moderada das proteínas aumenta sua suscetibilidade à proteólise e as torna substrato para o proteassomo. Contudo, proteínas severamente oxidadas parecem ser substratos de difícil ubiquitinação, primeiro agregando-se e então formando ligações cruzadas que as tornam altamente resistentes à proteólise. A incapacidade de degradar proteínas extensivamente oxidadas pode contribuir para o acúmulo de agregados protéicos que ocorre

em algumas doenças (incluindo várias doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer e Parkinson) e durante o processo de envelhecimento (Grune *et al.*, 2003).

1.5.1 Modificações oxidativas em proteínas: um enfoque em resíduos de triptofano

Uma das reações mais amplamente estudadas na área de agregação de proteínas é a formação da ligação 2,2'-bifenil entre dois radicais de tirosina, gerando ditirosina (Giulivi *et al.*, 2003). Entretanto, recentemente têm-se demonstrado que produtos de oxidação do triptofano também parecem estar envolvidos em alguns eventos relacionados à formação de ligações cruzadas e agregados protéicos. Dentro deste contexto, cabe ressaltar a importância da formação de derivados oxidados do triptofano, em especial FMK e kn. É bem conhecido que o acúmulo gradual de quinureninas nos tecidos humanos pode resultar em um aumento do dano por fotossensibilização, já que estes compostos são agentes fotossensibilizantes eficientes. Este ponto é particularmente significativo em órgãos humanos expostos à radiação solar (Posadaz *et al.*, 2004). Como exemplo, pode-se citar o cristalino do olho humano, que desempenha um papel fundamental na visão. O cristalino contém compostos de baixo peso molecular (formados principalmente de quinureninas) que atuam como filtros intra-oculares, absorvendo a luz UV na região situada entre 300 – 400 nm, e prevenindo o dano induzido à retina por esta luz. Muitos pesquisadores têm investigado a possibilidade de estes filtros modificarem covalentemente o cristalino. Em pessoas jovens, as moléculas de filtros UV existem primariamente na forma livre. Entretanto, com o passar do tempo, o nível de quinureninas ligadas covalentemente às proteínas do cristalino do olho aumenta exponencialmente (Vazquez *et al.*, 2002). Parker e colaboradores demonstraram que a foto-exposição de agregados quinurenina-proteína pode iniciar um dano oxidativo mediado pelo $^1\text{O}_2$ às proteínas do cristalino do olho (Parker *et al.*, 2004). Esta foto-oxidação resulta em formação de H_2O_2 e outros peróxidos protéicos.

Outra implicação biológica observada envolvendo produtos de oxidação do triptofano (kn e FMK) foi a formação de agregados covalentes da superóxido dismutase humana. Parece que a oxidação de um resíduo de triptofano à kn e FMK resulta em ligações cruzadas e agregados proteicos. Estes agregados parecem estar envolvidos na esclerose lateral amiotrófica, uma doença degenerativa do neurônio motor (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2004b). Outro dado importante foi a comprovação de que o resíduo de W32 potencializa a agregação e a citotoxicidade da superóxido dismutase. A substituição deste resíduo de W por fenilalanina resultou em uma diminuição desta citotoxicidade (Taylor *et al.*, 2007). Estes estudos demonstram que o resíduo de W 32 é fundamental no desenvolvimento de agregados covalentes desta enzima, e que parece que esta agregação é dependente da formação de FMK e kn. Entretanto, os dados disponíveis até agora não são capazes de elucidar os mecanismos químicos destas reações.

Têm-se demonstrado que a oxidação protéica gera uma série de implicações biológicas como as acima citadas, por exemplo, formação de agregados protéicos e modificações oxidativas acumuladas durante o desenvolvimento de catarata. Além disso, têm-se demonstrado que o triptofano é um aminoácido extremamente susceptível a oxidação, inclusive pelo $^1\text{O}_2$. Entretanto, há poucos trabalhos enfocando detalhadamente as reações, com estudos de estabilidade, identificação de subprodutos e propostas mecanísticas. Desta forma, pretendemos com este trabalho contribuir no esclarecimento do mecanismo de oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$, através da análise e caracterização de produtos de oxidação gerados e de estudos para elucidar os mecanismos destas reações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir no esclarecimento das bases químicas envolvidas na oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$, através da análise e caracterização de produtos de oxidação gerados e de estudos para elucidar os mecanismos destas reações.

2.2 Metas

- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar por HPLC/MS/MS e RMN os produtos formados pela oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$;
 - ✓ Sintetizar os produtos de oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$ isotopicamente marcados com [^{18}O] para estudos mecanísticos;
 - ✓ Avaliar a estabilidade dos principais foto-produtos em diferentes temperaturas e pHs, bem como a reatividade frente a metais;
 - ✓ Estudar os mecanismos de decomposição dos foto-produtos iniciais, utilizando marcação isotópica acoplada à experimentos de HPLC/MS/MS e medidas de emissão de luz.
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A água deuterada (99,9 %), a água marcada com [^{18}O] (H_2^{18}O , 97 %), o 9,10-difenilantraceno (DPA), e o 9,10-dibromoantraceno (DBA) foram obtidos junto a Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos).

Ácido sulfúrico, azul de metileno e ácido fórmico foram adquiridos junto à Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

Alaranjado de xilenol foi adquirido junto a Synth (Diadema, Brasil).

Cloreto de sódio, tampão tris, azida de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), formiato de amônio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, acetato de sódio, hidróxido de sódio, borohidreto de sódio (NaBH_4), resina Chelex[®], rosa bengala, L- triptofano (W), cloreto de cobre (CuCl_2) e sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Sigma (Missouri, Estados Unidos).

Os filtros de seringa Acrodisc de 13 mm com membrana de poliétersulfona de 0,2 μm foram obtidos junto à Pall Corporation (Arbor, MI, Estados Unidos).

Colunas para HPLC, LC-18 Luna (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μm) e coluna semi-preparativa LC-18(2), Luna, (250 x 10 mm, tamanho de partícula 10 μm) foram obtidas junto à Phenomenex (Califórnia, Estados Unidos).

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

Todos os solventes utilizados (acetonitrila, metanol, etanol) eram de nível para HPLC e foram adquiridos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). A água ultrapura utilizada foi tratada pelo sistema de purificação da Water System Nanopure da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos).

3.2 Equipamentos

- Agitador Thermomixer Confort da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) modelo 5355.
- Balanças da Denver Instrument Company (Estados Unidos) modelos XE-310 e AA-200.
- Centrífuga da Hitachi (Tóquio, Japão) modelo SCR 20B.
- Espectrofotômetro da Hitachi (Tóquio, Japão) modelo U-3000.
- Injetor manual da Rheodyne (Califórnia, Estados Unidos).
- Liofilizador Savant (Nova Iorque, Estados Unidos), modelo RVT 4104.
- pHmetro da Corning (Estados Unidos) modelo 320.
- Sistema de HPLC da Shimadzu (Tóquio, Japão): 2 bombas LC-10ADVP, injetor automático SIL-10ADvp, detector de absorbância UV SPD-10AVVP, detector de fluorescência RF-551, detector de fotodiodos em série SPD-M10AVVP, controlador de Sistema SCL-10AVP conectado a um computador e software CLASS-VP versão 5.03.
- Sistema de MS composto por: espectrômetro de massa Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido), com fonte API z-spray e software Masslynx versão 3.2.
- Espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) modelos DRX 500, série Avance, e AC 200, da Bruker – Biospin (Alemanha).
- 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). O tubo fotomultiplicador foi conectado a um amplificador (model 1121; Princeton Instruments), o qual transmite o sinal ao computador.

3.3 Síntese dos foto-produtos do triptofano (W)

O W foi dissolvido em D₂O (concentração final 20 mM) e foi adicionada uma solução metanólica de Rosa Bengala para a concentração final de 10 µM. A reação foi conduzida em um balão imerso em banho de gelo, com uma pressão de O₂ de 0,25 atm. A mistura de reação foi irradiada com lâmpada de tungstênio (500 W) por aproximadamente 2 horas, utilizando-se

um filtro de corte de 360 nm. Após o término da reação, a rosa bengala foi retirada utilizando-se filtros de seringa Acrodisc de 13 mm de diâmetro com membrana de poliétersulfona de 0,2 μm .

3.4 Síntese dos foto-produtos do W marcados com $^{18}\text{O}_2$

O W foi dissolvido em D_2O (concentração final 20 mM) e foi adicionada uma solução metanólica de Rosa Bengala para a concentração final de 10 μM . O oxigênio contido no sistema foi removido através de três sucessivas etapas de congelamento (em nitrogênio líquido) e descongelamento da solução sob vácuo. Após esta etapa o sistema foi conectado a um cilindro de $^{18}\text{O}_2$, mantendo-se a pressão do gás a 0,25 atm. A mistura de reação foi irradiada com lâmpada de tungstênio (500 W) por aproximadamente 2 horas, utilizando-se um filtro de corte de 360 nm. Após o término da reação, a rosa bengala foi retirada utilizando-se filtros de seringa Acrodisc de 13 mm de diâmetro com membrana de poliétersulfona de 0,2 μm .

3.5 Quantificação dos hidroperóxidos (WOOH) gerados na foto-oxidação do W

Os WOOH foram quantificados através de dosagem espectrofotométrica a 560 nm, pelo método do alaranjado de xilenol, utilizando peróxido de hidrogênio como padrão (Gay *et al.*, 1999).

3.6 Análise da formação dos foto-produtos do W por HPLC

A formação de WOOH e subprodutos foi analisada por HPLC, utilizando uma coluna C18, Luna, Phenomenex, 250 x 46 mm, 5 μM . Para isso utilizou-se como fase móvel ácido fórmico 0,05 %: acetonitrila (96:4) a um fluxo de 1 ml/min, monitorando-se em 215 nm. As amostras eram diluídas 10 vezes e injetava-se 10 μl em cada análise.

3.7 Análise dos foto-produtos do W por HPLC/MS/MS

Os produtos de reação foram analisados por HPLC acoplado ao espectrômetro de massa (Quattro II da Micromass). As condições de análise no HPLC foram as mesmas utilizadas no item 3.6. As análises no espectrômetro de massa foram feitas no modo electrospray positivo (ESI+), com temperaturas da fonte e de dessolvatação respectivamente de 100 e 150 °C. As voltagens do cone eram de 5, 10 ou 25 V.

3.8 Análise dos foto-produtos do W por RMN

Os produtos de reação foram solubilizados em D₂O e analisados por RMN (DRX 500 serie Avance, ou AC 200, Bruker). As análises realizadas para cada produto de reação serão especificadas durante a descrição das mesmas.

3.9 Purificação dos foto-produtos do W por HPLC

Os hidroperóxidos e demais subprodutos foram purificados utilizando-se uma coluna semi-preparativa (C18 (2), Luna, Phenomenex, 250 x10 mm, 10 µM). Em cada corrida foram injetados 500 µl da solução contendo W (20 mM) irradiado por 2 h. Para isso utilizou-se um gradiente composto por água e acetonitrila, sendo isocrático com 2 % de acetonitrila até 8 minutos, aumentando-se a concentração de acetonitrila para 6 % em 8,5 minutos, mantendo 6% até 15 minutos, elevando para 40 % em 18 minutos, mantendo até 21 minutos esta concentração para lavagem, e voltando para 2 % de acetonitrila em 24 minutos, seguindo de estabilização nesta condição até 29 minutos. O fluxo foi de 4,6 ml/min, monitorando-se em 215 nm. Os produtos da reação foram coletados em tubos plásticos resfriados por gelo seco, liofilizados e posteriormente armazenados a -20 °C. Antes de cada experimento, os WOOH foram ressuspensos em solvente apropriado (água, D₂O, etanol ou etanol/DMSO (6:2)), dosados pelo método do alaranjado de xilenol e analisados quanto a sua pureza por HPLC, conforme descrito respectivamente nos itens 3.5 e 3.6.

3.10 Avaliação da decomposição dos WOOH por um agente redutor

Adicionou-se NaBH_4 (concentração final, 200 μM) à solução fotossensibilizada contendo os WOOH e incubou-se por 1 h a 4 °C. Imediatamente após, as soluções foram analisadas por HPLC/MS, conforme descrito no item 3.6.

3.11 Avaliação da estabilidade térmica dos WOOH

A fim de avaliar a estabilidade dos hidroperóxidos, soluções de cada WOOH (3 mM) foram incubadas por diferentes intervalos de tempos (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8 h) e em três diferentes temperaturas (4; 25; e 37 °C). Imediatamente após cada tempo de incubação, a quantidade e composição de peróxidos resultantes foram avaliadas pelo método do alaranjado de xilenol e por HPLC, conforme descrito respectivamente nos 3.5 e 3.6. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes.

3.12 Avaliação da decomposição dos WOOH por metais

A soluções de cada WOOH (3 mM) adicionou-se soluções de FeSO_4 ou CuCl_2 suficientes para a concentração de 100 μM incubando-se as reações por diferentes intervalos de tempo (0,5; 1; 2; 4; 6 e 8h) a 37 °C. Experimentos controle, incubando-se apenas os WOOH (3 mM) a 37 °C também foram realizados. Imediatamente após cada tempo de incubação, a quantidade e composição de peróxidos resultantes foram avaliadas pelo método do alaranjado de xilenol e por HPLC, conforme descrito respectivamente nos itens 3.5 e 3.6. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes.

3.13 Avaliação da estabilidade dos WOOH em diferentes pHs

A fim de avaliar a estabilidade dos hidroperóxidos em diferentes pHs, soluções de cada WOOH (3 mM) foram incubadas por diferentes intervalos de tempo (0,5; 1; 2; 4; 6 h) a 37 °C. Os pHs utilizados foram: pH 5,5 (tampão acetato de sódio 25 mM); pH 7,4 e 8,5

(tampão tris 25 mM). Experimentos controle, incubando-se apenas os WOOH (3 mM) a 37 °C também foram realizados. Imediatamente após cada incubação, a quantidade e composição de peróxidos resultantes foram avaliadas pelo método do alaranjado de xilenol e por HPLC, conforme descrito respectivamente nos itens 3.5 e 3.6. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes.

3.14 Experimentos de espectrometria de massa e marcação isotópica para caracterizar a FMK e suas fragmentações

Para caracterizar a molécula de FMK, três diferentes populações de moléculas foram utilizadas: uma população sintetizada somente com átomos de oxigênio 16; uma população sintetizada com átomos de oxigênio 18; e finalmente uma população sintetizada com átomos de oxigênio 16, mas incubada na presença de H₂¹⁸O. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico 0,05 % e acetonitrila (96:4). Os espectros de massa foram obtidos no modo electron spray positivo, temperaturas da fonte e de dessolvatação de 100 e 150 °C, respectivamente e voltagem do cone em 30 V. Esta voltagem do cone foi especialmente escolhida, uma vez que possibilitava a formação de fragmentos protonados na fonte. Cada íon precursor ou fragmento protonado foi selecionado e fragmentado novamente, utilizando a energia de colisão de 10 eV. Adicionalmente, para cada fragmento protonado foram analisados os íons precursores, utilizando energia de colisão de 10 eV. Estes experimentos foram realizados para cada fragmento protonado das três diferentes populações de FMK.

3.15 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à *N*-formilquinurenina (FMK)

3.15.1 Estudos envolvendo marcação isotópica da FMK

3.15.1.1 Análise da decomposição dos $W^{18}O^{18}OH$ para FMK por HPLC/MS/MS

Soluções de cada $W^{18}O^{18}OH$ (1,5 mM) foram incubadas com tampão tris pH 8.5 por até 3 h a 37 °C e sob agitação. Posteriormente, alíquotas foram retiradas, diluídas 10 vezes e 10 µl destas diluições foram injetadas no sistema de HPLC/MS/MS conforme descrito no item 3.7.

3.15.1.2 Estudos das trocas envolvendo a FMK e a água

Uma solução de FMK purificada (1 mM), contendo apenas átomos de oxigênio 16 foi incubada na presença de $H_2^{18}O$ por diferentes intervalos de tempo (2 e 4 h) a 37 °C e sob agitação. Imediatamente após, a amostra foi analisada por HPLC/MS/MS conforme descrito no item 3.7. Um experimento controle foi realizado, injetando-se a FMK no sistema de HPLC/MS/MS imediatamente após a solubilização da mesma em $H_2^{18}O$.

3.15.1.3 Análise da decomposição dos $W^{18}O^{18}OH$ para FMK em etanol seco

Os $W^{18}O^{18}OH$ isolados (*trans*, 425 µM e *cis*, 295 µM) foram solubilizados em etanol seco, e submetidos a aquecimento a 70 °C por até 30 minutos. As amostras foram protegidas da luz e mantidas sob constante agitação. Triptofano (100 µM) foi usado como padrão interno. Após o término de cada incubação, as amostras foram quantificadas por HPLC/MS/MS utilizando-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As transições utilizadas foram: 237 para 220 para a FMK não marcada; 239 para 222 e 241 para 224, respectivamente para a FMK marcada com um ou dois átomos de oxigênio; 211 para 194 para a kinurenina (kn); 241 para 148 para os $W^{18}O^{18}OH$, e 205 para 188 para o padrão interno (W).

