UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

CAMILA MARINHO MANO

**Espécies Excitadas Tripletes em Sistemas
Biológicos – Visita à Hipótese de
“Fotobioquímica no Escuro” de Giuseppe Cilento**

**Versão Corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de
Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
21/10/2013

CAMILA MARINHO MANO

**Espécies Excitadas Tripletes em Sistemas
Biológicos – Visita à Hipótese de
“Fotobioquímica no Escuro” de Giuseppe Cilento**

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

Orientador (a): Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

São Paulo

2013

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Angela e João,
e minhas irmãs, Carina e Caroline

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao prof. Etelvino Bechara pela oportunidade, pelas discussões, sugestões. Mas agradeço, principalmente, pela orientação direcionadora, mas que me possibilitou explorar a formulação das minhas hipóteses dentro do trabalho proposto.

Agradeço também ao prof. Paolo Di Mascio pela possibilidade de trabalhar em seu laboratório quando a mudança do laboratório do professor Etelvino foi necessária, me permitindo realizar diversos experimentos e possibilitando a aprendizagem de sua linha de pesquisa.

Agradeço ao prof. Douglas Brash do *Department of Therapeutic Radiology* de *Yale University* pela oportunidade de realizar o estágio em seu laboratório que, mesmo sendo na área de genética, me permitiu utilizar parte da pesquisa *in vitro* que realizei durante o doutorado para tentar explicar um fenômeno que ele observou em sua pesquisa em melanócitos e também pelas diversas dicas, conversas e experiências. Também agradeço ao Dr. Sanjay Premi e ao Dr. Viswanathan Muthusamy pela paciência e ensinamentos no trabalho com melanócitos.

Gostaria de agradecer meus amigos e colegas de laboratório, com quem compartilhei momentos de alegria, conhecimento, conversas, alguns momentos de apreensão e muito companheirismo, Julio Massari, Alexsandra Scalfò, Adriano Sartori, Tatiana Veríssimo, Marilene Oliveira, Angelica Sanchez, Florêncio Freitas, Flávia Motta, Olivia Domingues, Luiz Fernando Mendes, Anderson Oliveira, Emerson Marques, Nilson Assunção e Douglas Ganini. Deixo um agradecimento especial à Rita Tokikawa e à Chrislaine Soares pela grande amizade que podemos compartilhar.

Agradeço às conversas de colegas e amigos de outros laboratórios e com quem dividi algum tempo de representação discente: Carolina Romagna, Bruno Queliconi, Heloísa Rosa, Ariel Cardoso, Graciele Oliveira, Thiago Lopes, Adriana Silva, Ana Carolina Soares, Eric Tavares, Fabio Kendi, Guto Chaves, Rodrigo Rafagnin, Tatiana Polotow, Willian Hermoso.

Também agradeço à grande ajuda que é dada diariamente pelas técnicas Adriana Wendel, Agda Bertolucci, Dóris Dias Araújo, Dra. Fernanda Manso Prado, Dra. Isaura Toma.

Agradeço a todos os colegas que não foram mencionados nominalmente.

Também agradeço a todas as filósofas, cientistas, matemáticas e inventoras, famosas ou anônimas que, antes de mim, inovaram e continuam inovando em áreas que antes mulheres não tinham autorização para atuar. Não fosse pelo esforço destas mulheres, talvez não fosse possível que eu pudesse ter elaborado este trabalho.

Agradeço ao Rodrigo Martins especialmente pela ajuda, carinho e companheirismo

Por fim, agradeço à FAPESP pelo suporte financeiro destinado à elaboração desta pesquisa.

It has often and confidently been asserted, that man's origin can never be known: but ignorance more frequently begets confidence than does knowledge: it is those who know little, and not those who know much, who so positively assert that this or that problem will never be solved by science.

Charles Darwin, 1871

RESUMO

Mano, C.M. **Espécies Excitadas Tripletes em Sistemas Biológicos – Visita a Hipótese de “Fotobioquímica no Escuro” de G. Cilento**. 2013. 102 páginas. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Espécies carbonílicas tripletes formadas quimicamente no escuro, por exemplo, durante a peroxidação de lipídios, têm reatividade química análoga à de radicais alcoxilas. Aventou-se que tais espécies possam estar implicadas na fisiopatologia de doenças degenerativas (“estresse carbonílico”). A pesquisa dos efeitos de espécies tripletes sobre algumas biomoléculas e consequentes respostas biológicas, propostas e pesquisadas no período 1970 - 1990 (hipótese de “fotoquímica sem luz” dos Profs. G. Cilento, IQUSP, e Emil H. White, Johns Hopkins University), encontrou empecilhos instrumentais e relativamente poucas propostas foram confirmadas. Com o uso de técnicas de alta resolução, tais como EPR, HPLC e MS, este trabalho teve como objetivo analisar intermediários e produtos de tais processos e estudar mecanismos de reação de acetona triplete, produzida quimicamente pela decomposição térmica de 3,3,4,4-tetrametildioxetano (TMD) ou, enzimaticamente, pela oxidação aeróbica de isobutanal (IBAL), catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP), na presença de aminoácidos e proteínas. Este trabalho demonstra a formação de um radical acetila, presumidamente formado da clivagem α de acetona triplete, e um radical terciário centrado em carbono, formado pela abstração de hidrogênio do IBAL. Resultados de espectrometria de massas demonstraram a formação de três diferentes adutos entre o radical terciário de IBAL, com L-Trp. Aventou-se que um dos produtos era resultante de alteração no nitrogênio e os outros no carbono 3, ambos no anel indólico. Observou-se também a formação de produto correspondente ao radical hidroxipropionil com L-Trp. Também se observaram dois produtos de L-Trp típicos de sua oxidação por oxigênio singlete, a formilquinurenina, e um aduto de função álcool. A formação de base de Schiff entre o L-Trp estudado e o IBAL também é apresentada. A formação de oxigênio singlete foi evidenciada indiretamente via EPR utilizando o spin trap TEMP e através de um captador de adição-9,10 (tipo Diels-Alder) em derivado de antraceno. Foram realizados, também, experimentos com precursores de melanina e demonstrou-se a formação de espécies excitadas do ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) que poderiam explicar a formação de produtos de DNA tipicamente resultantes de reação fotoquímica, mas na ausência de luz. Tais resultados corroboram a reação de espécies tripletes com biomoléculas, possibilitando a compreensão de número significativo de eventos biológicos conhecidos, mas teoricamente “proibidos” de ocorrer no estado fundamental, em tecidos não expostos à luz.

Palavras-chave: Acetona triplete; Fotoquímica sem luz; Triptofano; Oxigênio singlete; Espécies reativas de oxigênio; Isobutanal.

ABSTRACT

Mano, C.M. **Triplet Excited Species in Biological Systems – A visit to the “Photobiochemistry without light” Hypothesis from G. Cilento**. 2013. 102 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Electronically excited triplet carbonyl species formed as products of some biochemical reactions, such as lipid peroxidation, behave similarly as alcoxyl radicals. It has long been hypothesized that such excited species could have a role in some diseases (“carbonyl stress”). Research of chemical lesions of triplet carbonyls over biomolecules and their biological response took place principally from 1970 to 1990 (the “photochemistry without light” hypothesis proposed by Profs. G. Cilento, IQUSP, and Emil H. White, Johns Hopkins University), but it suffered from the lack of required instrumentation, and just few cases of photo(bio)chemistry without light were confirmed. The aim of this work, using high resolution techniques (EPR, HPLC, and MS), is to analyze the reaction products of excited triplet acetone with amino acid and protein targets. Triplet acetone was produced from the thermal decomposition of 3,3,4,4-tetramethyldioxetane (TMD) or from the aerobic oxidation of isobutanol (IBAL) catalyzed by horseradish peroxidase (HRP). We revealed the generation of acetyl radical, putatively originated from α -cleavage of triplet acetone, and a carbon-centered tertiary radical, proposed as an IBAL radical formed by hydrogen abstraction from IBAL. Mass spectrometry showed production of three adducts from the reaction of IBAL radical with L-Trp, one of them at the nitrogen 1 and the other two at carbon 3 from the amino acid indole ring. Two adducts with m/z correspondent to the reaction between L-Trp (at carbon 3) and a hydroxypropionyl radical, and two products typically formed from singlet oxygen (formylkynurenine and an alcohol L-Trp adduct) were also observed. A Schiff base between L-Trp and IBAL was also observed. Singlet oxygen production from triplet-triplet energy transfer from excited acetone to ground state molecular oxygen was indirectly showed by EPR spin trapping with TEMP, and by MS using the anthracene derivative EAS to trap (9,10-cycloaddition) of $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$). Other data reported here include the demonstration of excited species formed when DHICA, a melanin precursor, was oxidized. These results might explain the generation of DNA photochemical products (thymine dimers) in the absence of light. Altogether, we collect strong and significant evidence in this thesis that corroborate the reactivity of triplet excited species with a couple of biomolecules, providing insights over some reportedly known molecular events that are theoretically forbidden to occur in the ground state but happen in tissues non-exposed to light.

Keywords: Triplet acetone; Photochemistry without light; Tryptophan; Singlet oxygen; Reactive oxygen species, Isobutanol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$:	Oxigênio molecular singlete
5OHCA:	Ácido 5-hidroxi-indolil acético
5SC:	5-S-Cisteinildopa
CPD:	Dímero ciclobutânico de pirimidina
DABCO:	1,4-Diazabicyclooctano
DBA:	9,10-Dibromoantraceno
DBAS:	9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato
DHICA:	Ácido dihidroxi-indol acético
DMPO:	5,5-Dimetilpirrolina-1-óxido
DTPA:	Ácido dietileno triamina pentacético
EAS:	9,10-Di-ildietano-antraceno
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra acético
FMK:	Formilquinurenina
HOMO:	Mais alto orbital molecular ocupado (<i>highest occupied molecular orbital</i>)
HRP:	Peroxidase de raiz forte
IBAL:	Isobutiraldeído (2-metilpropanal)
LUMO:	Mais baixo orbital molecular não ocupado (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
MNP:	2-Metil-2-nitrosopropano
PUFA:	Ácidos graxos poli-insaturados
S₀:	Estado fundamental singlete
S₁:	Primeiro estado excitado singlete
Sorbato:	Ácido 2,4-hexadienóico
T₁:	Primeiro estado excitado triplete
TEMP:	2,2,6,6-Tetrametil-4-piperidona
TEMPOL:	4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidona-1-oxil
TMD:	3,3,4,4-Tetrametil-1,2-dioxetano
TPA:	12- α -Tetradecanoilforbol-13-acetato

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquematização demonstrando as diferentes transformações fotofísicas e fotoquímicas que podem resultar da excitação de um composto químico
- Figura 2:** Esquema de configuração eletrônica de compostos orgânicos nos estados fundamental e excitados.
- Figura 3:** Esquema da decomposição térmica de 1,2-dioxetanos
- Figura 4:** Oxidação de luciferina de coleópteros bioluminescentes
- Figura 5:** Mecanismos propostos para a decomposição térmica de 1,2-dioxetano
- Figura 6:** Esquema apresentando alguns fenômenos envolvendo estados excitados
- Figura 7:** Exemplo de reações que poderiam ocorrer através da fotoquímica no escuro
- Figura 8:** Esquema de possíveis destinos de um composto carbonílico formado no estado triplete em sistemas biológicos
- Figura 9:** Esquema da reação de oxidação de isobutanal catalisada pela peroxidase de raiz forte
- Figura 10:** Esquema de possíveis fontes biológicas de carbonilas excitadas
- Figura 11:** Esquema representando a estrutura e o ciclo de reações catalisados pela HRP.
- Figura 12:** Formação de dímeros de ciclobutano de pirimidina
- Figura 13:** Variações espectrais (UV-Visível) de HRP incubado com IBAL durante 50 min a 37°C
- Figura 14:** Variações espectrais de HRP incubado com IBAL
- Figura 15:** Variação temporal de absorbância dos máximos em 400 nm, 410 nm e 420 nm de HRP incubado com IBAL
- Figura 16:** Cinética da variação de absorbância dos máximos em 400 nm, 410 nm e 420 nm de HRP incubado com IBAL
- Figura 17:** Géis de acrilamida 12 % (SDS-Page) da HRP
- Figura 18:** Densitometria das bandas dos géis de SDS-Page da HRP
- Figura 19:** Gel de acrilamida 12% (SDS-Page) da HRP
- Figura 20:** Gráficos da emissão de luz no sistema IBAL/O₂/HRP em tampão fosfato pH 7,4
- Figura 21:** Consumo de O₂ na presença de HRP e diferentes concentrações de IBAL
- Figura 22:** Espectros de EPR de adutos do MNP gerados após 1 min de incubação com HRP e IBAL
- Figura 23:** Simulação do espectro de EPR obtido após 15 min da preparação do meio de reação contendo MNP, HRP e IBAL
- Figura 24:** Comparação entre o espectro após incubação de solução contendo MNP, HRP e IBAL, com espectros controles.
- Figura 25:** Comparação entre o espectro obtido após incubação de solução contendo MNP, HRP e IBAL, com os espectros obtidos com a adição de sorbato
- Figura 26:** Espectros e simulação de EPR de DMPO obtidos após incubação com HRP e IBAL
- Figura 27:** Luminescência resultante da decomposição térmica do TMD
- Figura 28:** Espectros e simulação de EPR de TEMP obtidos após incubação com HRP e IBAL
- Figura 29:** Cromatograma controle de separação por HPLC em fase reversa de EAS
- Figura 30:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com TMD em atmosfera enriquecida com ¹⁸O₂
- Figura 31:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com TMD
- Figura 32:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com

IBAL/HRP em atmosfera enriquecida com $^{18}\text{O}_2$

- Figura 33:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com IBAL/HRP
- Figura 34:** Luminescência resultante da decomposição térmica do TMD
- Figura 35:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com TMD na presença ou ausência de sorbato
- Figura 36:** Cromatograma de separação por HPLC em fase reversa de EAS incubado com IBAL/HRP na presença ou ausência de sorbato
- Figura 37:** Quimioluminescência resultante da decomposição térmica do TMD
- Figura 38:** Emissão de luz obtida durante a incubação de IBAL com HRP na presença de L-Ser, L-Thr e L-Lys
- Figura 39:** Emissão de luz obtida durante a incubação de IBAL com HRP na presença de L-His, L-Cys, L-Trp e L-Tyr
- Figura 40:** Consumo de O_2 na presença de HRP, IBAL e diferentes concentrações de L-His, L-Cys, L-Trp e L-Tyr
- Figura 41:** Cromatografia HPLC de solução de L-Trp na presença e ausência do sistema enzimático de geração de acetona triplete
- Figura 42:** Separação por HPLC dos produtos de solução de L-Trp incubada em tampão fosfato com IBAL e HRP
- Figura 43:** Cromatografia de seleção de m/z 221 correspondente ao WOH
- Figura 44:** Cromatografia de seleção de m/z 237 correspondente ao FMK
- Figura 45:** Cromatografia de seleção de m/z 259 correspondente a base de Schiff do L-Trp
- Figura 46:** Cromatografia de seleção de m/z 263 correspondente ao Trp oxidado por radical hidroxipropionil
- Figura 47:** Cromatografia de seleção de m/z 275 correspondente ao L-Trp oxidado pelo radical do IBAL
- Figura 48:** Cromatografia de solução de L-Trp incubada em tampão fosfato com TMD
- Figura 49:** Quadro mostrando a diferença das massas observadas através da técnica de MS de alta resolução e as massas teóricas de cada um dos produtos propostos
- Figura 50:** Resumo das correlações entre massa observada e fragmentos perdidos determinados para os produtos de oxidação do L-Trp
- Figura 51:** Gel de eletroforese de HRP incubada com IBAL, sob fluxo contínuo de O_2 , na presença de diferentes concentrações de L-Trp
- Figura 52:** Densitometria de bandas de gel de eletroforese de HRP incubada com IBAL, sob fluxo contínuo de O_2 , na presença de diferentes concentrações de L-Trp
- Figura 53:** Proposta mecanística dos estudos da oxidação de IBAL catalisada por HRP na presença de L-Trp
- Figura 54:** Quantificação de CPD após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA 75 kJ/m^2 .
- Figura 55:** Quantificação de CPD após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA em diferentes amostras contendo o sequestrador de ânion radical superóxido, o TEMPOL
- Figura 56:** Teste de TBARs para determinação de lipoperoxidação após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA 75 kJ/m^2
- Figura 57:** Quimioluminescência do DBAS em lisados de melanócitos C57BL/6
- Figura 58:** Quantificação de CPD no experimento de reconstituição *in vitro*
- Figura 59:** Quimioluminescência do DBAS em suspensões contendo melanina sintética, desafiada com HRP e H_2O_2
- Figura 60:** Quimioluminescência do DBAS em soluções contendo DHICA ou 2SCD, desafiados com HRP e H_2O_2