3.15.2 Estudos envolvendo quimiluminescência obtida pela decomposição dos WOOH

A emissão de luz foi medida em um contador de fótons que consiste em um tubo fotomultiplicador sensível na região do vermelho (9203 BM Thor EMI Electron Tubes), refrigerado termoelettricamente a -20 °C (FACT 50 MKIII). Foi aplicado um potencial de -1150 V, e o tubo fotomultiplicador foi conectado a um amplificador (model 1121; Princeton Instruments), o qual transmite o sinal ao computador. As condições específicas usadas em cada experimento serão descritas quando os mesmos forem apresentados. A emissão de luz em intervalos de comprimento de onda determinados foi obtidas com filtros de corte (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA) colocados entre a cubeta e a fotomultiplicadora.

3.15.2.1 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH por adição de base

Uma mistura contendo os dois isômeros de WOOH (3 mM) foi colocada em uma cubeta em frente a fotomultiplicadora e estabilizada a 37°C. Após 1 minuto, a fenda da fotomultiplicadora foi aberta e após 2 minutos, uma solução de NaOH (concentração final, 20 mM) foi injetada na cubeta. Uma reação controle foi realizada, substituindo-se a solução de NaOH por água.

3.15.2.2 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH por aquecimento

Para avaliar a luminescência do sistema sob aquecimento, uma mistura dos WOOH (3 mM) foi colocada em uma cubeta em frente à fotomultiplicadora e a solução foi aquecida a 70 °C. Após 1 minuto, a fenda da fotomultiplicadora foi aberta e o aumento na emissão de luz foi acompanhado por 16 minutos.

3.15.2.3 Avaliação da quimiluminescência gerada na decomposição de cada WOOH isolado e em solvente orgânico

Os WOOH *trans* ou *cis* purificados foram solubilizados em uma mistura DMSO: etanol (2:6) e a concentração de peróxidos foi acertada através do método do alaranjado de xilenol. Cada hidroperóxido (*trans* ou *cis*, concentração final 1,5 mM, volume final 1 mL, em etanol), foi colocado em uma cubeta em frente à fotomultiplicadora e a solução foi termostatizada a 37 °C. Após 1 minuto, a fenda da fotomultiplicadora foi aberta e após 2 minutos, foram injetados 100 µl de uma solução de NaOH 25 mM em etanol. Uma reação controle foi realizada substituindo-se os WOOH por W (1,5 mM), solubilizado em uma mistura DMSO: etanol (2:6). A fenda da fotomultiplicadora foi fechada após aproximadamente 4 minutos.

3.15.2.4 Determinação da velocidade inicial de conversão de cada WOOH à FMK

Para a determinação da velocidade inicial (V_0) da conversão de cada isômero à FMK, o espectro de absorção de uma solução aquosa contendo 200 µM de cada WOOH foi medido. Posteriormente, tampão tris pH 7,4 (concentração final na cubeta, 8 mM) foi adicionado à reação. Imediatamente após, a absorção em 340 nm (ϵ_{340} FMK = 2260 M⁻¹cm⁻¹) em foi monitorada por aproximadamente 2 h, a 37 °C. Após este período, o espectro de absorção foi novamente medido. A V_0 foi calculada a partir da inclinação da parte linear de cada reta. Estes experimentos também foram monitorados por HPLC, conforme descrito no item 3.7.

3.15.2.5 Determinação da natureza da espécie excitada

Para avaliar a natureza da espécie excitada, foram utilizados dois aceptores fluorescentes: o DBA para avaliar a presença de carbonila triplete e o DPA para avaliar a presença de carbonila singlete. Desta forma, os WOOH (*trans* ou *cis*) foram solubilizados em

uma mistura DMSO: etanol (2:6) e dosados pela técnica do alaranjado de xilenol, conforme descrito no item 3.5 para acertar a concentração. Cada reação foi conduzida em uma cubeta de volume final 1 ml, contendo o hidroperóxido (*trans* ou *cis*, concentração final 1,5 mM em etanol) e DBA ou DPA (dissolvido em acetona, concentração final 100 μ M). A temperatura utilizada foi 37 °C. Após 1 min, a fenda da fotomultiplicadora foi aberta, e após 2 min 100 μ l de NaOH 25 mM em etanol foram injetados na solução. Reações controle foram realizadas substituindo-se os WOOH por W (1,5 mM, solubilizado em uma mistura DMSO: etanol (2:6)) a fenda da fotomultiplicadora foi fechada após aproximadamente 4 minutos.

3.15.2.6 Determinação dos espectros de emissão de luminescência para a decomposição de cada WOOH isolado

Para obter-se os espectros de emissão de luminescência da decomposição dos WOOH isolados, 12 μ Mols de cada hidroperóxido (3 mM, 4 ml) foram aquecidos a 70 ° C até atingir uma estabilidade na intensidade da emissão de luz. Então, a cada 1 minuto, alternava-se a medida de emissão de luz sem nenhum filtro ou com filtros de corte em comprimentos de onda específicos. Foram utilizados filtros dos seguintes comprimentos de onda: 360, 395, 420, 435, 485, 515, 550, 590, 610 e 665 nm. Os cálculos foram feitos dividindo-se a intensidade de luminescência encontrada para um determinado filtro de corte pela média de intensidade de luminescência do minuto imediatamente antes e do minuto imediatamente após a medida. A sensibilidade da fotomultiplicadora também foi levada em consideração, e a correção para cada intervalo de comprimento de onda foi efetuada de acordo com as especificações da fotomultiplicadora. Além disso, também foi efetuada uma correção para cada filtro utilizado, baseada nas especificações do fabricante (Melles Griot Inc., Carlsbad, CA). Para cada amostra, as análises foram realizadas no mínimo em duplicata.

3.16 Medidas do espectro de fluorescência da FMK

Os espectros de fluorescência da FMK foram obtidos em um fluorímetro SPEX Fluorolog 1681.

3.17 Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$

3.17.1 Elucidação estrutural dos fotoprodutos

Os fotoprodutos foram sintetizados com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$, purificados, liofilizados e analisados por HPLC/UV-Vis, HPLC/MS/MS e RMN, conforme descrito respectivamente nos itens 3.6, 3.7 e 3.8. Com o intuito de elucidar estruturalmente estes dois novos produtos, também foram realizadas análises por HPLC/MS incubando-se a mistura fotossensibilizada com NaBH_4 ou Fe(II) .

3.17.2 Investigação da origem dos novos fotoprodutos

Para investigar a via de origem dos fotoprodutos (reação de fotossensibilização tipo I ou II), o DMNO_2 foi utilizado como uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$. Neste experimento, soluções de W (10 mM) foram incubadas com DMNO_2 (10 mM), a 37 °C, na ausência de luz e sob agitação por até 8 h. As reações foram realizadas em D_2O contendo 15 % de metanol. Um controle foi obtido imediatamente após a mistura do W com o DMNO_2 . Após cada tempo de incubação, as amostras foram diluídas 10 vezes e 30 μl foram injetados no HPLC ou no HPLC/MS/MS. A fase móvel utilizada foi ácido fórmico e acetonitrila, utilizando um gradiente que iniciou com 4 % de acetonitrila, mantendo isocrático até 18 minutos, subindo para 40 % em 21 minutos, mantendo esta concentração por mais 1 minuto, e depois subindo para 60 % em um minuto. Esta concentração de acetonitrila foi mantida até 40 minutos, depois a concentração foi alterada para 4 % em 2 minutos e finalmente foi mantida por mais 4 minutos para a estabilização da coluna, totalizando 48 minutos de corrida. As condições utilizadas no espectrômetro de massa foram as mesmas descritas no item 3.7.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da formação dos fotoprodutos do triptofano (W)

Após 3 horas de fotossensibilização, os produtos de reação foram analisados por HPLC com detecção por UV-Vis e MS. A separação dos fotoprodutos deu origem a dois picos de produtos com tempos de retenção de 8,3 e 10,7 minutos, juntamente com um pico do W em 23 minutos (Figura 4.1). Os espectros UV-Vis destes fotoprodutos mostram os mesmos máximos de absorção em 234 e 296 nm. Da mesma maneira, os espectros de massa destes compostos são idênticos, apresentando um íon molecular de m/z 237, consistente com a adição de dois átomos de oxigênio na molécula do W. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios que reportam dois hidroperóxidos isômeros (WOOH) como sendo os principais produtos de oxidação do W (Saito *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981).

Figura 4.1. Análise por HPLC-ESI/MS obtida após 3 h de fotossensibilização do W. (A) Cromatograma com detecção UV-Vis ($\lambda = 215$ nm). (B) Espectro de massa do pico de produto que elui em 8,3 minutos. (C) Espectro de massa do pico de produto que elui em 10,7 minutos. Os gráficos inseridos na figura correspondem respectivamente ao espectro UV-Vis de cada foto-produto.

4.2 Redução dos foto-produtos formados

A incubação da solução contendo os foto-produtos com NaBH_4 por 1 h a 4 °C levou a uma completa perda dos picos de produtos com tempos de retenção de 8,3 e 10,7 minutos, juntamente com o aparecimento de dois novos picos de produtos com tempos de retenção de 5,9 e 7,5 minutos (Figura 4.2). Estes dois novos produtos possuem espectros U V-Vis (com máximos de absorção em 235 e 292 nm) e espectros de massa (m/z 221) idênticos. Os espectros de massa destes novos compostos mostram a perda de um átomo de oxigênio quando comparados com os picos de produtos com tempos de retenção de 8,3 e 10,7 minutos (WOOH). Estes resultados são consistentes com a redução dos hidroperóxidos previamente formados (dois átomos de oxigênio a mais que o W) aos alcoóis correspondentes (WOH, um átomo de oxigênio a mais que o W).

Figura 4.2. Análise por HPLC-ESI/MS obtida após a incubação da solução contendo os foto-produtos com NaBH_4 por 1 h a 4 °C. (A) Cromatograma com detecção UV-Vis ($\lambda = 215$ nm). (B) Espectro de massa do pico de produto que elui em 5,9 minutos. (C) Espectro de massa do pico de produto que elui em 7,5 minutos. Os gráficos inseridos na figura correspondem respectivamente ao espectro UV-Vis de cada foto-produto.

4.3 Caracterização por marcação isotópica e HPLC/MS/MS dos foto-produtos formados

4.3.1 Análise da fragmentação dos WOOH por HPLC/MS/MS utilizando $^{18}\text{O}_2$

Com o intuito de se obter mais informações sobre a estrutura e fragmentação dos WOOH, estes foto-produtos foram sintetizados com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$, purificados por HPLC, através de uma coluna semipreparativa e analisados por HPLC/MS/MS. A Figura 4.3 mostra os espectros de massa obtidos para o hidroperóxido mais polar (tempo de retenção: 8,3 minutos). Conforme previamente demonstrado na Figura 4.1, quando o hidroperóxido é sintetizado com $^{16}\text{O}_2$ obtém-se o íon molecular ($[\text{M}+\text{H}]^+$) de m/z 237. Seleccionando-se os fragmentos do $\text{W}^{16}\text{O}^{16}\text{OH}$, obtém-se o íon de m/z 220, o qual representa a perda de OH, o íon de m/z 203, representando a perda de H_2O_2 e o íon de m/z 146, representando a perda de OH, e do grupo $\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. Estes dados foram confirmados com a análise do $\text{W}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$, que possui o íon molecular ($[\text{M}+\text{H}]^+$) m/z 241 (acréscimo de 4 unidades de massa, que corresponde a dois $^{18}\text{O}_2$). Seleccionando-se os fragmentos do íon de m/z 241 obtém-se o íon de m/z 222, o qual representa a perda de ^{18}OH , o íon m/z 203, representando a perda do grupo peróxido marcado e o íon m/z 148, representando a perda de ^{18}OH e do grupo $\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ (Figura 4.3). Os mesmos resultados foram obtidos quando o hidroperóxido menos polar (tempo de retenção: 10,7 minutos) foi analisado (Figura 4.4).

Figura 4.3. ESI/MS/MS do WOOH mais polar não marcado m/z 237 e isotopicamente marcado com $^{18}\text{O}_2$ m/z 241.

Figura 4.4. ESI/MS/MS do WOOH menos polar não marcado m/z 237 e isotopicamente marcado com $^{18}O_2$ m/z 241.

4.3.2 Análise da fragmentação dos WOH por HPLC/MS utilizando $^{18}O_2$

As Figuras 4.5 e 4.6 representam os espectros de MS/MS (marcados ou não) dos WOH (subprodutos resultantes da redução dos respectivos hidropéroxidos). Os espectros de massa dos picos de produtos não marcados apresentam um íon molecular de m/z 221, bem como a perda de uma molécula de água (m/z 203) e a perda do grupamento carboxila (m/z 175). Os dados obtidos por MS/MS dos $W^{18}OH$ confirmam estas atribuições, uma vez que demonstram um acréscimo de 2 unidades de massa (m/z 223) para o íon molecular. É interessante ressaltar que através da marcação isotópica pode-se perceber que a molécula perde água tanto da carboxila (não marcada, m/z 203) quanto do grupamento álcool (marcado, m/z 205).

Figura 4.5 ESI/MS/MS do WOH mais polar não marcado m/z 221 e isotopicamente marcado com $^{18}O_2$ m/z 223.

Figura 4.6. ESI/MS/MS do WOH menos polar não marcado m/z 221 e isotopicamente marcado com $^{18}\text{O}_2$ m/z 223.

4.4 Caracterização dos foto-produtos por RMN

4.4.1 Análise dos WOH por RMN (^1H ; COSY e HMBC)

Os dados obtidos com as técnicas de HPLC/UV-Vis, marcação isotópica e HPLC/MS/MS foram confirmados por estudos de RMN de cada foto-produto isolado. Desta forma, experimentos de RMN de ^1H , COSY e HMBC de cada WOH isolado (2-carboxi-3a-hidroxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol) são consistentes com as estruturas propostas e com a literatura (Nakagawa *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1981). Os resultados estão resumidos na Tabela 4.1. A estereoquímica de cada produto foi inferida por comparação com Nakagawa (Nakagawa *et al.*, 1977). Neste estudo, a estrutura do 3a-hidroxi-1,2-dimetoxicarbonil-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrólo[2,3-b]indol foi determinada por análises de raios X. Esta molécula é um éster carbamato análogo ao isômero do WOH mais polar e demonstrou que os grupos hidróxi e éster possuem a configuração *trans*. Após este experimento, com o intuito de confirmar a estereoquímica de cada WOH, o éster carbamato análogo foi submetido a uma hidrólise alcalina, resultando no álcool mais polar. Deste modo, este álcool foi designado como o *trans* 3a-hidroxi-hexahidropirróloindol. Por outro lado, o outro isômero foi identificado como o WOH com a configuração *cis*. Em nosso estudo, a configuração *trans*, considerando-se as posições do grupamento hidróxi em relação ao grupamento carboxila, foi atribuída ao álcool com a maior mobilidade nas análises de HPLC

(pico de produto eluente em 5,9 minutos, isômero mais polar). A configuração *cis* foi atribuída ao WOH com a menor mobilidade (pico de produto eluente em 7,5 minutos, isômero menos polar). Os espectros de RMN de ^1H , COSY e HMBC de cada WOH isolado estão demonstrados nos Apêndices A (WOH *trans*) e B (WOH *cis*).

Tabela 4.1 Resumo das análises dos WOH *trans* e *cis* por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Posição	WOH <i>trans</i>				WOH <i>cis</i>			
	^1H			^{13}C	^1H			^{13}C
	δ^a	Mult. ^b	J_{xy}^c	δ	δ	Mult.	J_{xy}	δ
2	4,40	dd	$J_{23'} = 6,1$ $J_{23''} = 7,9$	60,75	3,95	dd	$J_{23} = 12,0$ $J_{23} = 6,3$	59,81
3	2,90	m	--	39,87	2,63	dd	$J_{33} = 13,3$ $J_{32} = 12,0$	41,05
					2,96	dd	$J_{33} = 13,3$ $J_{32} = 6,3$	
3a	--	--	--	87,26	--	--	--	87,49
4	7,42	d	$J_{45} = 7,5$	124,09	7,49	d	$J_{45} = 7,6$	124,09
5	7,00	t	$J_{54,56} = 7,5$	121,27	7,05	t	$J_{54,56} = 7,5$	120,80
6	7,34	t	$J_{65,67} = 7,7$	131,12	7,37	t	$J_{65,67} = 7,7$	130,66
7	6,86	d	$J_{76} = 8,0$	111,46	6,90	d	$J_{76} = 8,0$	110,95
8a	5,38	s	--	84,21	5,49	s	--	82,80
9	---	--	--	129,01	--	--	--	128,78
10	--	--	--	148,25	--	--	--	148,48
11	--	--	--	172,41	--	--	--	172,88
Estrutura

^a δ = deslocamento químico, em ppm. ^b Mult. = multiplicidade do sinal. ^c J_{xy} = constante de acoplamento entre os prótons x e y, em Hz.