- Figura 61:** Quimioluminescência do DBAS em soluções contendo ou DHICA, desafiados com HRP e H_2O_2
- Figura 62:** Propostas de oxidação do DHICA que poderiam resultar na formação de um dioxetano, com consequente formação de espécie excitada
- Figura 63:** Cromatografia de DHICA
- Figura 64:** Cromatografia de DHICA incubada com HRP e H_2O_2
- Figura 65:** Cromatografia de DHICA incubado com HRP e H_2O_2 por 1 h
- Figura 66:** Quimioluminescência do DBAS em soluções contendo 5OHCA, desafiados com HRP e H_2O_2

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Breve histórico e introdução sobre fotoquímica	14
1.2. Quimioluminescência e bioluminescência	17
1.3. A hipótese da “fotoquímica sem luz”	20
1.4. Descobertas realizadas após a proposta da “fotoquímica sem luz”	23
1.5. A Peroxidase de raiz forte	25
1.6. O oxigênio singlete na “fotoquímica sem luz”	26
1.7. Danos em biomoléculas causados por carbonilas tripletes	28
1.8. Possível envolvimento da “fotoquímica sem luz” em tecidos contendo melanina	29
1.9. As perspectivas atuais da “fotoquímica sem luz”	31
2. Objetivo geral	33
3. Objetivos específicos	33
3.1. Verificação de alterações estruturais na HRP causadas pela incubação com IBAL	33
3.2. Avaliação dos efeitos de carbonilas tripletes sobre triptofano	33
3.3. Detecção de oxigênio singlete gerado por acetona triplete	33
3.4. Investigação de produtos derivados de espécies excitadas precursores de melanina	33
4. Materiais e métodos	34
4.1. Preparo de soluções e outros reagentes	34
4.2. Síntese de 3,3,4,4-tetrametil-1, 2-dioxetano	34
4.3. Espectrofotometria UV-Visível	34
4.4. Eletroforese em gel	35
4.5. Determinação de quimioluminescência	35
4.6. Determinação de consumo de oxigênio	35
4.7. EPR <i>spin trapping</i> (captação de spin)	36
4.8. Análise de adutos de L-Trp por MS	36
4.9. Quimioluminescência do oxigênio singlete e de precursores de melanina	36
4.10. Análise de adutos DHICA por MS	37
4.11. Cultura de células, irradiação e análise de CPD	38
4.12. Captação química de $^1\text{O}_2$ por EAS	39
4.13. Determinação de EASO_2 por HPLC-MS/MS	39
4.14. Avaliação de Resultados	40
5. Resultados e discussão	41
5.1. Alterações estruturais em HRP durante a Incubação com IBAL e formação de espécies excitadas	41
5.2. Detecção dos radicais formados no sistema HRP/ O_2 /IBAL através de EPR utilizando MNP como captador de spin.	48
5.3. Detecção de $^1\text{O}_2$ gerado a partir de fontes enzimática e química de acetona	

triplete	53
5.4. Estudo do efeito de aminoácidos sobre a emissão de luz no sistema HRP/O ₂ /IBAL	66
5.5. Determinação de produtos de oxidação de L-Trp por geradores de acetona triplete	69
5.6. Geração de espécies excitadas tripletes por moléculas precursoras de melanina	79
6. Considerações finais	92
7. Referências bibliográficas	95
Lista de Anexos	105

1. Introdução

1.1. Breve histórico e introdução sobre fotoquímica

A inegável importância da interação entre luz e matéria para o desenvolvimento da vida justifica diversos estudos, alguns investigados pela fotoquímica. Dentre os fenômenos que exemplificam esta importância, pode-se mencionar a necessidade da energia solar para realização de processos biológicos fundamentais, como a fotossíntese e o fototropismo, e na ausência de luz, a bioluminescência. Esta pode ser brevemente caracterizada como a emissão de luz visível e fria por organismos vivos. Descrições sobre bioluminescência remontam a 1500 a 1000 a.c. na China, sendo que o primeiro texto científico sobre este assunto foi escrito por Conrad Gesner em 1555, sob o título que pode ser traduzido do latim para inglês como *“On the rare and marvelous plants that are called lunar either because they shine at night or for other reasons; and also on the other things that shine in darkness”* (Campbell, 1988).

Durante o período em que se iniciaram as publicações sobre reações fotoquímicas, entre 1850 a 1920 aproximadamente, elas tinham caráter descritivo, mas tais reações e suas aplicações só começaram a ser compreendidas após o advento da mecânica quântica (Turro, 1967). Os conceitos iniciais sobre a fotoquímica apareceram partir de 1950, através de estudos realizados por T. Förster, M. Kasha, G. Porter, H. Zimmerman, N. J. Turro, entre outros pesquisadores (Klán, 2009).

Desde o início das pesquisas fotoquímicas, como a descrição dos produtos de reação fotoquímica realizadas por E. Paternó ou por G.L. Ciamician, a ampliação do conhecimento sobre processos fotoquímicos cresceu com desenvolvimento de diversas técnicas de síntese orgânica, espectroscópicas e, recentemente, do desenvolvimento computacional para, por exemplo, aquisição de produtos por diferentes rotas e de possíveis intermediários de reação fotoquímica para análise ou estudo do tempo de vida dos compostos excitados (Turro, 1967; Klán, 2009).

Com desenvolvimento dos estudos fotoquímicos foi possível compreender diversos processos biológicos, normais e patológicos, que envolvem a interação entre luz e biomoléculas, tais como transdução de sinal em diferentes células fotorreceptoras, fotossíntese, fototropismo, fototaxia, fotoperiodismo, bioluminescência, fototoxicidade, ação fotodinâmica, ritmos circadianos e produção de pigmentos de proteção de epiderme, entre outros.

Sumariamente, pode-se dizer que processos fotoquímicos ocorrem através de dois eventos, (1) a absorção de radiação eletromagnética por um composto químico, levando-o ao estado eletronicamente excitado e (2) reações uni- ou bimoleculares de compostos no estado excitado, gerando diferentes produtos. Porém reações fotoquímicas competem com outros processos físicos, tais como supressão (*quenching*) física ou relaxação vibracional, que podem ocorrer mais rapidamente do que os processos fotoquímicos dependendo das características do composto excitado. Diferentes processos resultantes da excitação de um composto podem ser sumarizados na figura 1 (Turro, 1967).

Figura 1: Esquema das diferentes transformações fotofísicas e fotoquímicas que podem resultar da excitação de um composto químico (baseado em Turro, 1967).

Quando eletronicamente excitadas, através da absorção de um fóton de comprimento de onda específico, moléculas orgânicas, que usualmente se encontram no estado fundamental singlete (S_0), tem um de seus elétrons promovidos do orbital HOMO (*highest occupied molecular orbital*) a um orbital de maior energia, LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*). Quando o elétron excitado mantém o spin oposto ao do elétron não excitado, então a molécula se encontra no estado eletronicamente excitado singlete de mais baixa energia (S_1). Outro estado excitado menos energético, com spin invertido em LUMO, pode ser obtido – e assim, o estado tripleto T_1 é alcançado –, embora esta conversão seja proibida pela “regra do spin”. O estado T_1 não pode ser atingido diretamente pela absorção de energia luminosa, mas sim através de *cruzamento inter sistema* a partir do estado excitado singlete (Transição $S_1 \rightarrow T_1$), o qual é acelerado pelo chamado

"efeito de átomo pesado" (*heavy atom effect*), tais como bromo e iodo. Neste caso, o elétron já promovido sofre uma inversão de spin, ficando a molécula excitada com dois elétrons de mesmo momento magnético (Cilento, 1988). Um esquema ilustrativo da configuração eletrônica em HOMO e as mudanças ocorridas durante a excitação eletrônica é apresentado na figura 2.

Figura 2: Esquema da configuração eletrônica de compostos orgânicos nos estados fundamental e excitados.

Embora já anteriormente citados de maneira simplificada, compostos eletronicamente excitados apresentam destinos variados (figura 1), por exemplo, o caso da perda de energia com o retorno do elétron para HOMO. Tal perda pode ocorrer através de vibração, gerando calor (fenômenos conhecidos como conversão interna e relaxação vibracional), colisões com moléculas de solvente ou supressores existentes no meio (desativação), ou através da emissão de outro fóton, fenômeno este conhecido como luminescência. O tempo de vida de um composto no estado S_1 é muito curto, menor que 10^{-8} s, enquanto o estado triplete é estável por mais tempo, variando entre 10^{-7} a alguns segundos, ou mesmo minutos e horas, pois este decaimento envolve a inversão de spin, processo proibido. Compostos no estado excitado singlete, quando perdem sua energia através de emissão de radiação eletromagnética – não por relaxação vibracional – são *fluorescentes*, emitindo luz quase imediatamente à sua excitação, enquanto as espécies tripletes emissoras de radiação eletromagnética são mais duradouras e ditas *fosforescentes*.

Outros destinos possíveis para compostos excitados dependem da estrutura da molécula, como a transferência de energia intramolecular, da isomerização e da dissociação, e da estrutura de outras moléculas eventualmente presentes no meio de reação com as quais podem colidir,

como a transferência de energia intermolecular, a reação de substituição ou a supressão (*quenching*).

Ao transferir energia para outra molécula, estas se tornam luminescentes ou capazes de sofrer transformações uni- ou bimolecular. Três formas de transferência de energia podem ocorrer: a) na transferência radiativa, o composto excitado (doador) emite um fóton de luz que é absorvido por outra molécula. Esta desativação ocorre quando há uma sobreposição da banda de emissão do composto eletronicamente excitado e da banda de absorbância da molécula receptora; b) a molécula doadora transfere energia por colisão com a molécula receptora; c) e transferência de Förster, a longa distância (até aproximadamente 100 Å), envolvendo ressonância entre a molécula doadora e a receptora (White *et al.*, 1974). A transferência de energia é, portanto, um processo que compete com a desativação e com o decaimento radiativo do composto excitado.

Desta forma, a diversidade de produtos que podem ser gerados através de reações fotoquímicas torna o estudo destas reações relevante para o entendimento de diversos processos vitais, como a captação de energia solar através da excitação de pigmentos contidos no complexo-antena de plantas (clorofila e carotenoides) ou a reação de isomerização do 11-cis-retinal para 11-trans-retinal, ocorrida pós-excitação e dissociação da rodopsina da retina humana, iniciando uma transdução de sinal neuronal.

1.2. Quimioluminescência e bioluminescência

Todos os fenômenos descritos foram mencionados como iniciados pela absorção de um fóton de radiação eletromagnética por uma molécula, indicando que este seria um passo fundamental para a fotoquímica. Porém moléculas em estado eletronicamente excitado podem ser também obtidas através de reações químicas. Neste caso, intermediários de reação “ricos em energia” tais como peróxidos, cuja homólise O-O requer apenas cerca de 130 kJ.mol⁻¹, se decompõem em produtos, uma fração deles no estado eletronicamente excitado. Estes podem sofrer qualquer uma das transformações já descritas para processos fotofísicos e fotoquímicos. Quando uma reação produz moléculas no estado excitado, que decaem emitindo luz, este fenômeno é conhecido como quimioluminescência. Entre elas, pode-se citar a oxidação de luminol ao diânion aminoftalato excitado e a produção de oxigênio molecular singlete pela reação entre hipoclorito e peróxido de hidrogênio (White *et al.*, 1964; Foote *et al.*, 1968).

Como já se mencionou no início do texto, pesquisas foto(bio)químicas se beneficiaram de avanços em técnicas de síntese orgânica, uma delas realizada por Kopecky e Mumford (1969), na Universidade de Alberta (Canadá): a síntese do 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano. Desde então, vários outros dioxetanos (figura 3) e dioxetanonas (α -peroxilactonas) foram sintetizados e determinadas suas propriedades químicas, cinética de decomposição e rendimentos quânticos de produtos excitados (Adam;Baader, 1985).

1,2-Dioxetanos são peróxidos cíclicos de anel tetraômico que sofrem decomposição térmica, gerando dois produtos carbonílicos, um dos quais pode se encontrar no estado excitado, singlete ou triplete (Figura 3) (Adam;Baader, 1985). O rendimento quântico de produto triplete (Φ^T) dos 1,2-dioxetanos descritos na literatura varia entre 0,1 a 60% (Bechara;Wilson, 1980).

O extraordinário número de dioxetanos e dioxetanonas estudados nos anos 1970's permitiu a elucidação de diversas propriedades destes compostos. Dioxetanos tetrasubstituídos por grupos alquila e fenila são mais estáveis ($E_a > 110 \text{ kJ.mol}^{-1}$) e geram preferencialmente espécies tripletes; os dissustituídos são menos estáveis ($E_a > 87 \text{ kJ.mol}^{-1}$) (Richardson *et al.*, 1978). Dioxetanos com substituintes volumosos, tais como o bis-adamantilideno-dioxetano, são extremamente estáveis ($E_a > 150 \text{ kJ.mol}^{-1}$), enquanto dioxetanonas não são estáveis à temperatura ambiente ($E_a < 70 \text{ kJ.mol}^{-1}$), mas rendem uma fração relativamente maior de espécies singletes, fluorescentes (Richardson;Oneal, 1972; Schuster *et al.*, 1975).

A síntese e descrição das propriedades quimioluminescentes e estabilidade de diferentes 1,2-dioxetanos possibilitou compreender os mecanismos de reações bioluminescentes e identificar fatores eletrônicos e espaciais que governam a formação de singletes e tripletes. Atualmente se sabe sobre diversos organismos que produzem dioxetanos e dioxetanonas como intermediários, por exemplo, o caso da bioluminescência de vaga-lumes (insetos coleópteros das famílias Elateridae, Phengodidae e Lampyridae), em que um intermediário dioxetanônico derivado de um benzotiazol é formado a partir da oxidação dependente de ATP da luciferina, catalisada pela enzima luciferase (figura 4) (Shimomura;Johnson, 1971; Shimomura;Johnson, 1973; Matsumoto, 2004; Bastos *et al.*, 2013).

1,2-Dioxetanos intermediários de reações bioluminescentes apresentam substituintes conjugados, o que favorece a formação de produto excitado no estado S_1 , fluorescente. Ao

contrário, se o produto excitado formado fosse T_1 , fosforescente, ele poderia ser desativado termicamente por colisões com o solvente e com o oxigênio molecular (Adam;Baader, 1985).

Figura 3- Decomposição térmica de 1,2-dioxetanos, gerando dois fragmentos carbonílicos, um deles no estado excitado, predominantemente triplete.

Figura 4 – Oxidação de luciferina de coleópteros bioluminescentes catalisada pela luciferase através de consumo de ATP e O_2 , resultando na emissão de luz na faixa de 520 a 620 nm, dependendo da família de insetos – Lampyridae, Elateridae, Phengodidae (Viviani *et al.*, 2002).

Alguns mecanismos foram propostos para a decomposição térmica de dioxetanos. O mecanismo da formação do dirradical (figura 5A) propõe uma decomposição em duas etapas, em que a ligação O–O se rompe formando um dirradical do dioxetano, antes que a ligação C–C se rompa. O segundo mecanismo proposto (figura 5B) envolve uma quebra concertada das ligações O–O e C–C. Em ambos os casos, a ruptura da ligação O–O envolve a rotação das ligações C–C, “afastando” os átomos de oxigênio (White *et al.*, 1974; Vico *et al.*, 2007).

Um trabalho publicado por Vico *et al.* (2007), realizado com simulações computacionais, descreve cálculos de aumento distância entre a ligação O–O e um aumento na torção em torno da ligação C–C. Após uma distância limítrofe de aproximadamente 2,2 Å da ligação O–O e 1,6 Å da ligação C–C do dioxetano, a distância da ligação C–O diminui, indicando quebra nas ligações O–O e C–C e a formação dos produtos carbonílicos. Assim, trata-se de um mecanismo intermediário entre o dirradicalar e o da ruptura concertada de ligações. Neste mesmo trabalho, foi proposto que

os estados S_0 , S_1 e T_1 apresentam energia muito próxima (sendo quase degenerados) na formação do intermediário da decomposição do 1,2-dioxetano, fornecendo assim uma explicação para a partição da energia de quimioexcitação eletrônica entre singletes e tripletes (Vico *et al.*, 2007).

Além da decomposição térmica que pode resultar na quimioluminescência, dioxetanos sofrem decomposição “escura” aos produtos carbonílicos catalisada por íons de metais de transição (ex., Cu^{2+} , Fe^{3+}), reações de inserção de ácidos de Lewis (ex., trifosfina) seguida da formação do epóxido correspondente, ataque nucleofílico de bases fortes à ligação O-O, entre outras reações (Wilson *et al.*, 1973; Adam;Heil, 1992).

Figura 5 – Mecanismos propostos para a decomposição térmica de 1,2-dioxetano. A- Formação do dirradical; B- Rompimento orquestrado das ligações O-O e C-C (Vico *et al.*, 2007).

1.3. A hipótese da fotoquímica sem luz

Na década de 70, Cilento (IQUSP) e White (Johns Hopkins Univ., USA) propuseram, independentemente, a hipótese de que espécies carbonílicas excitadas tripletes, geradas química ou enzimaticamente poderiam desencadear reações tipicamente fotoquímicas, na ausência de luz. Tal hipótese foi chamada de "fotoquímica sem luz" ou "fotoquímica no escuro" (White;Wei, 1970; Cilento, 1973; White *et al.*, 1974).