4.4.2 Análise dos WOOH por RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR)

Os hidroperóxidos (2-carboxi-3a-hidroperoxi-1,2,3,3a,8,8a-hexahidropirrol[2,3-b]indol também foram caracterizados por experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HETCORR (Tabela 4.2). Os dados são consistentes com as estruturas propostas e com a literatura (Nakagawa *et al.*, 1981). As atribuições estereoquímicas para cada hidroperóxido

isolado foram estabelecidas por comparação com os WOH previamente identificados, uma vez que cada WOOH foi reduzido por NaBH_4 ao seu álcool correspondente. Desta forma, ao hidroperóxido com a maior mobilidade nos experimentos de HPLC (pico de produto que elui em 8,3 minutos, isômero mais polar) foi designada a configuração *trans* considerando-se as posições do grupamento hidroperoxi em relação ao grupamento carboxila. Esta conclusão foi tomada baseada na redução deste isômero ao WOH que elui em 5,9 minutos, previamente identificado como o isômero de configuração *trans*. Similarmente, ao WOOH que apresenta tempo de retenção de 10,7 minutos nas análises de HPLC, foi atribuída a configuração *cis*, uma vez que ele foi reduzido ao álcool que elui em 7,5 minutos, previamente identificado como o isômero de configuração *cis*. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY e HETCORR de cada WOOH isolado estão demonstrados nos Apêndices C (WOOH *trans*) e D (WOOH *cis*).

Tabela 4.2 Resumo das análises dos WOOH *trans* e *cis* por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Posição	WOOH <i>trans</i>				WOOH <i>cis</i>			
	^1H			^{13}C	^1H			^{13}C
	δ^a	Mult. ^b	J_{xy}^c		δ	Mult.	J_{xy}	
2	4,24	t	$J_{23} = 7,8$	59,65	3,89	t	$J_{23} = 8,4$	59,00
3	2,89	dd	$J_{33} = 14,3$ $J_{32} = 8,1$	35,84	2,62	d	$J_{32} = 8,4$	37,06
	2,52	dd	$J_{33} = 14,3$ $J_{32} = 7,6$					
3a	--	--	--	97,80	--	--	--	98,51
4	7,23	d	$J_{45} = 7,6$	124,50	7,28	d	$J_{45} = 7,6$	124,41
5	6,82	t	$J_{54,56} = 7,5$	120,71	6,85	t	$J_{54,56} = 7,5$	120,69
6	7,18	t	$J_{65,67} = 7,5$	131,63	7,20	t	$J_{65,67} = 7,7$	131,59
7	6,68	d	$J_{76} = 8,0$	111,28	6,71	d	$J_{76} = 8,0$	110,73
8a	5,48	s	--	79,59	5,60	s	--	79,28
9	--	--	--	124,74	--	--	--	124,84
10	--	--	--	149,44	--	--	--	149,73
11	--	--	--	171,96	--	--	--	172,56
Estruturas

^a δ = deslocamento químico, em ppm; ^b Mult. = multiplicidade do sinal; ^c J_{xy} = constante de acoplamento entre os prótons x e y, em Hz.

4.5 Avaliação da estabilidade dos WOOH

4.5.1 Avaliação da estabilidade térmica dos WOOH

Uma vez que os maiores foto-produtos da oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$ foram completamente caracterizados como dois hidroperóxidos isômeros, este trabalho passou a enfocar a estabilidade e os produtos de decomposição deste hidroperóxidos. Desta maneira, como indicado pelo ensaio do alaranjado de xilenol, pode-se perceber que os dois hidroperóxidos são relativamente estáveis quando mantidos a 4, 25, ou 37 °C por até 8 h de incubação (Figuras 4.7 e 4.8 A, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*). Estes resultados foram confirmados através de análises de HPLC desta incubações. Desta forma, como visualizado nas Figuras 4.7 e 4.8 B, pode-se confirmar que após 4 h de incubação, tanto o WOOH *trans* como o WOOH *cis* não apresentaram uma decomposição significativa.

Figura 4.7 Degradação na dependência do tempo do WOOH. *trans* em diferentes temperaturas. (A) Porcentagem de peróxidos remanescentes após a incubação do WOOH *trans* (3 mM) no decorrer do tempo e em três diferentes temperaturas: a 4°C (♦), a 25 °C (■) e a 37° C (▲), por até 8 h. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Análises por HPLC imediatamente após a solubilização (controle) e após a incubação do WOOH *trans* por 4 h a 4, 25 ou 37 °C.

Figura 4.8 Degradação na dependência do tempo do WOOH. *cis* em diferentes temperaturas. (A) Porcentagem de peróxidos remanescentes após a incubação do WOOH *cis* (3 mM) no decorrer do tempo e em três diferentes temperaturas: a 4°C (♦), a 25 °C (■) e a 37° C (▲), por até 8 h. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Análises por HPLC imediatamente após a solubilização (controle) e após a incubação do WOOH *cis* por 4 h a 4, 25 ou 37 °C.

4.5.2 Avaliação da decomposição dos WOOH por metais

Além da estabilidade térmica, a reatividade dos WOOH também foi investigada frente a dois metais importantes em meio biológico: Cu(II), um agente oxidante e Fe(II), um agente redutor. Desta forma, as Figuras 4.9 e 4.10 A representam, respectivamente, a dosagem dos isômeros *trans* e *cis* dos WOOH em solução, através da técnica do alaranjado de xilenol, após a incubação destes hidropéroxidos a 37 °C, por diferentes tempos, na presença de 100 μ M de Cu(II) ou Fe(II). Surpreendentemente, a incubação de ambos os hidropéroxidos por até 8 h com Cu(II) não levou a uma diminuição expressiva na quantidade dos mesmos, mostrando uma diminuição de aproximadamente 35 % para ambos os isômeros após 8 h de incubação. Os produtos de decomposição seguidos por análises de HPLC foram identificados como os álcoois correspondentes a cada WOOH (Figuras 4.9 e 4.10 B, respectivamente, para os isômeros *trans* e *cis* dos WOOH). Diferentemente dos íons Cu(II), os íons Fe(II) reagem mais rapidamente com os dois WOOH, entretanto, com diferentes velocidades de reação. O WOOH *trans* foi rapidamente degradado, sendo que após 30 minutos de incubação com Fe(II), restavam apenas 40 % do hidropéroxido, e após 4 h restavam apenas 0,4 % do mesmo. O WOOH *cis* mostrou-se mais resistente à degradação pelo Fe(II), sendo que após 30 minutos de incubação, restavam ainda 66 % do hidropéroxido. Esta porcentagem caiu para 46 % após

4 h de incubação, e o WOOH *cis* só foi completamente consumido após 24 h de incubação (dados não mostrados). Estes resultados foram confirmados por análises de HPLC, uma vez que após 4 h de incubação com Fe(II), o pico de produto correspondente ao WOOH *trans* desapareceu completamente, enquanto o pico de produto correspondente ao WOOH *cis* ainda podia ser visualizado (Figuras 4.9 e 4.10 B). Da mesma forma que a reação com íons Cu(II), a reação com íons Fe(II) também gera os álcoois correspondentes como principais subprodutos.

Cabe ressaltar que apesar dos hidroperóxidos apresentarem reatividades diferentes frente ao Fe(II), sendo o WOOH *trans* muito mais susceptível a degradação que o WOOH *cis*, ambos são muito mais reativos frente ao Fe(II) do que ao Cu(II), que parece exercer pouco efeito sobre ambos hidroperóxidos. Apesar do comportamento distinto em relação à velocidade das reações, ambos os WOOH apresentaram os WOH correspondentes como principais produtos de decomposição.

Figura 4.9 Decomposição do WOOH *trans* por metais a 37 °C. (A) Porcentagem de peróxidos remanescentes após a incubação do WOOH *trans* (3 mM) (♦, reação controle) ou na presença de 100 µM de Cu(II) (■) ou Fe(II) (▲). Os resultados representam a média ± SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Análises por HPLC após a incubação do WOOH *trans* por 4 h sozinho ou na presença de 100 µM de Cu(II) ou Fe(II).

Figura 4.10 Decomposição do WOOH *cis* por metais a 37 °C. (A) Porcentagem de peróxidos remanescentes após a incubação do WOOH *cis* (3 mM) (♦, reação controle) ou na presença de 100 µM de Cu(II) (■) ou Fe(II) (▲). Os resultados representam a média ± SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Análises por HPLC após a incubação do WOOH *cis* por 4 h sozinho ou na presença de 100 µM de Cu(II) ou Fe(II).

4.5.3 Avaliação da estabilidade dos WOOH em diferentes pHs

Analizando-se as Figuras 4.11 e 4.12 A, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*, pode-se perceber que os hidropéroxidos sofrem degradação dependente do pH da solução. Assim, quando os hidropéroxidos foram incubados por diferentes tempos em pH 5,5 (tampão acetato), não há uma diminuição significativa na quantidade dos mesmos, por um período de até 6 h. Entretanto, com o aumento do pH para 7,4 (tampão tris) percebe-se que no decorrer do tempo a quantidade dos WOOH vai diminuindo, chegando próxima de 10 e 25%, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*, após 6 h de incubação. Aumentando-se o pH das reações para 8,5 (tampão tris) percebemos que a degradação é ainda mais acelerada, diminuindo a porcentagem do WOOH inicial a cerca de 2 e 12 %, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*, após 6 h de incubação. Os resultados obtidos pelas análises de HPLC confirmam aqueles obtidos pela técnica do alaranjado de xilenol e estão representados nas Figuras 4.11 e 4.12 B, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*. Percebe-se que se aumentando o pH das reações, os picos correspondentes aos WOOH diminuem consideravelmente. Um resultado interessante é que diferentemente das incubações a 37 °C ou na presença de metais, onde se observa o surgimento dos álcoois correspondentes aos WOOH, as incubações feitas em pH 7,4 ou 8,5 levaram ao aparecimento de um novo pico de produto

com tempo de retenção de 11 minutos. Este pico de produto foi completamente caracterizado por análises de UV-Vis, HPLC/MS/MS e RMN como a FMK, um conhecido produto de oxidação do W sob uma variedade de condições oxidativas (Savige, 1975). A Figura 4.13 apresenta um resumo das análises realizadas; o espectro de RMN de ^1H está demonstrado no Apêndice E. Também é possível obter-se FMK submetendo-se os WOOH a um aquecimento, principalmente a temperaturas maiores que 50°C (dados não mostrados).

Figura 4.11 Degradação na dependência do tempo após incubação do WOOH *trans* (3 mM) em diferentes pHs a 37°C . (A) Detecção de peróxidos pela técnica do alaranjado de xilenol. (◆) Incubação do WOOH *trans* em tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,5. (■) Incubação do WOOH *trans* em tampão tris 25 mM pH 7,4. (▲) Incubação do WOOH *trans* em tampão tris 25 mM pH 8,5. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Cromatogramas após incubação por 4 h do WOOH *trans* (3 mM) em pH 5,5, 7,4 ou 8,5.

Figura 4.12 Degradação na dependência do tempo após incubação do WOOH *cis* (3 mM) em diferentes pHs a 37°C . (A) Detecção de peróxidos pela técnica do alaranjado de xilenol. (◆) Incubação do WOOH *cis* em tampão acetato de sódio 25 mM pH 5,5. (■) Incubação do WOOH *cis* em tampão tris 25 mM pH 7,4. (▲) Incubação do WOOH *cis* em tampão tris 25 mM pH 8,5. Os resultados representam a média $\pm$ SD de pelo menos três determinações independentes. (B) Cromatogramas após incubação por 4 h do WOOH *cis* (3 mM) em pH 5,5, 7,4 ou 8,5.

Figura 4.13 Caracterização da FMK. (A) Espectro de massa obtido no modo de ionização positivo. (B) Espectro de UV-Vis. (C) Deslocamentos químicos de ^1H obtidos em D_2O .

4.6 Espectrometria de massa e marcação isotópica como ferramentas para caracterizar a FMK e suas fragmentações

Primariamente, a molécula de FMK foi sintetizada com dois átomos de ^{16}O (m/z esperado, 237), e para comparar e elucidar os mecanismos de fragmentação, com dois átomos de ^{18}O (m/z esperado, 241). Entretanto, ao analisarmos o espectro de massa da molécula de FMK sintetizada com dois ^{18}O , visualizamos uma quantidade muito maior da FMK contendo apenas um átomo de ^{18}O (m/z 239), e até mesmo uma porção da molécula sem nenhum átomo de ^{18}O (m/z 237). Por se tratar de uma molécula que possui as funções orgânicas de cetona e amida, a FMK pode trocar estes átomos de ^{18}O com a água do meio, como será discutido posteriormente na seção 4.7.1. Ao visualizarmos este comportamento de trocas da molécula, outro experimento foi realizado: uma FMK sintetizada com os dois átomos de ^{16}O foi incubada na presença de H_2^{18}O . O intuito deste experimento foi avaliar se as porções carbonila e amida tinham a mesma susceptibilidade para a troca de oxigênio com a água ou se uma porção era mais suscetível que outra. Conforme esperado, neste caso há a inversão de alguns fragmentos marcados em relação à FMK sintetizada com um ^{18}O . Os fragmentos protonados da molécula de FMK sintetizada com dois átomos de oxigênio 16, com dois átomos de oxigênio 18, que posteriormente trocou um destes átomos com a H_2^{16}O do meio e

os fragmentos protonados da FMK sintetizada com dois átomos de oxigênio 16, que posteriormente trocou um destes átomos com a H_2^{18}O em que foi solubilizada estão representados na Figura 4.14, respectivamente nas letras A, B e C.

Figura 4.14. Espectro de massa monitorando os fragmentos protonados da FMK. (A) Fragmentos protonados da FMK sintetizada com dois átomos de oxigênio 16. (B) Fragmentos protonados da FMK sintetizada com dois átomos de oxigênio 18, que posteriormente trocou um destes átomos com a H_2^{16}O do meio. (C) Fragmentos protonados da FMK sintetizada com dois átomos de oxigênio 16, que posteriormente trocou um destes átomos com a H_2^{18}O em que foi solubilizada.

As fragmentações da FMK não marcada (m/z 237) e isotopicamente marcada com um átomo de ^{18}O , m/z 239, estão resumidas na Figura 4.15.

Figura 4.15 Fragmentações da FMK.

Uma das fragmentações da molécula de FMK é a perda de NH_3 . Esta perda pode ocorrer segundo duas vias de dissociação, produzindo fragmentos de m/z 222 no caso da FMK marcada com um átomo de ^{18}O , ou 220 para a molécula de FMK não marcada. A Figura 4.16 traz as fragmentações para a molécula de FMK marcada. Estas duas vias foram primeiramente propostas por Vazquez e colaboradores (Vazquez et al., 2001) para a molécula de kn, baseados no perfil de desaminação desta molécula deuterada. Após a desaminação, o fragmento protonado de m/z 222 (ou 220 para a molécula não marcada) perde uma molécula de água e posteriormente CO , produzindo os fragmentos de m/z 204 (202) e 176 (174). Estas etapas de fragmentação estão de acordo com a manutenção dos fragmentos isotopicamente marcados e corroboram àquelas propostas para a molécula de kn. Entretanto, no caso da molécula de FMK, que possui uma fórmula a mais em sua estrutura quando comparada à kn, o fragmento protonado de m/z 222 (220) também perde uma molécula de CO , e os experimentos envolvendo marcação isotópica mostram que o fragmento perdido é marcado (produz um fragmento ionizado resultante de m/z 192 tanto para a FMK marcada como para a

não marcada). Estes dados demonstram que esta perda refere-se à formila, e que esta é a porção isotopicamente marcada da molécula. De maneira análoga ao fragmento protonado de m/z 222, este fragmento também sofre perdas sucessivas de H_2O e CO , gerando respectivamente os fragmentos protonados de m/z 174 e 146.

Para confirmar que é a porção formila que está marcada com o átomo de ^{18}O , analisamos os espectros de massa da FMK com os dois átomos de ^{16}O incubada na presença de $H_2^{18}O$ (Figura 4.14 C). Neste caso, o resultado esperado é exatamente o oposto: se a carbonila é mais suscetível a troca, espera-se que ela tenha trocado seu átomo de ^{16}O com a $H_2^{18}O$. Por outro lado, a formila deve permanecer majoritariamente não marcada. Os resultados dos experimentos confirmam estas suposições, uma vez que a perda de $NH_3 + CO$ gera um fragmento protonado de m/z 194, mostrando que agora é a carbonila que esta marcada e confirmando que esta porção da molécula é mais suscetível a trocas de oxigênio com a água. Este comportamento pode ser explicado pela sensibilidade das cetonas à adição nucleofílica (a qual é reversível, sendo que o resultado global depende da posição de um equilíbrio), enquanto que as amidas são estabilizadas por ressonância entre o átomo de oxigênio e o de nitrogênio. Na Figura 4.16 estão representadas as propostas de fragmentação da FMK.

Figura 4.16. Vias prováveis de fragmentação da FMK.

Além destas vias, minoritariamente, o íon molecular também perde um CO. Tanto a molécula de FMK marcada quanto a não marcada geram um fragmento protonado de m/z 209, demonstrando que neste caso, ocorre primariamente a perda da formila marcada da molécula. Após este passo também ocorrem perdas sucessivas de NH_3 (m/z 192), CO (174) e H_2O (146) (Figuras 4.14 A e B e 4.15). Por outro lado, a FMK com os dois átomos de ^{16}O incubada na presença de H_2^{18}O gera um fragmento de m/z 211, neste caso resultante da perda da formila não marcada da molécula (Figuras 4.14 C e 4.15).

Também é possível visualizar a formação do íon protonado de m/z 164 ou 166, para a FMK isotopicamente marcada (Figura 4.17). A formação deste íon pode ser explicada pela formação de um complexo do íon molecular eletrostaticamente ligado. Posteriormente, este íon perde uma glicina na forma de imina. Uma fragmentação análoga também foi proposta para a molécula de kn (Vazquez *et al.*, 2001). Após a formação do íon de m/z 164 (166, no caso do isotopicamente marcado), pode ocorrer a perda de C^{18}O , levando ao íon de m/z 136.