Estes pesquisadores propuseram que espécies excitadas, metabolicamente produzidas, poderiam atuar além da bioluminescência, permitindo a formação de produtos cuja obtenção não seria possível no estado fundamental (figura 6) (White;Wei, 1970; Cilento, 1984). White e Wei (1970) levantaram várias possibilidades em que a formação de espécies excitadas poderia resultar em metabólitos secundários cuja síntese obtida *in vitro* dependia de irradiação. Algumas destas propostas estão indicadas na figura 7 (White;Wei, 1970; White *et al.*, 1974).

Tanto o ácido ibotênico (ácido α -amino-2,3-dihidro-3-oxo-5-isoxazoleico) quanto o muscimol (5-aminometil-3(2H)-isoxazolona) (figura 7A) foram isolados de fungos do gênero *Amanita*. De forma semelhante, o ácido cinâmico (ácido 3-fenil-2-propenóico) e o ácido truxílico (ácido 2,4-difenil-1,3-ciclobutano-dicarboxílico) (figura 7B) podem ser isolados de plantas da espécie *Erythroxylum coca*; santonina ((3S,3aS,5aS,9bS)-3,5a,9-trimetil-3a,5,5a,9b-tetrahidronafto[1,2-b]furan-2,8(3H,4H)-diona) e lumisantonina (3,5a,5b-trimetil-3a,5a,5b,8b-tetrahidro-4H-ciclopenta[2',3']ciclopropa[1',2':5,6]benzo[1,2-b]furan-2,6(3H,5H)-diona) (figura 7C) foram isolados de plantas do gênero *Artemisia*. Experimentos *in vitro* demonstraram que o ácido ibotênico, o ácido cinâmico e a santonina sofrem reações fotoquímicas resultando no muscimol, ácido truxílico e lumisantonina, respectivamente (White;Wei, 1970; White *et al.*, 1974).

Figura 6 – Esquema apresentando alguns fenômenos envolvendo estados excitados. 1- "excitação química"; 2 e 6- reação do tipo fotoquímica; 3- fluorescência ou quimioluminescência; 4- fotoexcitação; 5- fosforescência; 7- cruzamento intersistemas. Em sequência o fenômeno 4 e 2 ou 4 e 6 representam reações fotoquímicas e os fenômenos 1 e 6 representam a proposta de "fotoquímica sem luz". P^* pode se referir tanto ao doador (D) quanto ao aceitor (A) na reação genérica $D^* + A \rightarrow D + A^*$ (adaptado de White, 1974).

Já na década de 70, a síntese de 1,2-dioxetanos se mostrou importante também para testar a hipótese de fotoquímica no escuro. Por exemplo, a incubação de santonina com 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano, sem irradiação luminosa, resultou na formação de lumisantonina como um de seus produtos (White *et al.*, 1974). Em outro exemplo, publicado por Brunetti *et al.* (1982), a colchicina, alcalóide produzido pela planta *Colchicum autumnale*, incubada na presença de

3,3,4,4-tetrametil-1,2-dioxetano (TMD) resultou na formação de foto-isômeros β - e γ -lumicolchicina, produtos cuja geração também ocorre por irradiação de onda eletromagnética UV-Visível. Vitamina D, previamente relatada como ocorrente também no fígado, foi obtida "no escuro" usando um dioxetano como fonte de excitação eletrônica (Cilento;Adam, 1988).

Figura 7 – Exemplos de reações que poderiam ocorrer através da fotoquímica no escuro, segundo Emil White (1974). A- Reação fotoquímica do ácido ibotênico gerando muscimol; B- Reação fotoquímica de ácido cinâmico gerando ácido truxílico; C- Reação fotoquímica de santonina gerando lumisantonina. Este último exemplo foi demonstrado quando santonina é incubada na presença de um 1,2-dioxetano.

Cilento (1975) propôs três tipos de reações que poderiam ocorrer *in vivo*, com possível formação de 1,2-dioxetanos como intermediários: i-) formação de um carbânion na posição α de um ácido carboxílico que adiciona uma molécula de oxigênio gerando um ânion peróxido, seguido de um ataque nucleofílico interno (mecanismo de McCapra); ii-) cicloadição [2+2] de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) a um composto contendo uma dupla ligação e iii-) oxidação da forma enólica de aldeídos contendo hidrogênio vicinal a esta carbonila.

Segundo White e Cilento, compostos excitados tripletes poderiam dirigir a biossíntese de produtos tipicamente fotoquímicos em regiões de vegetais ou animais que não entram em contato

direto com a luz (White *et al.*, 1974; Cilento;Adam, 1988), como raízes ou órgãos internos, respectivamente (Brunetti *et al.*, 1982). Para tal, eles focaram moléculas quimicamente geradas no estado T_1 , tendo em vista o tempo de vida mais longo da molécula energizada. Elas poderiam se difundir, colidir e transferir energia para outras moléculas antes de emitir luz, ao contrário de compostos no estado S_1 , cuja vida média é da ordem de nano- a picossegundos. Por outro lado, espécies tripletes no estado fundamental, como O_2 e alguns íons de metais de transição, podem desativar termicamente compostos no estado excitado T_1 , antes que este transfira a energia ou emita fosforescência (Cilento, 1988). Quando ocorre desativação de carbonila triplete por O_2 , pode ocorrer formação de oxigênio molecular singlete (1O_2).

1.4. Descobertas realizadas após a proposta da fotoquímica sem luz

Pesquisas realizadas nos anos subsequentes à proposição da hipótese de fotoquímica sem luz demonstraram que carbonilas tripletes, geradas química ou enzimaticamente, podem produzir os mais diversos efeitos, sofrendo reações de isomerização, rearranjo, fragmentação, adição e abstração de hidrogênio e transferindo energia para aceptores específicos (figura 8).

Figura 8 – Possíveis destinos de um composto carbonílico formado no estado triplete em sistemas biológicos. 1- Emissão de luz (fosforescência); 2- desativação térmica; 3- transferência de energia para fluoróforos (exemplo, 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato – DBAS); 4- isomerização *cis-trans* de dienos conjugados; 5- cicloadição a olefinas (reação de Paterno-Büchi); 6- abstração de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados; 7- clivagem Norrish tipo 1 a vários produtos. (Velosa *et al.*, 2007)

Algumas pesquisas descrevem a formação de compostos excitados tripletes através de reações enzimáticas e sua energia de excitação tem destinos tipicamente fotoquímicos. Por exemplo, a oxidação do isobutanal (IBAL) catalisada por peroxidase de raiz forte (HRP, *horseradish peroxidase*), forma ácido fórmico e acetona no estado triplete T_1 (Oliveira *et al.*, 1978; Bechara *et al.*, 1979; Cilento, 1984). Esta reação ocorre com a forma enólica do IBAL, através de um dioxetano intermediário (Figura 9) (Baader *et al.*, 1985).

Figura 9 – Esquema da reação de oxidação de isobutanal catalisada pela peroxidase de raiz forte (HRP).

Além de IBAL, outros substratos podem ser oxidados pelo oxigênio dissolvido na presença de HRP, tais como o fenilacetaldeído, difenilacetaldeído ou a 3-metilacetoacetona, com formação de benzaldeído e biacetilo no estado triplete, respectivamente (Bechara *et al.*, 1979; Soares; Bechara, 1982; Cilento; Adam, 1995; Ganini *et al.*, 2011). Outras proteínas e enzimas com atividade peroxidásica e oxigenásica (ex., mieloperoxidase, lipoxigenase, citocromoc, mioglobina) podem catalisar a formação de compostos excitados (Cilento, 1980; Ganini *et al.*, 2011). Outras fontes biológicas potenciais de produtos carbonílicos tripletes incluem a dismutação de radicais alquilperoxila com hidrogênio geminal (Reação de Russell) e a aniquilação de radicais alcóxila (figura 10) (Russell, 1957; Farneth; Johnson, 1984; Mendenhall *et al.*, 1991). Tais radicais de oxigênio são intermediários diretos ou secundários da cadeia de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) (Timmins *et al.*, 1997). Kowaltowski *et al.* (1996) demonstraram em mitocôndrias que a adição de fosfato inorgânico ou arsenato promove a lipoperoxidação (mediada por Ca^{2+}) da membrana mitocondrial. Segundo os autores, o fosfato e o arsenato catalisam a enolização do de aldeídos gerados durante a lipoperoxidação e a oxidação do enol, catalisada por hemeoproteínas, promove a geração de espécies excitadas tripletes.

Além de serem capazes de transferir energia para aceptores adequados, inclusive biomoléculas, desencadeando diferentes “foto”reações, carbonilas tripletes (estado $n\pi^*$) apresentam comportamento químico similar ao de radicais livres, especialmente radicais alcóxilas

(Cilento;Adam, 1995). Estes e outros autores demonstraram efeitos diversos de compostos excitados tripletes sobre algumas biomoléculas isoladas (Cilento *et al.*, 1978; Catalani;Bechara, 1984; Indig *et al.*, 1988).

Figura 10 – Esquema de possíveis fontes biológicas de carbonilas excitadas: A- termólise de 1,2-dioxetanos; B- dismutação de radicais alquinoxila; C- termólise de oxetano (reação retro-Paterno-Büchi); dismutação de radicais alquilperoxila com hidrogênio geminal (reação de Russell) (Velosa *et al.*, 2007).

1.5. Peroxidase de raiz forte

A HRP é usualmente extraída de raízes da raiz forte (*Armoracia rusticana* Gaertn). É uma hemoproteína glicosilada formada por um único polipeptídeo de 308 aminoácidos, que catalisa a oxidação de uma variedade de compostos, utilizando peróxidos – especialmente H_2O_2 – como oxidante (Veitch, 2004). A HRP é amplamente comercializada para produção de componentes de testes imunológicos, diagnósticos e para pesquisa (Veitch, 2004). Foram atribuídas algumas funções fisiológicas para esta enzima, como a lignificação, formação de parede celular, metabolismo do ácido indole-3-acético ou no combate à infecções (Veitch, 2004).

A porção de carboidratos da HRP (figura 11A) varia entre 18 a 27% e a enzima apresenta seis sítios de *N*-glicosilação possíveis. Ela também apresenta um íon de Fe (Fe III) quando em seu estado nativo, que é coordenado por quatro nitrogênios no centro da protoporfirina IX e o quinto ponto de coordenação é ocupado pela His 170. O sexto ponto de coordenação é livre para receber

os substratos das reações catalisadas pela enzima. Ela ainda possui dois íons Ca^{2+} , próximos às regiões do quinto e do sexto ponto de coordenação. Embora não participem diretamente da atividade catalítica, quando removidos, estes íons diminuem a atividade da HRP em cerca de 40% (Veitch, 2004).

As reações catalisadas pela HRP se iniciam utilizando peróxidos como agentes oxidantes (gerando a HRP composto I), sendo o substrato oxidado pelos compostos I e II da proteína, que retorna ao seu estado nativo. O ciclo catalítico é apresentado na figura 11B.

Figura 11 – Esquema representando a estrutura e o ciclo de reações catalisados pela HRP. A- Representação da estrutura da HRP. As α -hélices e a folha- β estão representadas pela coloração roxa e amarela, respectivamente, a região hemínica é representada pela coloração vermelha e os íons Ca^{2+} , pela coloração azul. B- Esquematisação da sequência de reações catalisadas pela HRP. As constantes de formação do composto I (radical π -cátion), do composto II e da forma nativa estão representadas pelas constantes k_1 , k_2 e k_3 , respectivamente. O substrato a ser oxidado está representado na estrutura pela sigla AH_2 .

1.6. O oxigênio singlete na "fotoquímica sem luz"

Além da geração de compostos excitados já mencionadas, o $^1\text{O}_2$ é um dos mais conhecidos agentes fototóxicos e foi correlacionado com diversos danos oxidativos em biomoléculas (Schulz *et al.*, 2000; Ronsein *et al.*, 2009). Produção de $^1\text{O}_2$ foi reportada em leucócitos polimorfonucleares, na reação de aniquilação de radicais peroxila de lipídeos (reação de Russel), na reação de ozônio com aminoácidos e proteínas ou na reação entre glioxal e

peroxinitrito (Krinsky, 1974; Kanofsky;Sima, 1991; Steinbeck *et al.*, 1992; Miyamoto *et al.*, 2003; Massari *et al.*, 2011).

Embora o $^1\text{O}_2$ não tivesse sido incluído nas primeiras propostas, feitas por White e Cilento, de fotoquímica sem luz (além da menção à possibilidade de ser uma fonte de carbonilas tripletes), posteriormente este estado excitado do oxigênio também foi incluído na hipótese, já que pesquisas demonstraram que o oxigênio excitado singlete pode ser gerado no metabolismo e resultar em alteração em biomoléculas como aminoácidos e DNA (Ravanat;Cadet, 1995; Ronsein *et al.*, 2008). Porém, é importante salientar que a maior parte das pesquisas focou os efeitos deletérios deste composto excitado ao invés de propor a possibilidade de ele possa atuar na biossíntese de metabólitos. Como exceção, pode-se citar a proposta de envolvimento de $^1\text{O}_2$ na síntese de prostaglandinas (Rahimtula;Obrien, 1976). Atualmente, as pesquisas estão sendo direcionados para a terapia fotodinâmica e sinalização celular (Reinbothe *et al.*, 2010; Rolim *et al.*, 2012).

As possíveis relações entre $^1\text{O}_2$ e carbonilas tripletes já foram anteriormente mencionadas. Segundo Cilento (1975), pode ocorrer geração de carbonilas tripletes através da oxidação de ácidos graxos polinsaturados por $^1\text{O}_2$, e $^1\text{O}_2$ pode ser formado pela desativação eletrônica de carbonilas tripletes por O_2 . A primeira possibilidade já foi testada, porém, partir da reação de $^1\text{O}_2$ com ácidos graxos poli-insaturados, apenas baixos rendimentos de geração de cetonas tripletes foram observados (Di Mascio *et al.*, 1992).

Quanto à possibilidade de geração de $^1\text{O}_2$ a partir de moléculas excitadas tripletes, é importante salientar que a energia da acetona triplete está em torno de 330 kJ.mol^{-1} (Adam;Baader, 1985), e a do $^1\text{O}_2$, 94 kJ.mol^{-1} (Foote;Denny, 1968) e, portanto, a transferência de energia é termodinamicamente favorável. Esta hipótese foi testada, utilizando-se hidrocarbonetos e carbonilas aromáticas excitadas (Darmany;Foote, 1993; Abdel-Shafi *et al.*, 2001) em diferentes solventes orgânicos como metanol, benzeno e tetracloreto de carbono. Experimentos também foram realizados neste último solvente, utilizando-se 1,2-dioxetano como fonte de acetona triplete e demonstrando a geração de $^1\text{O}_2$ com rendimento quântico de cerca de 0,1% (Briviba *et al.*, 1996).

1.7. Danos em biomoléculas causados por carbonilas tripletes

Diversas alterações estruturais em biomoléculas, causadas por diferentes metabolitos e xenobióticos, são alvos na busca de biomarcadores de toxicidade. Diversas moléculas são selecionadas para estes estudos, devido à sua presença no ambiente, em alimentos ou materiais de trabalho. Também há buscas por biomarcadores derivados de metabólitos, como indicativos de disfunções metabólicas e doenças (Chetyrkin *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011; Henning *et al.*, 2011; Kalariya *et al.*, 2011). Porém, usualmente, os agentes de danos biomoleculares são estudados em seu estado eletrônico fundamental.

Ácidos nucleicos foram extensivamente estudados como alvos de espécies tripletes formadas na decomposição de dioxetanos pelo grupo do Dr. Waldemar Adam, Würzburg University (GE) (Adam *et al.*, 1990; Epe *et al.*, 1992; Adam *et al.*, 1997; Adam *et al.*, 2001). Estes estudos mostraram que a incubação de DNA de bacteriófago com diferentes 1,2-dioxetanos acarreta na alteração de bases e, em menor proporção, na formação de dímeros de pirimidina (Epe *et al.*, 1992). Dentre os mecanismos propostos para as alterações em DNA, causadas pela decomposição térmica de dioxetanos, inclui-se a transferência de energia de carbonilas tripletes para pirimidinas, que reagem formando dímeros (cicloadição 2+2 de Paternó-Büchchi) e a oxidação de purinas, formando um cátion radical desta purina (Epe *et al.*, 1992). Trabalhos realizados com bactérias e células de mamíferos demonstraram que a presença de 3,3,4-trimetil-1,2-dioxetano e 3,3,4,4-tetrametil-dioxetano causam alterações em DNA e ativam sistemas de reparo (Adam *et al.*, 1990). O dano em DNA por produtos de oxidação de IBAL por HRP também foi pesquisado, embora os resultados obtidos via HPLC e quebras de DNA levaram os autores do trabalho a concluir que carbonilas tripletes são responsáveis apenas por uma pequena fração de danos no DNA (Adam *et al.*, 1999). Deve-se, entretanto, notar que mais recentemente foi demonstrado por vários autores, entre eles Cadet *et al.* (1998) que produtos de reação de nucleobases com espécies reativas de oxigênio não são estáveis, tornando sua detecção e quantificação muito complexa.