Estes dados são corroborados pela fragmentação da molécula de FMK sintetizada com dois átomos de [^{16}O] que foi incubada com H_2^{18}O , uma vez que neste caso, o fragmento resultante da perda de CO ainda conserva o átomo de [^{18}O], m/z 138 (Figura 4.14 C).

Figura 4.17. Proposta de fragmentação da FMK através da formação de um complexo de carga.

4.7 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK

Com o intuito de investigar o mecanismo da decomposição do WOOH à FMK, duas estratégias foram utilizadas: i) experimentos envolvendo marcação isotópica da FMK, a fim de identificar a origem dos átomos de oxigênio desta molécula; ii) experimentos para se detectar um possível intermediário dioxetano.

4.7.1 Experimentos envolvendo marcação isotópica da FMK

O primeiro experimento envolvendo marcação isotópica foi a incubação dos $\text{W}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ *trans* e *cis* isolados em tampão tris pH 8,5 por até 3h. Aliquotas foram retiradas a cada 30 min e analisadas por HPLC/MS/MS para avaliar a decomposição dos hidroperóxidos marcados à FMK. Se os átomos de oxigênio dos grupamentos carbonila e amida fossem derivados dos hidroperóxidos marcados, os espectros de massa deveriam apresentar íons

moleculares de m/z 241, mostrando um acréscimo de 4 unidades de massa em relação à FMK não marcada (m/z 237). Entretanto, os espectros de massa destes experimentos revelam razões massa/carga de 237 e 239, que respectivamente correspondem a nenhum e dois acréscimos de unidades de massa. Um exemplo deste comportamento está demonstrado na Figura 4.18 A e B, onde estão demonstrados respectivamente os espectros de massa da incubação do $W^{18}O^{18}OH$ *trans* e *cis* com tampão tris 25 mM (pH 8,5) por 30 minutos.

Figura 4.18 ESI/MS da FMK gerada na incubação dos $W^{18}O^{18}OH$ em tampão tris por 30 minutos. A) incubação de WOOH *trans* (1,5 mM) em tampão tris 25 mM (pH 8.5) por 30 minutos. B) incubação de WOOH *cis* (1,5 mM) em tampão tris 25 mM (pH 8.5) por 30 minutos.

Estes resultados sugerem que não ocorreu a incorporação de átomos de oxigênio marcados na molécula de FMK, ou, que no máximo, apenas um átomo de oxigênio marcado foi incorporado. Contudo, muitos autores têm reportado que compostos contendo átomos de oxigênio podem apresentar um alto nível de trocas de átomos de oxigênio em água (Cohn e Urey, 1938; Bender e Thomas, 1961; Almeida *et al.*, 2003). Desta forma, tornou-se importante avaliar se a FMK presente em nossas reações é formada com os dois átomos de $[^{18}O]$ e posteriormente troca estes átomos com a água, ou se o solvente participa no mecanismo de formação desta molécula.

Com o intuito de confirmar as trocas da FMK com a água, uma FMK sintetizada com os dois átomos de $[^{16}\text{O}]$ foi incubada na presença de H_2^{18}O . Como se pode perceber pela Figura 4.19, inicialmente a amostra contém apenas a FMK contendo dois átomos de $[^{16}\text{O}]$ (m/z 237, letra A). Entretanto, pode-se perceber um aumento gradativo na razão de m/z 239 após 2 e 4 h de incubação (respectivamente letras B e C). Este resultado está melhor representado na forma da Figura 4.20, onde foram quantificadas as áreas relativas dos picos de produtos com m/z 237, 239 e 241 (respectivamente para FMK não marcada, marcada com um ou dois átomos de $[^{18}\text{O}]$). Nesta figura, visualiza-se outro dado importante: um discreto aumento na área relativa do pico de produto com m/z 241. Estes dados demonstram que a FMK é capaz de trocar dois átomos de oxigênio com a água, entretanto com velocidades de troca diferentes.

Figura 4.19 ESI/MS da FMK não marcada. (A) reação controle, MS imediatamente após diluição da FMK não marcada em H_2^{18}O . (B) MS após incubação da FMK não marcada em H_2^{18}O por 2 h a temperatura ambiente. (C) MS após incubação da FMK não marcada em H_2^{18}O por 4 h a temperatura ambiente.

Figura 4.20 Quantificação das áreas dos picos de produtos com m/z 237, 239 e 241 após incubação por diferentes tempos da FMK não marcada com $H_2^{18}O$. Os produtos de decomposição foram quantificados por HPLC/MS/MS usando o modo MRM. As transições usadas no modo MRM foram 237 para 220 para a FMK não marcada; 239 para 222 e 241 para 224, respectivamente para a FMK marcada com um ou dois átomos de $[^{18}O]$.

Tentando evitar as trocas ocorridas entre a FMK e a água, os $W^{18}O^{18}OH$ foram solubilizados em etanol seco e submetidos a aquecimento a 70 °C. Imediatamente após a solubilização ($t = 0$, controle) ou após 5 e 30 minutos de incubação, o conteúdo de FMK marcada (com um ou dois átomos de oxigênio, m/z 239 e 241, respectivamente) e não marcada (m/z 237) foi quantificado por HPLC/MS/MS usando o modo MRM e W como padrão interno. A FMK é relativamente estável em água. Contudo, quando em etanol, e sobre aquecimento, sofre solvólise para quinurenina (kn). Desta forma, não foi possível visualizar um aumento linear do conteúdo de FMK no decorrer do tempo, uma vez que o conteúdo de FMK detectado em um tempo específico é um balanço entre a FMK gerada na decomposição do WOOH e a consumida para gerar kn. Em contraste, a quantificação de kn mostra um aumento linear na quantidade desta molécula em até 30 minutos de incubação (Figura 4.21). Apesar da instabilidade da FMK em etanol, ainda é válido procurar pela molécula contendo os dois átomos de oxigênio marcado (m/z 241), uma vez que um aumento na quantidade de FMK com esta razão m/z no decorrer da reação é uma evidência inequívoca do envolvimento

dos dois átomos de oxigênio dos hidroperóxidos no mecanismo de decomposição. Deste modo, imediatamente após a solubilização dos $W^{18}O^{18}OH$, (0 h) já é possível visualizar FMK marcada e não marcada (Figura 4.21). Este conteúdo de FMK deriva do processo de purificação dos $W^{18}O^{18}OH$. Contudo, analisando a Figura 4.22 A (decomposição do isômero *trans*) e B (decomposição do isômero *cis*) é possível confirmar que a quantidade de FMK com marcação nos dois átomos de oxigênio (m/z 241) aumenta para as incubações de ambos os $W^{18}O^{18}OH$.

Figura 4.21 Quantificação dos produtos de decomposição gerados pela incubação dos $W^{18}O^{18}OH$ *trans* (425 μM) e *cis* (295 μM) a 70 °C em etanol seco por 30 minutos. Os produtos de decomposição foram quantificados por HPLC/MS/MS usando o modo MRM e W (100 μM) como padrão interno. As linhas pretas correspondem a FMK (♦) e as linhas cinza correspondem a kn (■). Os resultados foram expressos como uma razão entre a quantidade formada do produto de decomposição (FMK or kn) e a quantidade do padrão interno (W). As transições usadas no modo MRM foram 237 para 220 para a FMK não marcada; 239 para 222 e 241 para 224, respectivamente para a FMK marcada com um ou dois átomos de oxigênio; 211 para 194 para a kn; e 205 para 188 para o padrão interno (W). A quantidade total de FMK foi calculada somando-se as áreas das três transições no modo.

Figura 4.22 *N*-Formilquinurenina gerada na incubação dos $W^{18}O^{18}OH$ *trans* (425 μ M) e *cis* (295 μ M) a 70 °C em etanol seco por 30 minutos. A FMK foi quantificada por HPLC/MS/MS usando o modo MRM e W (100 μ M) como padrão interno. Os resultados foram expressos como uma razão entre a quantidade de FMK formada e a quantidade do padrão interno (W). As transições usadas no modo MRM foram 237 para 220 para a FMK não marcada; 239 para 222 e 241 para 224, respectivamente para a FMK marcada com um ou dois átomos de oxigênio; e 205 para 188 para o padrão interno (W).

4.7.2 Estudos envolvendo quimiluminescência dos WOOH

Um dos mecanismos propostos para a conversão dos WOOH à FMK seria via um intermediário dioxetano, que ao decompor-se geraria carbonilas excitadas. Quando estas carbonilas retornam ao estado fundamental, emitiriam luz. Desta forma, uma solução contendo a mistura dos isômeros dos WOOH (concentração final de WOOH na cubeta: 3 mM) foi aquecida a 70 °C. A Figura 4.23 traz o resultado deste experimento, onde se percebe que ao passar do tempo, a intensidade de luz vai aumentando, sugerindo que a conversão térmica dos WOOH à FMK é uma reação quimiluminescente.

Figura 4.23 Monitoramento da emissão de luz durante o aquecimento de uma mistura dos isômeros dos WOOH (3 mM) por 16 minutos a 70 °C. A fenda da fotomultiplicadora foi aberta após 1 minuto de monitoramento.

Conforme previamente observado, além do aquecimento, o aumento do pH também favorece a conversão dos WOOH à FMK. Para avaliar-se a emissão de luz neste caso, uma solução de NaOH (Concentração final na cubeta, 20 mM) foi injetada na mistura contendo os dois isômeros dos WOOH (concentração final de WOOH na cubeta: 3 mM, pH final 10). O resultado está demonstrado na Figura 4.24 A. No experimento controle, substituiu-se a solução de NaOH por água (Figura 4.24 B). Conforme observado, imediatamente após a injeção de base há um aumento na emissão de luz, demonstrando que a reação é quimiluminescente. Contrariamente, nenhuma emissão de luz ocorreu após a injeção de água.

Figura 4.24 Monitoramento da emissão de luz de uma mistura dos isômeros dos WOOH (3 mM, pH final, 10) a 37 °C. A fenda da fotomultiplicadora foi aberta após 1 minuto e fechada após 4 minutos. (A) após 2 minutos, injeção de NaOH (concentração final, 20 mM); (B) reação controle, injeção de água.

Além de realizar as reações em água, a intensidade de luz também foi avaliada usando solventes orgânicos, mas agora a quimiluminescência foi avaliada para cada WOOH isolado. Desta forma, os WOOH (*trans* ou *cis*) foram solubilizados em uma mistura DMSO: etanol (2:6). Cada reação foi conduzida a 37 °C, injetando-se NaOH (concentração final na cubeta, 2,5 mM) ao hidroperóxido (*trans* ou *cis*, concentração final 1,5 mM, em etanol, Figura 4.25). Uma reação controle foi realizada substituindo-se os WOOH por W (1,5 mM, solubilizado em uma mistura DMSO: etanol (2:6), Figura 4.25). Pode-se perceber que a intensidade de luz

gerada em solvente orgânico foi muito maior que em água. Além disso, a intensidade de luz gerada pelo WOOH *cis* foi muito maior do que a gerada pelo WOOH *trans*.

Figura 4.25 Monitoramento da emissão de luz dos isômeros dos WOOH em etanol (1,5 mM) a 37 °C. A fenda da fotomultiplicadora foi aberta após 1 minuto e fechada após aproximadamente 4 minutos. Após 2 minutos, foi injetada uma solução de NaOH (concentração final, 2,5 mM).

4.7.2.1 Determinação da velocidade inicial de conversão de cada WOOH à FMK

Uma vez que a intensidade de quimiluminescência gerada na decomposição do isômero *trans* diferiu substancialmente daquela encontrada para o isômero *cis*, a velocidade inicial (V_0) da conversão de cada isômero à FMK foi determinada. Os resultados estão dispostos nas Figuras 4.26 e 4.27 A, respectivamente para os isômeros *trans* e *cis*. O comprimento de onda de 340 nm foi escolhido para monitorar o aparecimento da FMK, uma vez que os WOOH praticamente não absorvem neste comprimento, e, portanto, não interferem nesta região. Nas Figuras 4.26 e 4.27 B, é possível comparar os espectros de absorção inicial e final respectivamente para a decomposição dos isômeros *trans* e *cis*. Inicialmente, ambos os espectros apresentam as características de absorção dos WOOH, com

máximos em 234 e 296 nm. Por outro lado, os espectros de absorção obtidos ao final do experimento apresentam picos de absorção característicos da FMK, com máximos em 260 e 320 nm. A parte delimitada por linhas pontilhadas foi selecionada para a determinação da V_0 .

Figura 4.26 Determinação da velocidade inicial da decomposição do WOOH *trans* (200 μ M) à FMK a 37 °C e pH 7,4. (A) Monitoramento da formação de FMK através da absorbância em 340 nm pelo tempo. A parte delimitada por linhas pontilhadas foi selecionada para a determinação da V_0 . (B) Espectros de absorção inicial e final da decomposição do WOOH *trans* à FMK.

Figura 4.27 Determinação da velocidade inicial da decomposição do WOOH *cis* (200 μ M) à FMK a 37 °C e pH 7,4. (A) Monitoramento da formação de FMK através da absorbância em 340 nm pelo tempo. A parte delimitada por linhas pontilhadas foi selecionada para a determinação da V_0 . (B) Espectros de absorção inicial e final da decomposição do WOOH *cis* à FMK.

Os experimentos também foram monitorados por HPLC, já que este método avalia o aparecimento de algum subproduto que possa interferir na absorção, e por consequência, na determinação da velocidade inicial. Os resultados obtidos comprovam a diminuição dos picos correspondentes aos WOOH concomitantemente com o aparecimento do pico correspondente à FMK. Cabe ressaltar que, para a decomposição de ambos os isômeros, não há o

aparecimento de nenhum outro subproduto que afete significativamente a determinação da velocidade inicial (Figuras 4.28 e 4.29, respectivamente para os isômeros *trans* e *cis*).

Figura 4.28 Cromatogramas obtidos a 215 nm da decomposição do WOOH *trans* à FMK.

Figura 4.29 Cromatogramas obtidos a 215 nm da decomposição do WOOH *cis* à FMK.

Utilizando-se a parte delimitada por linhas pontilhadas das Figuras 4.26 (WOOH *trans*) e 4.27 (WOOH *cis*), ou seja, a parte linear de cada decomposição, a V_0 foi determinada. Os valores encontrados foram 28 ± 3 e 26 ± 5 $\mu\text{mol/s}$, respectivamente para os WOOH *trans* e *cis*, o que mostra que não há diferença significativa na velocidade de decomposição à FMK para os dois isômeros.

4.7.2.2 Determinação da natureza da espécie excitada

Uma vez que a luminescência foi muito maior em solvente orgânico que em solvente aquoso, decidiu-se avaliar a natureza da espécie excitada neste sistema, através do efeito de aceptores fluorescentes. Os aceptores utilizados foram o DBA para avaliar a presença de carbonila triplete e o DPA, para avaliar a presença de carbonila singlete. Desta forma, os WOOH (*trans* ou *cis*) foram solubilizados em uma mistura DMSO: etanol (2:6) e a reação foi conduzida injetando-se 100 μ l de NaOH (25 mM) à solução contendo o hidroperóxido (concentração final 1,5 mM) e DBA ou DPA (concentração final 100 μ M). Os resultados estão demonstrados nas Figuras 4.30 e 4.31, respectivamente para o WOOH *trans* e WOOH *cis*. A temperatura utilizada foi 37 °C. Reações controle foram realizadas substituindo-se os WOOH por W (dados não mostrados). Percebe-se que não há aumento na luminescência de ambos os WOOH na presença de DBA ou DPA, Reações controle realizadas com W e W na presença de 100 μ M de DBA ou DPA não apresentaram luminescência (dados não mostrados).

Figura 4.30 Monitoramento da emissão de luz do WOOH *trans* em etanol (1,5 mM, volume final, 1 ml) a 37 °C. Os traçados foram deslocados para facilitar a visualização. Entretanto, para todas as reações a fenda da fotomultiplicadora foi aberta após 1 minuto e fechada após aproximadamente 4 minutos.

Figura 4.31 Monitoramento da emissão de luz do WOOH cis em etanol (1,5 mM, volume final, 1 ml) a 37 °C. Os traçados foram deslocados para facilitar a visualização. Entretanto, para todas as reações a fenda da fotomultiplicadora foi aberta após 1 minuto e fechada após aproximadamente 4 minutos.

4.7.3 Comparação entre a fluorescência da FMK e o espectro de quimiluminescência gerado na decomposição dos WOOH

Se assumirmos que a emissão de luz é derivada da FMK excitada gerada através da clivagem de um dioxetano, o espectro de quimiluminescência gerado na decomposição dos WOOH precisa ser equivalente ao espectro de fluorescência da FMK. Com este intuito, o espectro de fluorescência da FMK foi adquirido usando o comprimento de excitação de 320 nm. Paralelamente, os espectros de quimiluminescência obtidos durante a decomposição de cada WOOH foram obtidos usando filtros de corte. Os resultados estão demonstrados na Figura 4.32. O espectro de emissão da FMK mostra um pico largo com o máximo em 436 nm. Em adição, a decomposição dos WOOH *trans* e *cis* mostram o mesmo máximo próximo a 436 nm, juntamente com outra banda em aproximadamente 510 nm.