White (1974) citou em uma de suas publicações, já na proposta da "fotoquímica sem luz", a possibilidade de se observar danos em DNA semelhantes àqueles resultantes da exposição de radiação UV (figura 12), tais como os dímeros ciclobutânicos de pirimidina (CPD). De fato, Lamola

(1971) já havia demonstrado em 1971 a formação deste tipo de fotoproducto em DNA de *E. coli*, usando 1,2-dioxetano como fonte de acetona triplete.

Almeida *et al.* (1999) demonstraram que a oxidação de difenilacetaldéido, catalisada por citocromo *c*, produz benzofenona triplete responsável pela fragmentação de DNA mitocondrial, além de formar bases de Schiff e permeabilizar a membrana. Nestes experimentos observou-se a emissão de luz vermelha na região do visível, o que pode ser atribuído à transferência de energia de benzofenona triplete, cuja vida média é maior que a de acetofenona triplete, para o oxigênio dissolvido formando oxigênio singlete. A α -peroxidação de aldeídos formados na peroxidação lipídica amplifica a produção de compostos tripletes e pode colaborar com o aumento da lipoperoxidação e danos em DNA e outras biomoléculas (Cilento *et al.*, 1978; Kowaltowski *et al.*, 1996).

Outros estudos recentes relacionados a diferentes espécies tripletes foram realizados, como a formação de adutos de formaldeído excitado em meio contendo L-lisina, realizado por Trézil e Pipek (1988), ou a formação de tripletes de timidina irradiada por onda eletromagnética na faixa do UV, com consequente formação de anel ciclobutânico de pirimidina, um dos marcadores de danos causados por irradiação UV sobre tecidos (Kwok *et al.*, 2008).

Figura 12 – Formação de dímeros de ciclobutano de pirimidina (CPD) causada por irradiação de onda eletromagnética na região do UV ou por exposição do DNA a 1,2-dioxetanos. O esquema representa dímeros de timidina, porém fotoproducto semelhante pode ser obtido de resíduos de citidina.

1.8. Possível envolvimento da "fotoquímica sem luz" em tecidos contendo melanina

A melanina, pigmento sintetizado em tecidos cutâneos de diversos animais, tem como função principal a fotoproteção de epiderme, tecidos oculares e capilares. Em humanos, sua

estrutura consiste em um polímero amorfo de o-quinonas, sintetizada a partir da oxidação do aminoácido L-Tyr (Felix *et al.*, 1979; Suzukawa *et al.*, 2012). Em humanos, existem dois tipos de melaninas: a eumelanina, um polímero de dois derivados de L-Dopa - 5,6-dihidroxi-indol e ácido 5,6-dihidroxi-indolil acético (DHICA) - com coloração marrom/preta, enquanto a feomelanina, de coloração amarela/vermelha, é formada por benzotiazinil-alanina, um produto de reação de L-Cys com L-Dopaquinona (Jimbow, 1991). A L-Dopa é sintetizada pela enzima tirosinase a partir da oxidação de L-Tyr.

A síntese da melanina em humanos ocorre nos melanócitos, células dendríticas que possuem o melanossomo, organela que contém a enzima tirosinase. Há também melanina em tecido nervoso (Jimbow, 1991). Takeuchi *et al.* (2004) mostraram que a melanina, especialmente a feomelanina, pode agir como um fotossensibilizador em pele murina, ativando apoptose, possivelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio.

Segundo Hirsch *et al.* (1988), embora a melanina provavelmente constitua um mecanismo de defesa para evitar foto-oxidação causada por irradiação UV-Vis, há evidências do envolvimento do pigmento na morte de neurônios melanizados em tecido nervoso de indivíduos que sofrem do mal de Parkinson. Esta correlação entre melanina e morte celular em doenças neurodegenerativas já havia sido aventada, mas só em 1988 foi experimentalmente confirmada.

Proctor *et al.* (1974) sugeriram uma hipótese para explicar este evento, mencionando que em regiões em que ocorre morte celular, foi observada a formação de CPD. Eles mencionam experimentos em que a melanina, submetida a baixas doses de radiação UV, oferece um efeito fotoprotetor, mas, quando submetida a altas doses, pode apresentar ela mesma um efeito citotóxico. Em seu artigo, eles pontuam duas possibilidades de morte de neurônios contendo altas doses de melanina: (1) muitas espécies excitadas endógenas poderiam “ativar” o efeito citotóxico da melanina, sintetizada primariamente para proteger as células ou (2) a melanina poderia ser apenas um indicador da presença destes compostos excitados e eles seriam os responsáveis por iniciar a morte celular.

Experimentos realizados com EPR mostraram que a irradiação da própria melanina pode gerar espécies tripletes (Felix *et al.*, 1979) e Suzukawa *et al.* (2012) mostraram que melanina pode interagir com $^1\text{O}_2$, o que pode diminuir a eficiência de terapia fotodinâmica.

Ao irradiar células de pele humana com onda eletromagnética UV, há um aumento da expressão de óxido nítrico sintase e, portanto, aumento na síntese de óxido nítrico (NO), uma conhecida espécie reativa de nitrogênio (Gordon-Thomson *et al.*, 2012). Gordon-Thomson *et al.* (2012) realizaram experimentos em que queratinócitos foram incubados com fontes químicas de NO e observaram aumento na formação de CPD, em quantidade comparável com a formação destes dímeros quando as células são irradiadas. Embora o trabalho não correlacione a melanina com a formação de dímeros, é importante salientar que os queratinócitos são as células que recebem a melanina sintetizada pelos melanócitos (Jimbow, 1991), portanto, há possibilidade de envolvimento deste polímero no efeito observado.

Com base nestas observações sobre a formação de CPD em tecidos não irradiados, aventa-se a possibilidade de este ser mais um resultado que talvez possa ser explicado pela “fotoquímica sem luz”, com formação química de espécies excitadas, como, desde 1974, Proctor *et al.* (1974) já haviam sugerido.

1.9. As perspectivas atuais da "fotoquímica sem luz"

Embora alguns trabalhos relatem o efeito de espécies excitadas sobre biomoléculas, verifica-se ainda grande esforço para determinar os papéis biológicos do $^1\text{O}_2$ e pesquisas sobre efeitos biológicos de moléculas tripletes têm sido negligenciadas.

Mesmo que diversos trabalhos sobre a fotoquímica direta ou indireta (por transferência de energia para aceptores adequados) de compostos carbonílicos excitados, produzidos na termólise de 1,2-dioxetanos, tenham sido realizados no século passado, nos últimos anos poucas pesquisas foram publicadas sobre este tema. A falta de equipamentos e kits analíticos de alta resolução e sensibilidade nas décadas passadas provavelmente inibiu o desenvolvimento imaginado das pesquisas sobre “fotoquímica sem luz” pelos seus precursores e, conseqüentemente, o papel de espécies carbonílicas tripletes em Biologia ainda permanece campo fértil para investigação. Não se deveria negligenciar a possibilidade de que compostos carbonílicos excitados possam ser gerados durante o metabolismo e contribuir com metabolitos α -dicarbonílicos e outros produtos de oxidação avançada de carboidratos, lipídios e proteínas para o estabelecimento do denominado “estresse carbonílico” verificado em doenças neurodegenerativas, envelhecimento e diabetes (Kalapos, 1999; Stadtman, 2001; Thornalley, 2002; Dalle-Donne *et al.*, 2003; Sayre *et al.*, 2006).

Como outros exemplos do relativo descaso desta hipótese, lembramos que a geração de $^1\text{O}_2$ a partir de carbonilas tripletes, embora mencionada e estudada em solvente orgânico, ainda não foi demonstrada em meio aquoso, assim como a possibilidade de CPD formar-se via transferência de energia de espécies excitadas geradas quimicamente para pirimidinas no DNA.

Assim, embora danos oxidativos de biomoléculas sejam, segundo farta literatura, preponderantemente causados por espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, não se pode ignorar o potencial oxidativo de compostos carbonílicos eletronicamente excitados, uma vez que são altamente eletrofílicos e oxidantes. Atualmente, alterações estruturais de macromoléculas por estímulos físicos ou químicos podem ser rigorosa e detalhadamente acompanhadas através do uso de espectroscopia UV/Vis, CD, RMN ou MS. Ainda assim, reiteramos que embora compostos carbonílicos excitados possam ser gerados na peroxidação natural de biomoléculas e apresentem potencial oxidativo, nos últimos anos poucos trabalhos foram publicados sobre danos oxidativos causados por estes compostos (Iqbal *et al.*, 2006; Cosa;Scaiano, 2008; Kwok *et al.*, 2008).