Figura 4.32 Comparação entre o espectro de fluorescência da FMK e os espectros de quimiluminescência obtidos pela decomposição de cada isômero de WOOH isolado. O espectro de fluorescência da FMK foi adquirido usando o comprimento de excitação de 320 nm. Os espectros de quimiluminescência obtidos durante a decomposição de cada WOOH foram obtidos usando filtros de corte.

4.8. Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$

4.8.1 Análise por HPLC/MS/MS e marcação isotópica

Analisando-se o cromatograma geral dos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$ (Figura 4.33), observam-se os picos de produtos previamente identificados (WOH *trans* e *cis* com tempos de retenção de 5,0 e 6,6 minutos; WOOH *trans* e *cis*, com tempos de retenção de 7,9 e 10,3 minutos e FMK com tempo de retenção de 12 minutos). Entretanto, outros 2 picos de produtos ainda não identificados, com tempos de retenção 5,4 e 6,0 também podem ser observados.

Figura 4.33 Análise por HPLC (detecção UV = 215 nm) dos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$.

Com o intuito de elucidar estruturalmente estes dois novos produtos, foram realizadas análises por HPLC/MS/MS incubando-se a mistura fotossensibilizada com NaBH_4 ou Fe(II) ; Além disso, estes fotoprodutos sintetizados com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$ foram purificados, liofilizados e analisados por HPLC/MS/MS e RMN. Desta forma, na Figura 4.34 A e B têm-se respectivamente, os cromatogramas da mistura fotossensibilizada com detecção UV em 215 nm e selecionando-se m/z 237. Pode-se perceber que os dois produtos desconhecidos (com tempos de retenção de 5,8 e 6,4 minutos) assinalados na Figura 4.34 como C e D possuem m/z de 237, tal como os WOOH (tempos de retenção de 8,3 e 10,6 minutos) e FMK (tempo de retenção de 12,1 minutos). Adicionalmente, ambos os produtos possuem espectro UV com máximos em 250 e 290 nm. Abaixo, estão demonstradas as fragmentações dos mesmos.

Figura 4.34 Cromatogramas com detecção UV = 215 nm (A) e selecionando-se m/z 237 (B) do W fotossensibilizado. (C) Espectro de massa do produto com tempo de retenção de 5,8. (D) Espectro de massa do produto com tempo de retenção de 6,4. Os gráficos inseridos na Figura correspondem aos espectros UV-Vis dos fotoprodutos C e D.

Uma investigação sobre as funções orgânicas dos produtos desconhecidos foi realizada após a constatação que estes produtos possuem o mesmo m/z que os WOOH (adição de dois átomos de oxigênio em relação ao W). Para isto, a mistura contendo os produtos da fotossensibilização do W foi incubada com Fe(II) ou NaBH₄. Na Figura 4.35 está demonstrado o resultado destas análises, onde um experimento controle contendo apenas a mistura fotossensibilizada foi injetado no HPLC/MS, monitorando-se em 215 nm (Figura 4.35 A) e selecionando-se m/z 237 (Figura 4.35 B). Conforme previamente demonstrado, pode-se visualizar os dois produtos desconhecidos (tempos de retenção 6,2 e 6,7) além dos WOOH *trans* e *cis* e FMK. Ao incubar-se a mistura fotossensibilizada com Fe(II), (Figura 4.35 C) observa-se o desaparecimento dos dois WOOH. Entretanto tanto FMK quanto os produtos desconhecidos não são reduzidos pelo Fe(II). Da mesma forma, os produtos desconhecidos não são reduzidos quando incubados com NaBH₄. Por outro lado, tanto os WOOH quanto a FMK desaparecem completamente (Figura 4.35 D).

Figura 4.35 Cromatogramas com detecção UV = 215 nm e selecionando-se m/z 237 da incubação da mistura fotossensibilizada. (A) Monitoramento em 215 nm (A) e selecionando a m/z = 237 (B) da reação controle; (C) Incubação da mistura fotossensibilizada com Fe(II) 100 μ M; (D) Incubação da mistura fotossensibilizada com NaBH₄.

Além disso, estes produtos foram sintetizados com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$, purificados, liofilizados e analisados por HPLC/MS/MS e RMN. Nas letras A e C da Figura 4.36 estão representados os espectros de massa dos produtos sintetizado com $^{16}\text{O}_2$, enquanto que nas letras B e D estão representados os espectros de massa dos produtos sintetizado com $^{18}\text{O}_2$.

Figura 4.36 Espectros de massa dos produtos com tempo de retenção de 5.84 minutos (A e B, para produto sintetizado com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$) e com tempo de retenção de 6.39 minutos (C e D, para produto sintetizado com $^{16}\text{O}_2$ e $^{18}\text{O}_2$).

4.8.2 Análise dos novos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$ por RMN

A fim de confirmar as estruturas dos dois novos produtos de oxidação, experimentos de RMN ^1H , ^{13}C e HSQC foram realizados. Analisando-se os sinais apresentados, conjuntamente com as análises previamente obtidas por HPLC/MS/MS, redução com Fe(II) ou NaBH_4 , sugere-se as estruturas demonstradas na Tabela 4.3. Desta forma, propõe-se que estes produtos sejam dioxindoilalaninas diastereoisoméricas (R,S e R,R α -amino-2,3-dihidro-3-hidroxi-2-oxo-1H-indol-3-ácido propanóico, DiOia). Os espectros de ^1H , ^{13}C e HSQC obtidos para os isômeros R,S e R,R DiOia estão apresentados nos Apêndices F (R,S DiOia) e G (R,R DiOia). Juntamente com os sinais derivados das DiOia, também é possível reconhecer os sinais dos alcoois *trans* e *cis*, os quais já foram previamente discutidos na seção 4.4.1.

Tabela 4.3 Resumo das análises dos isômeros R,S e R,R DiOia por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Posição	R, S DiOia				R,R DiOia			
	^1H			^{13}C	^1H			^{13}C
	δ^a	Mult. ^b	J_{xy}^c	δ	δ	Mult.	J_{xy}	δ
α	4,26	dd	$J_{\alpha\beta1,\alpha\beta2} =$ 3,66; 9,63	51,00	4,36	dd	$J_{\alpha\beta1,\alpha\beta2} =$ 3,48; 9,99	50,68
β	2,32	dd	$J_{\beta1\alpha,\beta1\beta2} =$ 9,65; 15,45	37,04	2,38	dd	$J_{\beta1\alpha,\beta1\beta2} =$ 3,49; 15,63	37,17
	2,54	dd	$J_{\beta1\alpha,\beta1\beta2} =$ 3,68; 15,45		2,51	dd	$J_{\beta2\alpha,\beta2\beta1} =$ 9,99; 15,65	
2	--	--	--	180,86	--	--	--	180,33
3	--	--	--	75,17	--	--	--	75,02
4	7,10	d	$J_{45} = 7,81$	111,38	7,08	d	$J_{45} = 7,83$	111,09
5	7,25	t	$J_{54,56} =$ 7,60	123,63	7,22	t	$J_{54,56} = 7,58$	123,54
6	7,45	t	$J_{65,67} =$ 7,76	130,50	7,42	t	$J_{65,67} = 7,77$	130,30
7	7,55	d	$J_{76} = 7,51$	123,98	7,49	d	$J_{76} = 7,53$	123,69
8	--	--	--	139,97	--	--	--	139,62
9	--	--	--	130,09	--	--	--	130,72
10	--	--	--	173,68	--	--	--	173,81
Estrutura

^a δ = deslocamento químico, em ppm; ^b Mult. = multiplicidade do sinal; ^c J_{xy} = constante de acoplamento entre os prótons x e y, em Hz.

4.8.3 Investigação da origem dos novos produtos de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$

Com o intuito de excluir o envolvimento de radicais durante a formação das DiOia, utilizamos o DMNO_2 como uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$. Na Figura 4.37 estão representados os cromatogramas obtidos com este experimento. Após 6 e 8 h de incubação do W (10 mM) com DMNO_2 (10 mM), pode-se perceber o surgimento de picos correspondentes aos dois isômeros de WOOH, aos dois isômeros de WOH, à FMK e também os dois picos correspondentes aos

novos produtos (assinalados com setas em negrito). Estes resultados demonstram que as DiOia são formadas a partir da oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$, excluindo-se a participação de radicais oriundos do processo de fotossensibilização. Conforme esperado, uma reação controle injetada imediatamente após misturar o W com o DMNO_2 , não apresentou nenhum pico de produto.

Figura 4.37 Cromatogramas com detecção UV = 215 nm da incubação de W (10 mM) com DMNO_2 (10 mM) a 37 °C em D_2O contendo 15 % de MeOH. A reação controle foi injetada imediatamente após misturar o W com o DMNO_2 .

Para confirmar os resultados obtidos por HPLC/UV-Vis as amostras foram analisadas por HPLC/MS/MS. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 4.38, e confirmam a formação das duas DiOia como produtos originários da oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$.

Figura 4.38 Cromatogramas com detecção UV = 215 nm. (A) e selecionando-se $m/z = 237$ (B) da reação do W com DMNO_2 . (C) Espectro de massa do produto com tempo de retenção de 6,3 minutos. (D) Espectro de massa do produto com tempo de retenção de 6,9 minutos.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos produtos de oxidação do W por HPLC/MS/MS utilizando produtos com [^{18}O] incorporado e por RMN

A mais de meio século estudos envolvendo a foto-oxidação do W têm despertado o interesse de pesquisadores. Os primeiros foto-produtos isolados e caracterizados foram dois 3a-hidroxipirrololindois e FMK (Nakagawa *et al.*, 1977). Posteriormente, outros estudos realizados em condições mais brandas conseguiram identificar uma mistura de 3a-hidroperoxipirrololindois *trans* e *cis* como os foto-produtos primários do W (Nakagawa *et al.*, 1977; Saito *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981).

No presente estudo, através de HPLC/MS/MS e RMN, foi possível caracterizar isoladamente cada WOOH isômero. Ambos são reativos no teste de detecção de peróxidos e ao serem reduzidos com NaBH_4 dão origem aos álcoois correspondentes. São separados por HPLC dando origem a dois picos de produtos sendo o de menor tempo de retenção designado como WOOH *trans* e o outro com maior tempo de retenção designado como WOOH *cis*. Os espectros de massa demonstram o acréscimo de 32 unidades de massa/carga, que corresponde à incorporação de dois átomos de oxigênio nas moléculas. Além disso, a fotossensibilização com [^{18}O] confirmou estes dados, uma vez que houve um aumento de 4 unidades de massa/carga em relação aos WOOH não marcados.

Os experimentos de RMN concordam com as estruturas propostas e com a literatura (Nakagawa *et al.*, 1981). Os deslocamentos químicos dos átomos C_{8a} e H_{8a} suportam as estruturas cíclicas propostas, uma vez que se as estruturas dos hidroperóxidos fossem abertas, estes átomos pertenceriam a um sistema olefínico, e deveriam estar deslocados para campo mais baixo. A estereoquímica dos dois hidroperóxidos foi atribuída por comparação com Nakagawa e colaboradores (Nakagawa *et al.*, 1981). Estes autores determinaram por raios-X a configuração *trans* para o álcool proveniente da redução do hidroperóxido mais polar e por comparação, classificaram este hidroperóxido como *trans*. A diferença mais notável nas

análises de RMN de próton entre os dois hidroperóxidos isômeros é em relação aos hidrogênios metilênicos do C₃. No caso do isômero *trans* estes prótons aparecem como um duplo dubleto (2,89 e 2,52 ppm), indicando que estes dois prótons são magneticamente não equivalentes, sendo a parte AB de um sistema ABX, onde o X é o próton H₂. Zhang e colaboradores também observaram este comportamento na análise de indóis *N*-acilados (Zhang *et al.*, 1993). Em contraste, os hidrogênios metilênicos do C₃ do isômero *cis* aparecem como um único dubleto (2,62 ppm), mostrando a equivalência magnética destes dois prótons. Curiosamente, no caso dos WOH, os hidrogênios metilênicos do C₃ do isômero *cis* aparecem claramente como um duplo dubleto (2,93 e 2,59 ppm), enquanto que no isômero *trans*, estes hidrogênios metilênicos possuem constante de acoplamento muito próximas, resultando em um multipletto. A não equivalência dos dois prótons do isômero *trans* também pode ser observada analisando-se a multiplicidade do C₂ (um duplo dubleto). Além disso, a constante de acoplamento J_{2,3'} para o WOH *cis* apresenta uma grande magnitude (próxima a 12 Hz). Este resultado é um indicativo de uma orientação *trans* diaxial para os prótons em questão, sugerindo que neste caso o grupamento carboxila adota preferencialmente uma conformação equatorial. Aparentemente, este não é o caso do grupamento carboxila do WOOH *trans*. Para este hidroperóxido, os dois H₂ também são diferentes magneticamente, entretanto, as constantes de acoplamento vicinais, J_{2,3'} and J_{2,3''} são próximas de 8 Hz. Outro contraste observado entre os WOOH e os WOH é a diferença de 10 ppm nos deslocamentos químicos dos C₃, devido a um efeito eletronegativo mais pronunciado do grupamento hidroperoxila sobre estes carbonos, quando comparado ao efeito do grupamento hidroxila.

5.2 Avaliação da estabilidade térmica, em diferentes pHs e da decomposição por metais dos WOOH

Ambos os hidroperóxidos não apresentaram decomposição significativa quando mantidos a 4, 25 e 37 °C por até 8 h. A incubação na presença de íons Cu(II) também não

exerceu um efeito significativo sobre os WOOH. Esta aparente estabilidade na oxidação por Cu(II) pode ser devido a formação de radicais peroxila, os quais podem abstrair um próton de um doador apropriado, regenerando os hidroperóxidos. Em contraste, íons Fe(II) provaram ser bons redutores dos WOOH, dando origem aos álcoois correspondentes. Neste caso, uma reação similar a de Fenton é esperada, levando a formação de radicais alcóxila, Fe(III) e OH⁻. Além disso, os experimentos demonstraram que os WOOH decompõem com o aumento do pH ou da temperatura (acima de 50 °C), levando a formação de FMK. Apesar do mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK ter sido estudado exaustivamente, a química detalhada desta transformação ainda não é completamente entendida.

5.3 Estudo do mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK

5.3.1 Experimentos envolvendo marcação isotópica da FMK

A decomposição do W para FMK tem sido alvo de grande discussão. Sabe-se que ela envolve um peróxido intermediário, contudo, o mecanismo exato pelo qual esta decomposição ocorre ainda não foi completamente elucidado. Algumas hipóteses foram descritas na literatura para esta decomposição; uma delas envolve um intermediário dioxetano; outra sugere uma hidratação com um posterior rearranjo; além disso, sugere-se uma hidroxiketona cíclica de oito membros como intermediária (Nakagawa *et al.*, 1977; Saito *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1979; McCapra e Long, 1981; Nakagawa *et al.*, 1981)(Figura 1.12). Se o mecanismo de decomposição ocorrer via hidratação, espera-se que a molécula de FMK gerada apresente apenas um [¹⁸O], uma vez que durante este mecanismo, haverá a eliminação de um [¹⁸O], e a incorporação de um [¹⁶O], proveniente de uma molécula de água. Como previamente demonstrado, a conversão dos WOOH à FMK é acelerada sob aquecimento ou aumento de pH. Desta forma, ao incubar-se cada W¹⁸O¹⁸OH com tampão tris pH 8.5 por até 3h, percebeu-se que a FMK gerada perdia um átomo de oxigênio marcado (e às vezes até mesmo os dois átomos marcados, Figura 4.14). Estes resultados levam a sugerir que uma

molécula de água participa no mecanismo de decomposição, uma vez que foi encontrada principalmente a molécula FMK com apenas um [^{18}O] incorporado. Entretanto, estudos têm demonstrado que compostos contendo grupos funcionais tais como aldeídos e cetonas podem apresentar uma alta velocidade de troca dos átomos de oxigênio com a água (Cohn e Urey, 1938; Bender e Thomas, 1961). Além disso, em um estudo envolvendo a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinurenina, uma molécula estruturalmente relacionada à FMK, também foi demonstrada esta capacidade de troca entre os átomos de oxigênio da molécula com os átomos de oxigênio da água (Almeida *et al.*, 2003).

Para evitar uma interpretação equivocada sobre o mecanismo de decomposição dos WOOH à FMK, incubou-se uma FMK sintetizada com os dois átomos de [^{16}O] na presença de H₂¹⁸O (97 %). Os resultados demonstraram a incorporação de um átomo de [^{18}O] da água na FMK não marcada (Figuras 4.16 e 4.17). Entretanto, o dado mais interessante foi a detecção de um discreto aumento na área relativa da FMK contendo dois átomos de [^{18}O]. Estes dados comprovam que a FMK é capaz de trocar os átomos de oxigênio do grupamento amida e do grupamento carbonila com a água, entretando, as trocas parecem ocorrer com velocidades muito diferentes.

Os W¹⁸O¹⁸OH foram solubilizados em etanol seco a fim de impedir as trocas ocorridas entre a FMK formada na decomposição destes W¹⁸O¹⁸OH e os átomos de oxigênio da água. Contudo, um problema adicional precisava ser superado: não era possível adicionar tampão ou NaOH à solução, pois seriam fontes potenciais de trocas. Desta forma foi utilizada a decomposição térmica dos W¹⁸O¹⁸OH à FMK. Esperava-se que em etanol os WOOH fossem termicamente decompondo à FMK, exatamente como ocorre em solvente aquoso. Todavia, pode-se perceber que a FMK formada em solvente orgânico decompõe-se a kn. Assim, a quantidade de FMK não aumentou linearmente, já que foi degradada a kn (Figura 4.18). De qualquer forma, os resultados mostraram a formação de FMK isotopicamente marcada com dois átomos de oxigênio 18 durante a decomposição dos W¹⁸O¹⁸OH isômeros *trans* e *cis*

(Figura 4.19). Esta é uma evidência inequívoca do envolvimento dos dois átomos de oxigênio do grupamento hidroperóxido no mecanismo de formação da FMK.

5.3.2 Estudos envolvendo a decomposição quimiluminescente dos WOOH

O aquecimento ou o aumento de pH de soluções contendo os WOOH é quimiluminescente (Figuras 4.11 e 4.12). Desde a década de 60, a quimiluminescência produzida por derivados substituídos de indóis e seus hidroperóxidos têm sido estudada (McCapra e Chang, 1966; Sugiyama *et al.*, 1967; Sugiyama *et al.*, 1968; McCapra e Long, 1981). O mecanismo postulado envolve a decomposição destes hidroperóxidos catalisada por base. Além disso, também foi observada luminescência em reações envolvendo a oxidação do ácido indol acético (um hormônio de plantas) catalisadas por peroxidase. Neste caso, a luminescência é atribuída ao indol-3-aldeído, formado através de uma α -peroxilactona intermediária hipotética (Vidigal *et al.*, 1975; De Mello *et al.*, 1980; De Mello *et al.*, 1982). Também tem sido demonstrado por muitos pesquisadores que a oxidação da melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), um hormônio importante e estruturalmente relacionado ao W, é luminescente (Ximenes *et al.*, 2001b; Kladna *et al.*, 2003; Ximenes *et al.*, 2005). Além disso, Alarcón e colaboradores (Alarcon *et al.*, 2007) reportaram uma quimiluminescência de baixa intensidade após a irradiação de uma solução contendo Rosa Bengala e W livre ou em peptídeos. Contudo, apesar de trabalhos extensivos sobre a luminescência de compostos indólicos, ainda existem muitas incertezas sobre a natureza dos intermediários e dos passos envolvidos no mecanismo, apesar de ser amplamente aceito o envolvimento de um intermediário dioxetano.

Geralmente, a clivagem de dioxetanos resulta em carbonilas excitadas no estado $n-\pi^*$. Entretanto, para compostos contendo grupamentos aromáticos em sua estrutura, o estado excitado de mais baixa energia pode ser tanto $n-\pi^*$ quanto $\pi-\pi^*$. Quando uma carbonila é excitada no estado $n-\pi^*$, o rendimento do estado triplete é alto (Adam, 1982). Por outro lado,

a clivagem de dioxetanos que possuem grupos facilmente oxidáveis, gera estados π - π^* excitados, e com altos rendimentos singlete (McCapra *et al.*, 1977). Além disso, tem-se proposto que este tipo de dioxetano, conjugado a um sistema doador de elétron, gera estados com caráter π - π^* pelo mecanismo de transferência intramolecular de elétron (Nakamura e Goto, 1979a; Schuster *et al.*, 1979).

Desta forma, com o intuito de caracterizar a natureza da espécie excitada, dois aceptores fluorescentes conhecidos por intensificar a emissão de luz de espécies excitadas foram utilizados: DBA e DPA, respectivamente aceptores de energia de estados triplete e singlete excitados (Wilson e Schaap, 1971; Horn e Schuster, 1978; Adam, 1982). Entretanto, no sistema em estudo, não foi detectada nenhuma amplificação de luminescência, tanto na presença de DBA quanto de DPA (Figuras 4.23 e 4.24, respectivamente para a decomposição dos WOOH *trans* e *cis*). De Mello e colaboradores observaram este mesmo comportamento na oxidação aeróbica do ácido 3-indol acético catalisada por peroxidase (De Mello *et al.*, 1980). Estes autores sugeriram que a espécie excitada era gerada no estado $^3\pi$ - π^* , e por isso era incapaz de transferir energia para os aceptores comumente utilizados. Todavia, esta carbonila excitada parecia transferir energia eficientemente para o O_2 , gerando 1O_2 .

A oxidação do difenilacetaldeído pela peroxidase de raiz forte, gerando o estado triplete da benzofenona foi outro trabalho onde o produto excitado não foi capaz de transferir energia para aceptores comumente utilizados. Neste estudo, Nantes e colaboradores perceberam que nem o dibromoantraceno sulfonato (aceptor triplete), nem o antraceno sulfonato (aceptor singlete) foram capazes de amplificar a intensidade de quimiluminescência gerada (Nantes *et al.*, 1996). A ineficiência do dibromoantraceno sulfonato poderia ser explicada pelo alto nível de energia do estado triplete desta molécula ($E_T > 300 \text{ kJ mol}^{-1}$) que estaria acima do nível de energia triplete da benzofenona ($E_T > 290 \text{ kJ mol}^{-1}$). Contudo, por razões que estes autores não souberam explicar, mesmo o estado triplete acessível do biacetil ($E_T > 200 \text{ kJ mol}^{-1}$) não foi capaz de intensificar a luminescência da reação.

As emissões em 436 e 510 nm encontradas no sistema em estudo podem explicar a falha na transferência de energia para o DBA ou DPA. Considerando-se a emissão em 436 nm, a variação de energia da transição eletrônica seria de 65,6 kcal/mol (ou 274 kJ/mol) enquanto que a energia do estado singlete do DPA e do DBA é de aproximadamente 70 kcal/mol. Assim, para caracterizar a natureza da espécie excitada neste sistema, seria necessária a utilização de outros aceptores fluorescentes, como por exemplo, o rubreno, que possui uma energia do estado singlete de 55 kcal/mol (Santa Cruz *et al.*, 1976).

Outro aspecto interessante a ser destacado foi a diferença na intensidade da luz gerada por cada hidroperóxido, uma vez que a decomposição catalisada por base do WOOH *cis* apresentou uma intensidade de luminescência muito maior do que a gerada no sistema contendo WOOH *trans*. Uma possível razão para este fato seria uma diferença na velocidade de formação da FMK pelo WOOH *cis* em relação ao *trans*. Contudo, as velocidades determinadas não apresentaram diferenças significativas, excluindo portanto, esta possibilidade. A intensidade muito maior de luminescência pode ser devido às diferenças nas estruturas espaciais dos hidroperóxidos, que no caso da decomposição do WOOH *trans* poderia favorecer a formação de um estado não emissivo.

Os espectros de quimiluminescência obtidos durante a decomposição de cada WOOH mostram um máximo próximo a 436 nm, que é perfeitamente sobreposto ao espectro de fluorescência da FMK. Entretanto, também é possível visualizar outra banda próxima a 510 nm. Em um trabalho envolvendo a oxidação de derivados indólicos por peroxidase, esta banda mais deslocada para o vermelho foi atribuída a formação de um excímero (Ximenes *et al.*, 2001a). Por outro lado, em um trabalho que mostrava o efeito da melatonina no sistema Cu(II)/peróxido de hidrogênio, sugeriu-se que esta banda deslocada para o vermelho era derivada da emissão do $^1\text{O}_2$ (Kladna *et al.*, 2003). Em contraste, esta luminescência pode ser entendida em termos do mecanismo envolvido na formação da FMK excitada. Neste sentido, uma emissão de luz próxima a 520 nm foi demonstrada quando peróxidos indólicos foram

dissolvidos em etanol (Sugiyama *et al.*, 1968) ou dimetil sulfóxido (McCapra e Chang, 1966) contendo hidróxido de potássio. Esta emissão de luz foi atribuída a um ânion carbonil excitado, formado durante a decomposição de um dioxetano. Os autores também demonstraram que a amida neutra formada pela protonação deste ânion perde esta emissão próxima a 520 nm. Da mesma forma, Escobar e colaboradores (Escobar *et al.*, 1992) sugeriram o envolvimento de um intermediário dioxetano originado do metabolismo do ácido indol acético pela peroxidase de raiz forte. Este intermediário dioxetano teria uma carga negativa e a sua decomposição resultaria em um ânion excitado no estado singlete, emitindo em 520 nm. Além disso, a protonação seguida da clivagem do dioxetano levaria a uma cetona excitada análoga a FMK, emitindo no comprimento de onda equivalente a sua fluorescência.

Adicionalmente, foi demonstrado que a formação de ligação de hidrogênio intramolecular entre o N-H da amida e o grupamento carbonila em orto, ligado aos carbonos α e β da FMK, desempenham um importante papel no desenvolvimento de uma emissão de fluorescência deslocada para o vermelho. Têm-se postulado que a ligação de hidrogênio pode favorecer a transferência de próton entre estes dois grupamentos no estado excitado, um deles (N-H) tornando-se extremamente ácido no estado excitado e o outro extremamente básico. Esta transferência de próton foi considerada a responsável pela emissão de fluorescência da FMK em 510 nm quando se diminui a polaridade do solvente. A ausência desta emissão pelo derivado metilado (N-CH₃) suporta esta hipótese (Pileni *et al.*, 1976a, 1976b). Desta forma, estas considerações podem explicar o aparecimento de uma banda com emissão deslocada para o vermelho encontrada durante a decomposição dos WOOH à FMK. Um esquema ilustrativo desta proposta mecanística esta representado na Figura 5.1.

Figura 5.1 Hipótese mecanística da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH, via formação de um ânion excitado.

Um mecanismo por transferência de carga inter ou intramolecular também não pode ser excluído. Este mecanismo tem sido demonstrado para uma série de reações quimi e bioluminescentes, como a quimiluminescência do peróxido de difenoíla ou a decomposição da dimetildioxetanona na presença de compostos aromáticos facilmente oxidáveis; também para a reação bioluminescente do vagalume, neste caso uma troca de elétron intramolecular, gerando o estado singlete excitado (Schuster *et al.*, 1979). Além disso, aminas têm sido usadas para a foto-redução de cetonas aromáticas, como por exemplo, a foto-redução da benzofenona pela trietilamina (Parola *et al.*, 1975; Schaefer e Peters, 1980; Simon e Peters, 1981). O mecanismo proposto é a transferência de um elétron da amina para a cetona;

posteriormente pode ocorrer a emissão da cetona excitada, ou a transferência de um próton. No caso específico da foto-redução da benzofenona pela trietilamina, a transferência de próton é muito eficiente. Uma vez que nosso sistema possui uma carbonila ligada a anel aromático e também possui um grupamento doador de elétrons, o mecanismo de quimiluminescência intra ou intermolecular também pode ser plausível. Um estudo do espectro de emissão de quimiluminescência da decomposição dos WOOH à FMK variando-se a polaridade do solvente pode fornecer alguns indícios sobre este mecanismo, uma vez que o aumento da polaridade do solvente favorece a estabilização do par radical cátion-ânion, o que aumentaria a emissão em 510 nm.

5.4 Identificação de dois novos produtos da reação de oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$

Além dos hidroperóxidos, os álcoois correspondentes e a FMK também foram isolados e caracterizados por HPLC/MS/MS e RMN. Estes produtos estão de acordo com resultados obtidos em estudo prévios sobre a oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$. (Nakagawa *et al.*, 1977; Saito *et al.*, 1977; Nakagawa *et al.*, 1979; Nakagawa *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 1993). Entretanto, através do cromatograma (detecção UV = 215 nm) dos produtos, pode-se perceber a existência de mais dois subprodutos (Figura 4.27) ainda não relatados na oxidação do W por $^1\text{O}_2$. Os espectros de massa mostram que tal como os hidroperóxidos e a FMK, estes produtos possuem um acréscimo de 32 unidades de massa/carga em relação ao W, ou seja, a incorporação de dois átomos de oxigênio. Os estudos envolvendo [^{18}O] confirmam estas observações. Por outro lado, apesar de apresentarem a mesma relação m/z que os WOOH, eles possuem tempos de retenção diferentes no HPLC. Adicionalmente, dão resultado negativo no teste de detecção de peróxidos e são inertes ao NaBH_4 e ao Fe(II) . Fazendo-se um resumo das principais observações feitas nestes e em outros experimentos realizados com os dois novos subprodutos temos: i) não se tratam de peróxidos, já que dão resultado negativo no teste do alaranjado de xilenol, e não são reduzidos por Fe(II) ; ii) não possuem as funções orgânicas de

aldeído e cetona, já que não sofrem redução pelo NaBH_4 (Figura 4.16). iii) Perdem uma molécula de água na fragmentação por MS/MS. iv) ambos os subprodutos apresentam um sinal no espectro de RMN de ^{13}C compatível com um carbono de uma amida. Considerando estes resultados, propõe-se que estes produtos sejam diastereoisômeros (R,S e R,R) de dioxindolilalanina (α -amino-2,3-dihidro-3-hidroxi-2-oxo-1H-indol-3-ácido propanóico (DiOia), cujas estruturas na Figura 4.29 e Tabela 4.3. Estes produtos já foram detectados na oxidação do W por ácido peroxiacético (Savige, 1975) ou por peróxido de hidrogênio (Simat e Steinhart, 1998), contudo, nunca foram detectados na oxidação do W por $^1\text{O}_2$.

A fim de garantir que as DiOia não estavam sendo formadas por reações do tipo I envolvendo a Rosa Bengala, o DMNO_2 foi utilizado como uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$. Além dos produtos de oxidação já esperados, também foram produzidas as duas DiOia, excluindo-se desta forma, o envolvimento de radicais no processo. O mecanismo envolvido na formação das DiOia a partir de W e $^1\text{O}_2$ ainda não foi elucidado. Entretanto, algumas propostas podem ser elaboradas, baseadas em estudos prévios. Em um estudo envolvendo a formação de um dioxetano em uma enamina foi proposto um mecanismo de eliminação β , envolvendo a clivagem da ligação O-O do amino dioxetano. Esta clivagem necessitava da presença de um H ligado a um dos carbonos do dioxetano e resultava na formação de um ceto amina (Wasserman e Terao, 1975). Em outro trabalho envolvendo a foto-oxigenação de enaminas foram propostos dois mecanismos: i) para enaminas contendo um átomo de H no carbono β , uma eliminação β do intermediário dioxetano, em presença de base; ii) para enaminas que não possuem um átomo de H no carbono β , os autores postularam um mecanismo birradicalar, onde a ligação O-O é completamente quebrada, seguida pela clivagem da ligação C-N, resultando na formação de um radical centrado no nitrogênio e um radical ceto alcóxila (Ando *et al.*, 1975).

Adicionalmente, em um estudo envolvendo a geração de acetona triplete no sistema isobutanal/peroxidase/ O_2 , foi demonstrada a formação de isopropanol como um subproduto

de reação (Oliveira *et al.*, 1978; Bechara *et al.*, 1979). Os autores sugeriram que uma população de moléculas da acetona triplete era gerada na enzima em uma conformação que favorecia a abstração de hidrogênio (Bechara *et al.*, 1979).

Além disso, é bem sabido que o estado (n, π^*) excitado de cetonas possui um caráter de radical, particularmente similar a radicais alcóxila, uma vez que pode abstrair um hidrogênio de um doador apropriado. Adicionalmente, para cetonas contendo substituintes doadores de elétrons, o estado excitado triplete de mais baixa energia tem características de transferência de carga. De particular interesse é a reação de cetonas na presença de aminas. Esta reação parece acomodar satisfatoriamente um mecanismo de transferência de carga, sendo que primeiro ocorre a transferência de um elétron e dependendo da orientação dos grupamentos carbonila e amina, logo após pode ocorrer a transferência de um próton, reduzindo a cetona a álcool (Gilbert e Baggot, 1991). Na realidade, a foto-redução de cetonas por amidas, incluindo os rendimentos da formação de alcoóis tem sido alvo de vários estudos (Parola *et al.*, 1975; Schaefer e Peters, 1980; Simon e Peters, 1981).

Desta forma, em nosso sistema, a clivagem do dioxetano e a concomitante formação da FMK excitada poderiam ocorrer através de um mecanismo de transferência de carga (inter, ou intramolecular). A transferência do elétron levaria a formação do radical ânion da FMK, e explicaria o espectro de emissão em 510 nm. Outra evidência seria a formação dos DiOia como subprodutos. Esta formação minoritária poderia ser explicada por transferência de um elétron seguida de uma transferência de próton, levando aos produtos reduzidos. Levando-se em conta o rendimento de FMK versus isômeros DiOia, poderíamos atribuir uma maior eficiência da primeira via (FMK), em relação à segunda (DiOia). Este mecanismo é somente tentativo, não excluindo outras possibilidades, e necessita de experimentos para ser confirmado ou excluído. Um esquema ilustrativo desta proposta mecanística está representado na Figura 5.2.

Figura 5.2 Hipótese mecanística da quimiluminescência gerada na decomposição dos WOOH, via um complexo de transferência de elétron.

Neste trabalho, foi demonstrado que a oxidação do W pelo $^1\text{O}_2$ dá origem a uma mistura de hidropéroxidos *trans* e *cis*, os quais foram completamente caracterizados. Foi demonstrado que estes hidropéroxidos são relativamente estáveis às temperaturas ambiente e fisiológica (37 °C), gerando lentamente os isômeros de álcoois correspondentes. O aumento do pH ou o aquecimento das soluções leva a uma decomposição quimiluminescente dos WOOH à FMK. O mecanismo desta decomposição foi avaliado por diferentes técnicas, marcação isotópica com ^{18}O acoplada a HPLC/MS e medidas de emissão de luz. Os resultados concordam entre si e são consistentes com uma decomposição via um intermediário dioxetano (Figura 1.12, setas em negrito). Além disso, dois isômeros de DiOia foram isolados como fotoprodutos, e a formação destes produtos pode corroborar a via de decomposição através de um intermediário dioxetano.

A relevância deste trabalho pode ser evidenciada por estudos que ligam produtos derivados da oxidação do W com a agregação covalente em proteínas. Tem sido proposto que ligações covalentes dos filtros UV derivados de kn com proteínas do cristalino podem levar a modificações nas lentes e ao desenvolvimento de catarata (Vazquez *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2004). Também tem sido demonstrado que modificações oxidativas em resíduos de triptofano, levando a formação de FMK e kn parecem contribuir para a formação de agregados covalentes na superóxido dismutase humana. Acredita-se que a agregação desta enzima está implicada no desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica, uma doença degenerativa do neurônio motor (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2004b). Dentro deste contexto, este trabalho pode contribuir no esclarecimento dos mecanismos envolvidos nas reações oxidativas do triptofano que levam a geração de condições patológicas.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, dois hidroperóxidos isômeros foram caracterizados por HPLC/MS/MS, marcação isotópica e RMN como os principais produtos de oxidação do triptofano por $^1\text{O}_2$. Adicionalmente, a estabilidade em diferentes temperaturas e pHs de cada hidroperóxido isolado foi avaliada; os subprodutos formados em cada caso foram identificados. A reatividade frente a metais também foi investigada, identificando-se os produtos de cada reação.

A decomposição dos hidroperóxidos em temperaturas brandas leva lentamente aos alcoóis correspondentes. Porém, com o aumento da temperatura ou do pH da solução, a formação de FMK começa a concorrer com os alcoóis como outro produto de decomposição dos hidroperóxidos. Neste trabalho foi possível concluir que o mecanismo de decomposição dos hidroperóxidos à FMK envolve os dois átomos de oxigênio do hidroperóxido. Além disso, esta decomposição é quimiluminescente. O mecanismo via um intermediário dioxetano é compatível com todos os resultados obtidos.

Dioxindoilalaninas diastereoisoméricas também foram caracterizadas como produtos de oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$. Estes produtos já foram descritos na reação de outros oxidantes com o triptofano, entretanto, nunca foram observados na reação deste aminácido com o $^1\text{O}_2$. A formação destes produtos também fortalece o mecanismo via intermediário dioxetano.

Em suma, este estudo contribuiu na elucidação das bases químicas envolvidas na oxidação do triptofano por $^1\text{O}_2$, através da caracterização dos produtos formados e da investigação detalhada dos mecanismos de decomposição destes produtos.

7 PERSPECTIVAS

As proteínas são consideradas alvos importantes para os oxidantes, devido à abundância em sistemas biológicos e às altas constantes de reações com estas espécies. Adicionalmente, sabe-se que o triptofano é um aminoácido extremamente susceptível a oxidação, reagindo com uma vasta gama de oxidantes. Muitos estudos têm sugerido que este aminoácido está envolvido no desenvolvimento de lesões oxidativas importantes através da formação de ligações covalentes e agregados protéicos. Neste sentido, este trabalho abre perspectivas para o esclarecimento dos mecanismos de oxidação do triptofano, não somente pelo $^1\text{O}_2$, mas também por outros oxidantes. Além disso, o entendimento dos mecanismos de reação com o aminoácido isolado abre perspectivas para o estudo de lesões oxidativas em sistemas mais complexos, como peptídeos e proteínas.

8 REFERÊNCIAS

- Adam, W. (1982). Determination of chemiexcitation yields in the thermal generation of electronic excitation from 1,2-dioxetanes. *Chemical and Biological Generation of Excited States*. Adam, W., Cilento, G. New York, Academic Press: 115-152.
- Adam, W., Arnold, M. A., Grune, M., Nau, W. M., Pischel, U., Saha-Moller, C. R. (2002). Spiroiminodihydantoin is a major product in the photooxidation of 2'-deoxyguanosine by the triplet states and oxyl radicals generated from hydroxyacetophenone photolysis and dioxetane thermolysis. *Organic Letters* 4(4): 537-540.
- Adam, W., Baader, W. J. (1985). Effects of methylation on the thermal stability and chemiluminescence properties of 1,2-dioxetanes. *Journal of the American Chemical Society* 107(2): 410-416.
- Adam, W., Zinner, K. (1982). Determination of activation parameters and the thermal stability of 1,2-dioxetanes. *Chemical and Biological Generation of Excited States*. Adam, W., Cilento, G. New York, Academic Press.
- Agon, V. V., Bubb, W. A., Wright, A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (2006). Sensitizer-mediated photo-oxidation of histidine residues: Evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. *Free Radical Biology and Medicine* 40(4): 698-710.
- Alarcon, E., Henriquez, C., Aspee, A., Lissi, E. A. (2007). Chemiluminescence associated with singlet oxygen reactions with amino acids, peptides and proteins. *Photochemistry and Photobiology* 83(3): 475-480.
- Almeida, E. A., Martinez, G. R., Klitzke, C. F., de Medeiros, M. H., Di Mascio, P. (2003). Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$) produces N^1 -acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynurenine. *Journal of Pineal Research* 35(2): 131-7.
- Ando, W., Saiki, T., Migita, T. (1975). Singlet oxygen reaction.4. Photooxygenation of enamines involving a 2-step cleavage of 1,2-dioxetane intermediate. *Journal of the American Chemical Society* 97(17): 5028-5029.
- Ando, W., Takata, T. (1985). Photooxidation of sulfur compounds. *Singlet O_2* . Frimer, A. A., CRC Press; Boca Raton. III: 1-117.
- Baader, W., Stevani, C., Bastos, E. (2006). Chemiluminescence of organic peroxides. *The Chemistry of Peroxides*. Rappoport, Z., John Wiley & Sons Ltd: 1211-1278.
- Baumstark, A. (1985). The 1,2 dioxetane ring system: preparation, termolysis, and insertion reactions. *Singlet O_2* . Frimer, A. A., CRC Press; Boca Raton. II: 1-38.
- Bechara, E. J. H., Oliveira, O. M. M. F., Duran, N., Baptista, R. C., Cilento, G. (1979). Peroxidase catalyzed generation of triplet acetone. *Photochemistry and Photobiology* 30(1): 101-110.
-

- Beckwith, A. L. J., Davies, A. G., Davison, I. G. E., Maccoll, A., Mruzek, M. H. **(1989)**. The mechanisms of the rearrangements of allylic hydroperoxides - 5- α -hydroperoxy-3- β -hydroxycholest-6-ene and 7- α -hydroperoxy-3- β -hydroxycholest-5-ene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*(7): 815-824.
- Bender, M. L., Thomas, R. J. **(1961)**. The concurrent alkaline hydrolysis and isotopic oxygen exchange of a series of p-substituted acetanilides. *Journal of the American Chemical Society* 83(20): 4183-4189.
- Bloodworth, A., Eggelte, H. **(1985)**. Endoperoxides. *Singlet O₂*. Frimer, A. A., CRC Press, Boca Raton. II: 93-204.
- Boveris, A., Cadenas, E., Chance, B. **(1981)**. Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Federation Proceedings* 40(2): 195-8.
- Browne, R., Ogryzlo, E. **(1964)**. Chemiluminescence from reaction of chlorine with aqueous hydrogen peroxide. *Proceedings of the Chemical Society of London*: 117.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J. L., Spinelli, S. **(1997)**. Effects of UV and visible radiation on DNA - Final base damage. *Biological Chemistry* 378(11): 1275-1286.
- Campbell, A. **(1988)**. *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*. Chinchester, Ellis Horwood, Ltd. 608p.
- Cavalcante, A. K. D., Martinez, G. R., Di Mascio, P., Menck, C. F. M., Agnez-Lima, L. F. **(2002)**. Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient Escherichia coli strains. *DNA Repair* 1(12): 1051-1056.
- Cohn, M., Urey, H. C. **(1938)**. Oxygen exchange reactions of organic compounds and water. *Journal of the American Chemical Society* 60(3): 679-687.
- Criado, S., Soltermann, A. T., Marioli, J. M., Garcia, N. A. **(1998)**. Sensitized photooxidation of di- and tripeptides of tyrosine. *Photochemistry and Photobiology* 68(4): 453-458.
- Davies, M. **(2004)**. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical and Photobiological Sciences* 3: 17-25.
- De Mello, M. P., De Toledo, S. M., Aoyama, H., Sarkar, H., Cilento, G., Duran, N. **(1982)**. Peroxidase-generated triplet indole-3-aldehyde adds to uridine bases and excites the 4-thiouridine group in t-RNA^{phe}. *Photochemistry and Photobiology* 36(1): 21-24.
- De Mello, M. P., De Toledo, S. M., Haun, M., Cilento, G., Duran, N. **(1980)**. Excited indole-3-aldehyde from the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. Reaction with and energy transfer to transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* 19(23): 5270-5275.
- Di Mascio, P., Bechara, E., Medeiros, M., Briviba, K., Sies, H. **(1994)**. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 355(3): 287-289.

- Di Mascio, P., Sies, H. (1989). Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylene)dipropionate endoperoxide. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *Journal of the American Chemical Society* 111(8): 2909-2914.
- Dole, M. (1952). The chemistry of the isotopes of oxygen. *Chemical Reviews* 51(2): 263-300.
- Dremina, E. S., Sharov, V. S., Davies, M. J., Schoneich, C. (2007). Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides. *Chemical Research in Toxicology* 20(10): 1462-1469.
- 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-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *Journal of the American Chemical Society* 122(51): 12622-12628.
- Ek, A., Kissman, H., Patrick, J. B., Witkop, B. (1952). Chemical contributions to the mechanism of the biological oxidation of tryptophan. *Experientia* 8(1): 36-40.
- Escobar, J. A., Vásquez-Vivar, J., Cilento, G. (1992). Free-radicals and excited species in the metabolism of indole-3-acetic-acid and its ethyl-ester by Horseradish-Peroxidase and by neutrophils. *Photochemistry and Photobiology* 55(6): 895-902.
- Foote, C. S. (1968). Mechanisms of photossensitized oxidation. *Science* 162: 963-970.
- Foote, C. S. (1979). Quenching of singlet oxygen. *Organic Chemistry: A series of monographs*. Wasserman, H. H. New York, Academic Press. 40: 139-171.
- Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* 54(5): 659.
- Foote, C. S., Chang, Y. C., Denny, R. W. (1970a). Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society* 92(17): 5216-5218.
- Foote, C. S., Chang, Y. C., Denny, R. W. (1970b). Chemistry of singlet oxygen. XI. Cis-trans isomerization of carotenoids by singlet oxygen and a probable quenching mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 92(17): 5218-5219.
- Foote, C. S., Denny, R. W. (1968). Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene. *Journal of the American Chemical Society* 90(22): 6233-6235.
- Foote, C. S., Denny, R. W. (1971). Chemistry of singlet oxygen. 12. Electronic effects on rate and products of reaction with olefins. *Journal of the American Chemical Society* 93(20): 5162-5167.
- Foote, C. S., Thomas, M., Ching, T.-Y. (1976). Photooxidation of phenols. *Journal of Photochemistry* 5(2): 172-172.
- Frankel, E. N., Neff, W. E., Bessler, T. R. (1979). Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry. 5. Photosensitized oxidation. *Lipids* 14(12): 961-967.

- Gay, C., Collins, J., Gebicki, J. **(1999)**. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry* 273(2): 149-155.
- Giauque, W. F., Johnston, H. L. **(1929)**. An isotope of oxygen, mass 18. interpretation of the atmospheric absorption bands. *Journal of the American Chemical Society* 51(5): 1436-1441.
- Gilbert, A., Baggot, J. **(1991)**. *Essentials of Molecular Photochemistry*. London, Blackwell Science Oxford. 538p.
- Giulivi, C., Traaseth, N. J., Davies, K. J. A. **(2003)**. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids* 25(3-4): 227-232.
- Grune, T., Merker, K., Sandig, G., Davies, K. J. A. **(2003)**. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305(3): 709-718.
- Hallliwell, B., Gutteridge, J. M. C. **(2007)**. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford. 851p.
- Hamilton, G. A. **(1969)**. Mechanisms of two- and four-electron oxidations catalyzed by some metalloenzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 32: 55-96.
- Hampton, M., Morgan, P., Davies, M. J. **(2002)**. Inactivation of cellular caspases by peptide-derived tryptophan and tyrosine peroxides. *FEBS Letters* 527: 289-292.
- Hawkins, C. L., Davies, M. J. **(2001)**. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504(2-3): 196-219.
- Held, A. M., Halko, D. J., Hurst, J. K. **(1978)**. Mechanisms of chlorine oxidation of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society* 100(18): 5732-5740.
- Horn, K. A., Schuster, G. B. **(1978)**. Electronic excitation energy partitioning in dissymmetric dioxetane thermolyses. The absolute chemiluminescence yields and triplet to singlet excited state ratios for 3-acetyl-4,4-dimethyl-1,2-dioxetane. *Journal of the American Chemical Society* 100(21): 6649-6656.
- Howard, J., Ingold, K. **(1968)**. The self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *Journal of the American Chemical Society* 90: 1057-1058.
- Kang, P., Foote, C. S. **(2000)**. Synthesis of a ^{13}C , ^{15}N labeled imidazole and characterization of the 2,5-endoperoxide and its decomposition. *Tetrahedron Letters* 41(49): 9623-9626.
- Kang, P., Foote, C. S. **(2002)**. Formation of transient intermediates in low-temperature photosensitized oxidation of an 8-C-13-guanosine derivative. *Journal of the American Chemical Society* 124(17): 4865-4873.
- Kanofsky, J. **(1983)**. Singlet oxygen production by lactoperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 258(10): 5991-5993.
-

- Kanofsky, J. (1984). Singlet oxygen production by chloroperoxidase-hydrogen peroxide-halide systems. *Journal of Biological Chemistry* 259(9): 5596-5600.
- Kanofsky, J. (1988). Singlet oxygen production from the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Journal of Biological Chemistry* 263(28): 14171-14175.
- Kanofsky, J., Sima, P. (1991). Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *Journal of Biological Chemistry* 266(14): 9039-9042.
- Kanofsky, J., Wright, J., Miles-Richardson, G., Tauber, A. (1984). Biochemical requirements for singlet oxygen production by purified human myeloperoxidase. *Journal of Clinical Investigation* 74(4): 1489-1495.
- Kanofsky, J., Wright, J., Tauber, A. (1985). Effect of ascorbic acid on the production of singlet oxygen by purified human myeloperoxidase. *FEBS Letters* 187(2): 299-301.
- Kasha, M. (1985). Singlet oxygen electronic structure and energy transfer. *Singlet O₂*. Frimer, A. A. Florida, CRC Press, Boca Raton. I: 1-11.
- Kearns, D. R. (1969). Selection rules for singlet-oxygen reactions. Concerted addition reactions. *Journal of the American Chemical Society* 91(24): 6554-6563.
- Khan, A. (1981). Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen (¹O₂) in the reaction of potassium superoxide with water. *Journal of the American Chemical Society* 103(21): 6516-6517.
- Khan, A., Kasha, M. (1963). Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution. *Journal of Chemical Physics* 39: 2105-2106.
- Kladna, A., Aboul-Enein, H. Y., Kruk, I. (2003). Enhancing effect of melatonin on chemiluminescence accompanying decomposition of hydrogen peroxide in the presence of copper. *Free Radical Biology and Medicine* 34(12): 1544-54.
- Kochevar, I. E., Redmond, R. W. (2000). Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods in Enzymology* 319: 20-28.
- Koo, J.-Y., Schuster, G. B. (1977). Dioxetane chemiluminescence. The effect of deuterium substitution on the thermal decomposition of trans-3,4-diphenyl-1,2-dioxetane. *Journal of the American Chemical Society* 99(16): 5403-5408.
- Koo, J.-Y., Schuster, G. B. (1978). Chemiluminescence of diphenoyl peroxide. Chemically initiated electron exchange luminescence. A new general mechanism for chemical production of electronically excited states. *Journal of the American Chemical Society* 100(14): 4496-4503.
- Korytowski, W., Girotti, A. W. (1999). Singlet oxygen adducts of cholesterol: Photogeneration and reductive turnover in membrane systems. *Photochemistry and Photobiology* 70(4): 484-489.
- Kulig, M. J., Smith, L. L. (1973). Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. *Journal of Organic Chemistry* 38(20): 3639-3642.

- Martinez, G. R., Di Mascio, P., Bonini, M. G., Augusto, O., Briviba, K., Sies, H., Maurer, P., Rothlisberger, U., Herold, S., Koppenol, W. H. (2000). Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and nitroxyl (NO^-). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(19): 10307-10312.
- Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Ravanat, J. L., Cadet, J., Di Mascio, P. (2002). [O^{18}]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: Detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives. *Biological Chemistry* 383(3-4): 607-617.
- Matheson, I., Etheridge, R., Kratowich, N., Lee, J. (1975). The quenching of singlet oxygen by amino acids and proteins. *Photochemistry and Photobiology* 21(3): 165-171.
- 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. Detroit, Wayne State University.
- McCapra, F. (1968). An application of theory of electrocyclic reactions to bioluminescence. *Chemical Communications*(3): 155.
- McCapra, F. (1976). Chemical mechanisms in bioluminescence. *Accounts of Chemical Research* 9(6): 201-208.
- McCapra, F. (1977). Alternative mechanism for dioxetan decomposition. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(24): 946-948.
- McCapra, F., Beheshti, I., Burford, A., Hann, R. A., Zaklika, K. A. (1977). Singlet excited-states from dioxetan decomposition. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(24): 944-946.
- McCapra, F., Chang, Y. C. (1966). Chemiluminescence of indolyl peroxide. *Chemical Communication*(15): 522-523.
- McCapra, F., Long, P. V. (1981). The rearrangement of hydroperoxyindolenines. *Tetrahedron Letters* 22(31): 3009-3012.
- Merkel, P. B., Kearns, D. R. (1972a). Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. Experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer. *Journal of the American Chemical Society* 94(21): 7244-7253.
- Merkel, P. B., Kearns, D. R. (1972b). Remarkable solvent effects on the lifetime of $^1\Delta_g$ oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 94(3): 1029-1030.
- Miyamoto, S., Martinez, G., Medeiros, M., Di Mascio, P. (2003). Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *Journal of the American Chemical Society* 125(20): 6172-6179.
- Monroe, B. M. (1985). Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants. *Singlet O_2* . Frimer, A. A. Florida, CRC Press, Boca Raton. I: 177-224.

- Morgan, P. E., Dean, R. T., Davies, M. J. **(2002)**. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *European Journal of Biochemistry* 269(7): 1916-1925.
- Morgan, P. E., Dean, R. T., Davies, M. J. **(2004)**. Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine* 36(4): 484-496.
- Nakagawa, M., Kato, S., Kataoka, S., Hino, T. **(1979)**. 3a-hydroperoxypyrroloindole from tryptophan - isolation and transformation to formylkynurenine. *Journal of the American Chemical Society* 101(11): 3136-3137.
- Nakagawa, M., Kato, S., Kataoka, S., Kodato, S., Watanabe, H., Okajima, H., Hino, T., Witkop, B. **(1981)**. Dye-sensitized photooxygenation of tryptophan: 3a-hydroperoxypyrroloindole as a labile precursor of formylkynurenine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29(4): 1013-1026.
- Nakagawa, M., Watanabe, H., Kodato, S., Okajima, H., Hino, T., Flippen, J. L., Witkop, B. **(1977)**. A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine - 25 years later. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(11): 4730-4733.
- Nakagawa, M., Yoshikawa, K., Hino, T. **(1975)**. The photosensitized oxygenation of Nb-methyltryptamine. *Journal of the American Chemical Society* 97(22): 6496-6501.
- Nakamura, H., Goto, T. **(1979a)**. Preferential conformation for intra-molecular exciplex formation in chemi-luminescence of the dioxetanes, 1-(1-substituted-3-indolyl)-6-aryl-2,5,7,8-tetraoxabicyclo[4.2.0]octanes. *Chemistry Letters*(10): 1231-1234.
- Nakamura, H., Goto, T. **(1979b)**. Studies on aminodioxetanes as a model of bioluminescence intermediates - 1-(1-methyl-3-indolyl)-6-phenyl-2,5,7,8-tetraoxabicyclo[4,2,0]octane, an aminodioxetane resulting in efficient ultraviolet and exciplex chemi-luminescence. *Photochemistry and Photobiology* 30(1): 27-33.
- Nantes, I. L., Bechara, E. J. H., Cilento, G. **(1996)**. Horseradish peroxidase-catalyzed generation of acetophenone and benzophenone in the triplet state. *Photochemistry and Photobiology* 63(6): 702-708.
- Nardello, V., Aubry, J. M. **(2000)**. Measurement of photogenerated singlet oxygen in aqueous media. *Methods in Enzymology* 319: 50-58.
- Niles, J. C., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. **(2001)**. Spiroiminodihydantoin is the major product of the 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue. *Organic Letters* 3(7): 963-966.
- 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.
- Oliveira, O. M., Haun, M., Duran, N., O'Brien, P. J., O'Brien, C. R., Bechara, E. J., Cilento, G. (1978). Enzyme-generated electronically excited carbonyl compounds, acetone phosphorescence during the peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of isobutanol. *Journal of Biological Chemistry* 253(13): 4707-4712.
- Parker, N. R., Jamie, J. F., Davies, M. J., Truscott, R. J. W. (2004). Protein-bound kynurenine is a photosensitizer of oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine* 37(9): 1479-1489.
- Parola, A. H., Rose, A. W., Cohen, S. G. (1975). Effects of concentration of amine and of medium in photoreduction of ketones by amines. *Journal of the American Chemical Society* 97(21): 6202-6209.
- Pierlot, C., Aubry, J., Briviba, K., Sies, H., Di Mascio, P. (2000). Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods in Enzymology* 319: 3-20.
- Pierlot, C., Hajjam, S., Bathelemy, C., Aubry, J.-M. (1996). Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (1O_2 , $^1\Delta_g$) carriers for biological media. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 36(1): 31-39.
- Pileni, M. P., Walrant, P., Santus, R. (1976a). Electronic properties of *N*-formylkynurenine and related compounds. *Journal of Physical Chemistry* 80(16): 1804-1809.
- Pileni, M. P., Walrant, P., Santus, R. (1976b). On a possible excited-state proton-transfer in *N*-formylkynurenine derivatives. *Chemical Physics Letters* 42(1): 89-92.
- Posadaz, A., Biasutti, A., Casale, C., Sanz, J., Amat-Guerri, F., Garcia, N. (2004). Rose Bengal-sensitized photooxidation of the dipeptides L-tryptophyl-L-phenylalanine, L-tryptophyl-L-tyrosine and L-tryptophyl-L-tryptophan: kinetics, mechanism and photoproducts. *Photochemistry and Photobiology* 80: 132-138.
- Raoul, S., Cadet, J. (1996). Photosensitized reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Identification of 1-(2-deoxy-beta-D-erythro-pentofuranosyl)cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product. *Journal of the American Chemical Society* 118(8): 1892-1898.
- 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(12): 3702-3709.
- Richardson, W. H., Montgomery, F. C., Yelvington, M. B., O'Neal, H. E. (1974). Kinetics of the thermal decomposition of 3,3-diphenyl- and 3,3-dibenzyl-1,2-dioxetane. Consideration of stepwise and concerted mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* 96(24): 7525-7532.
- Russell, G. A. (1957). Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals. *Journal of American Chemical Society* 79: 3871-3877.

-
- Saito, I., Matsuura, T., Nakagawa, M., Hino, T. (1977). Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives. *Accounts of Chemical Research* 10(9): 346-352.
- Santa Cruz, T. D., Akins, D. L., Birke, R. L. (1976). Chemiluminescence and energy transfer in systems of electrogenerated aromatic anions and benzoyl peroxide. *Journal of the American Chemical Society* 98(7): 1677-1682.
- Savage, W. E. (1975). New oxidation-products of tryptophan. *Australian Journal of Chemistry* 28(10): 2275-2287.
- Scandola, F., Balzani, V., Schuster, G. B. (1981). Free-energy relationships for reversible and irreversible electron-transfer processes. *Journal of the American Chemical Society* 103(10): 2519-2523.
- Schaefer, C. G., Peters, K. S. (1980). Picosecond dynamics of the photoreduction of benzophenone by triethylamine. *Journal of the American Chemical Society* 102(25): 7566-7567.
- Schuster, G., Horn, K. (1982). Chemically initiated electron-exchange luminescence. *Chemical and Biological Generation of Excited States*. Adam, W., Cilento, G. New York, Academic Press: 229-307.
- Schuster, G. B., Dixon, B., Koo, J. Y., Schmidt, S. P., Smith, J. P. (1979). Chemical mechanisms of chemi-luminescence and bioluminescence - reactions of high-energy content organic-compounds. *Photochemistry and Photobiology* 30(1): 17-26.
- Sheu, C., Foote, C. S. (1993). Endoperoxide formation in a guanosine derivative. *Journal of the American Chemical Society* 115(22): 10446-10447.
- Sheu, C., Foote, C. S. (1995a). Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine (8-hydroxyguanosine) formed by photooxidation of a guanosine derivative. *Journal of the American Chemical Society* 117(24): 6439-6442.
- Sheu, C. M., Foote, C. S. (1995b). Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative - formation of dioxetane and hydroperoxide intermediates. *Journal of the American Chemical Society* 117(1): 474-477.
- Simat, T. J., Steinhart, H. (1998). Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(2): 490-498.
- Simon, J. D., Peters, K. S. (1981). Solvent effects on the picosecond dynamics of the photoreduction of benzophenone by aromatic amines. *Journal of the American Chemical Society* 103(21): 6403-6406.
- Steenken, S., Jovanovic, S. V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* 119(3): 617-618.
-

- Steinbeck, M., Khan, A., Karnovsky, M. **(1992)**. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *Journal of Biological Chemistry* 267(19): 13425-13433.
- Straight, R. C., Spikes, J. D. **(1985)**. Photosensitized oxidation of biomolecules. *Singlet O₂*. Frimer, A. A., CRC Press; Boca Raton. IV: 91-143.
- Sugiyama, N., Akutagaw, M., Yamamoto, H. **(1968)**. Chemiluminescence of indole derivatives.3. On mechanism of chemiluminescence of 2,3-dimethylindole and 5-substituted-2,3-dimethylindoles in dimethyl sulfoxide-alkali system. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 41(4): 936-&.
- Sugiyama, N., Akutagaw.M, Gasha, T., Saiga, Y., Yamamoto, H. **(1967)**. Chemiluminescence of indole derivatives.1. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 40(2): 347-&.
- Sundberg, V. R. J. **(1970)**. The chemistry of indoles. *Organic Chemistry, a Series of Monographs*. New York - London, Academic Press. 18: 289.
- Sysak, P., Foote, C., Ching, T.-Y. **(1977)**. Chemistry of singlet oxygen-XXV. Photooxygenation of methionine. *Photochemistry and Photobiology* 26(1): 19-27.
- Taylor, D. M., Gibbs, B. F., Kabashi, E., Minotti, S., Durham, H. D., Agar, J. N. **(2007)**. Tryptophan 32 potentiates aggregation and cytotoxicity of a copper/zinc superoxide dismutase mutant associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 282(22): 16329-16335.
- Terao, J., Hirota, Y., Kawakatsu, M., Matsushita, S. **(1981)**. Structural-analysis of hydroperoxides formed by oxidation of phosphatidylcholine with singlet oxygen. *Lipids* 16(6): 427-432.
- Terao, J., Matsushita, S. **(1977)**. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty-acid esters. *Journal of the American Oil Chemists Society* 54(6): 234-238.
- Tomita, M., Irie, M., Ukita, T. **(1969)**. Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. *Biochemistry* 8(12): 5149-5160.
- Turro, N. **(1991)**. *Modern Molecular Photochemistry*. Sausalito, CA, University Science Books. 628p.
- Turro, N. J., Chow, M. F. **(1981)**. Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects. *Journal of the American Chemical Society* 103(24): 7218-7224.
- Vazquez, S., Aquilina, J. A., Jamie, J. F., Sheil, M. M., Truscott, R. J. W. **(2002)**. Novel protein modification by kynurenine in human lenses. *Journal of Biological Chemistry* 277(7): 4867-4873.
- Vazquez, S., Truscott, R. J., O'Hair, R. A., Weimann, A., Sheil, M. M. **(2001)**. A study of kynurenine fragmentation using electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 12(7): 786-794.

- Vidigal, C. C., Zinner, K., Duran, N., Bechara, E. J., Cilento, G. **(1975)**. Generation of electronic energy in the peroxidase catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 65(1): 138-145.
- Wasserman, H. H., Terao, S. **(1975)**. Enamine singlet oxygen reactions - alpha-diketones from intermediate amino dioxetanes. *Tetrahedron Letters*(21): 1735-1738.
- Wilkinson, F., Helman, W. P., Ross, A. B. **(1995)**. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 24(2): 663-1021.
- Wilson, T., Schaap, A. P. **(1971)**. Chemiluminescence from cis-diethoxy-1,2-dioxetane. Unexpected effect of oxygen. *Journal of the American Chemical Society* 93(17): 4126-4136.
- Wright, A., Bubbs, W. A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. **(2002)**. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochemistry and Photobiology* 76(1): 35-46.
- Wright, A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. **(2003)**. Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. *Free Radical Biology and Medicine* 34(6): 637-647.
- Ximenes, V. F., Campa, A., Catalani, L. H. **(2001a)**. The oxidation of indole derivatives catalyzed by horseradish peroxidase is highly chemiluminescent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 387(2): 173-179.
- Ximenes, V. F., Catalani, L. H., Campa, A. **(2001b)**. Oxidation of melatonin and tryptophan by an HRP cycle involving compound III. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287(1): 130-134.
- Ximenes, V. F., Silva, S. d. O., Rodrigues, M. R., Catalani, L. H., Maghazal, G. J., Kettle, A. J., Campa, A. **(2005)**. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry* 280(46): 38160-38169.
- Yamazaki, S., Ozawa, N., Hiratsuka, A., Watabe, T. **(1999)**. Photogeneration of 3 β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide in rat skin: evidence for occurrence of singlet oxygen in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 27(3-4): 301-308.
- Zaklika, K. A., Kissel, T., Thayer, A. L., Burns, P. A., Schaap, A. P. **(1979)**. Mechanisms of 1,2-dioxetane decomposition - role of electron-transfer. *Photochemistry and Photobiology* 30(1): 35-44.
- Zhang, H., Andrekopoulos, C., Joseph, J., Chandran, K., Karoui, H., Crow, J. P., Kalyanaraman, B. **(2003)**. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: Intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. *Journal of Biological Chemistry* 278(26): 24078-24089.

- Zhang, H., Andrekopoulos, C., Joseph, J., Crow, J., Kalyanaraman, B. **(2004a)**. The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 36(11): 1355-1365.
- Zhang, H., Joseph, J., Crow, J., Kalyanaraman, B. **(2004b)**. Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine* 37(12): 2018-2026.
- Zhang, X. J., Foote, C. S., Khan, S. I. **(1993)**. Reactions of *N*-acylated indoles with singlet oxygen. *Journal of Organic Chemistry* 58(1): 47-51.
- Zimmerman, H. E., Keck, G. E., Pflederer, J. L. **(1976)**. Molecular rearrangements of excited states generated by intramolecular dioxetane scission. Photochemistry without light. Mechanistic and exploratory organic photochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 98(18): 5574-5581.
-

APÊNDICES

Apêndice A - Espectros de RMN (^1H ; COSY; HMBC) do WOH *trans* Figura A.1 Espectro de RMN de ^1H do WOH *trans*, em D_2O .

Figura A.2 Espectro de RMN COSY da mistura contendo WOH *trans* e R,S DiOia (contaminação), em D₂O.

Figura A.3 Espectro de RMN HMBC do WOH *trans*.

Apêndice B - Espectros de RMN (^1H ; COSY; HMBC) do WOH *cis*

Figura B.1 Espectro de ^1H do WOH *cis*.

Figura B.2 Espectro de RMN COSY da mistura contendo WOH *cis* e R,R DiOia (contaminação), em D₂O.

Figura B.3 Espectro de RMN HMBC do WOH *cis*.

Apêndice C - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR) do WOOH *trans* Figura C.1 Espectro de RMN de ^1H do WOOH *trans*, em D_2O .

Figura C.2 Espectro de RMN de ^{13}C do WOOH *trans*, em D₂O.

Figura C.3 Espectro de RMN COSY do WOOH *trans*, em D₂O.

Figura C.4 Espectro de RMN HETCORR do WOOH *trans*, em D₂O.

Apêndice D - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; COSY; HETCORR) do WOOH *cis* Figura D.1 Espectro de RMN de ^1H do WOOH *cis*, em D_2O .

Figura D.2 Espectro de RMN de ^{13}C do WOOH *cis*, em D_2O .

Figura D.3 Espectro de RMN COSY do WOOH *cis*, em D₂O.

Figura D.4 Espectro de RMN HETCORR do WOOH *cis*, em D_2O .

Apêndice E - Espectro de RMN (^1H) da FMK

Figura E.1 Espectro de RMN de ^1H da FMK, em D_2O .

Apêndice F - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; HSQC) da R,S DiOia Figura F.1 Espectro de RMN de ^1H da R,S DiOia, em D₂O.

Figura F.2 Espectro de RMN de ^{13}C da R,S DiOia, em D_2O .

Figura F.3 Espectro de RMN HSQC da R,S DiOia, em D_2O .

Apêndice G - Espectros de RMN (^1H ; ^{13}C ; HSQC) da R,R DiOia Figura G.1 Espectro de RMN de ^1H da R,R DiOia, em D₂O.

Figura G.2 Espectro de RMN de ^{13}C da R,R DiOia, em D₂O.

Figura G.3 Espectro de RMN HSQC da R,R DiOia, em D₂O.