2. Objetivo geral

Investigar reações aeróbicas de espécies carbonílicas tripletes produzidas quimicamente ou enzimaticamente com aminoácidos isolados, através do uso de técnicas de HPLC, MS e quimioluminescência, na busca de produtos com potencial de constituírem biomarcadores de processos fisiológicos e patológicos.

3. Objetivos específicos

3.1. Verificação de alterações estruturais na HRP causadas pela incubação com IBAL

Como a própria HRP pode ser alvo das carbonilas tripletes geradas durante a oxidação do aldeído, alterações estruturais na proteína foram acompanhadas por ensaios de eletroforese em gel e espectrofotometria UV/Vis.

3.2. Avaliação dos efeitos de carbonilas tripletes sobre triptofano

Como fonte “limpa” de acetona triplete foram utilizados o 3,3,4,4,-tetrametil-1,2-dioxetano (TMD), sintetizado no próprio laboratório, e o sistema IBAL/HRP/O₂ e como alvo da espécie excitada o L-Trp. Estas reações foram monitoradas por HPLC/ESI MS.

3.3. Detecção de oxigênio singlete gerado por acetona triplete

Como pode ocorrer transferência de energia das carbonilas tripletes, geradas tanto pela decomposição térmica do TMD quanto pelo sistema IBAL/HRP/O₂, para oxigênio molecular triplete (estado fundamental, $^3\Sigma_g$) com formação de oxigênio singlete (primeiro estado excitado, $^1\Delta_g$), utilizaram-se técnicas de quimioluminescência, de EPR com o captador de 1O_2 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (TEMP) e de captação do oxigênio excitado por 9,10-diildietano-antraceno (EAS) (cicloadição 2+4).

3.4. Investigação de produtos derivados de espécies excitadas precursores de melanina

Através de transferência de energia para o DBAS e análise por HPLC/ESI MS, investigou-se a possibilidade de formação de espécies excitadas provenientes de 5-S-cisteinildopa (5SC) e ácido dihidroxi-indolil acético (DHICA).

4. Materiais e métodos

4.1. Preparo de soluções e outros reagentes

As soluções foram preparadas em água deionizada (Millipore – Milli-Q), pré-tratada com Chelex® (Sigma), para coordenar traços de metais contaminantes presentes, com exceção do TMD cuja solução foi preparada em acetonitrila ou tetracloreto de carbono (Merck), previamente tratados com Chelex. Todos os experimentos foram preparados em tampão fosfato (50 mM pH 7,4) contendo ácido dietileno triamina pentacético (Sigma) (0,1 mM) (DTPA) e 2% (v/v) de acetonitrila, exceto quando especificamente mencionado. As soluções de aminoácidos foram preparadas a partir de estoques comerciais liofilizados (Sigma-Aldrich), diluídos em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM). Soluções-estoque de HRP (10 mg.mL⁻¹) também foram preparadas com o mesmo tampão. A melanina sintética ou extraída de *Sepia officinalis* foram obtidas da Sigma. O DHICA e o 5-S-cisteinildopa foram gentilmente cedidos pelo professor Kazumasa Wakamatsu, do Departamento de Química da Fujita Health University, Toyoake, Aichi, Japão.

4.2. Síntese de 3,3,4,4-tetrametil-1, 2-dioxetano

Sintetizou-se o 3,3,4,4-tetrametil-1,2-dioxetano (TMD) conforme o método descrito por Kopecky *et al* (1975), no qual se realiza a ciclização do β -bromohidroperóxido correspondente, utilizando-se acetato de prata (Sigma).

Preparou-se o β -bromohidroperóxido pela reação de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína (Sigma) com solução concentrada de H₂O₂ em éter anidro, sob banho de gelo seco e etanol. A segunda etapa da síntese consiste na reação, sob forte agitação, do β -bromohidroperóxido com o óxido de prata a 0°C.

A identificação do TMD foi feita a partir de espectro de RMN¹H em CCl₄, apresentando um pico único $\delta = 1,51$ ppm (Kopecky *et al*, 1975) e através de absorbância de luz UV, em 280 nm. A síntese deste dioxetano foi realizada no laboratório do Prof. Wilhelm Baader (IQUSP).

4.3. Espectrofotometria UV-Visível

As alterações na HRP foram acompanhadas por espectrofotometria UV-Vis, observando-se alterações nos espectros (entre 250 e 700 nm) durante a incubação com o IBAL. Para tal,

utilizou-se um espectrofotômetro Varian, modelo 50 BIO, com controle de temperatura Peltier (PCB150) e agitação magnética.

4.4. Eletroforese em gel

As alterações proteicas decorrentes da reação entre os produtos de oxidação de IBAL por HRP, também foram avaliadas por eletroforese em gel desnaturante. Para a realização do experimento, foi utilizado gel com SDS com porcentagem 12% para corrida e 4% para empilhamento, e as demais soluções seguem os padrões normais para eletroforese vertical de proteínas (tampão de corrida 0,19 M glicina, 25 mM Tris, pH 8,3; tampão para gel de empilhamento 0,50 M Tris.HCl, pH 6,8; tampão para gel de corrida 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). A corrida foi realizada aplicando-se 100 V por cerca de 3 h. Para a visualização das bandas protéicas no gel foi utilizada coloração por Comassie Blue.

4.5. Determinação de quimioluminescência

Foram realizados experimentos para observar a emissão de luz resultante da formação de carbonilas tripletes, durante a oxidação de IBAL realizada pela HRP. Para tal, utilizou-se um contador de fótons Hamamatsu, modelo TVC 767, acoplado a uma fotomultiplicadora Thorn EMI, modelo 9658AM, mantida a -12°C por um refrigerador termoelétrico da Thorn EMI, modelo FACT50. Variou-se a concentração de IBAL de 5 a 20 mM na presença de 4 μM de HRP. Após, utilizou-se a concentração fixa de 20 mM de IBAL e 4 μM de HRP, na presença dos aminoácidos serina e triptofano, para observar se há diminuição na intensidade de emissão de luz.

4.6. Determinação de consumo de oxigênio

O oxígrafo utilizado foi o da Hansatech que apresenta o eletrodo de Clark que está imerso em uma solução de KCl, a qual funciona como ponte salina e separado do sistema a ser estudado por uma membrana de Teflon permeável ao oxigênio molecular. As soluções foram preparadas variando-se a concentração de IBAL entre 5 e 30 mM e 5 μM de HRP, para verificar a velocidade de consumo de oxigênio. Para verificar o efeito dos aminoácidos se utilizou as concentrações entre 0,5 e 10 mM de aminoácido.

4.7. EPR *spin trapping* (captação de spin)

Para verificar a presença de radicais intermediários centrados no oxigênio ou no carbono, a incubação foi feita com os captadores 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), 5,5-dimetilpirrolina-1-óxido (DMPO), na presença da HRP e IBAL (1 min, 37°C). Amostras das misturas de reação foram analisadas em um equipamento marca Bruker, modelo EMX à temperatura ambiente. As condições do equipamento foram: frequência, 100,00 kHz; amplitude, 0,5 mT; constante de tempo, 81,920 ms; ganho, $5,05 \times 10^5$. Realizaram-se as simulações computacionais através do programa WINSIM (Duling, 1994).

4.8. Análise de adutos de L-Trp por MS

A separação dos adutos gerados pela incubação do L-Trp com os sistemas geradores de acetona triplete foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), da marca Agilent Technologies, modelo 1200, com uma coluna Phenomenex, Luna (partículas 5μ), C18 fase reversa, 100 Å, 250 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi solução de ácido fórmico 0,05% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Variou-se o gradiente do eluente, aumentando linearmente a proporção do solvente B de 4% para 30% em 30 min. A proporção de 30% foi mantida isocrática por 10 min. Após um minuto, voltou-se à proporção inicial de 4% e esta fase foi mantida isocrática por outros 9 min para estabilização da coluna. A detecção e análise dos adutos foram realizadas através de um espectrômetro de massas maXis 3G (Bruker) de alta resolução, com analisador do tipo “Tempo de Vôo”. Uma pequena fração do eluente do HPLC foi separada e injetada diretamente no espectrômetro, a um fluxo contínuo de 5 μ L/min. Realizaram-se análises de MS/MS com ionizador do tipo APCI no modo de íon positivo. As condições de análise foram: temperatura da fonte: 506°C; corrente do capilar da fonte – 34 nA; temperatura de dessolvatação: 200°C; energia de colisão: 8.0eV, dependendo do aduto; gás de secagem: 8,1 L/min; pressão do gás de nebulização 1,6 Bar; intervalo de massa 100-500 m/z .

4.9. Quimioluminescência do oxigênio singlete e de precursores de melanina

Analisou-se a emissão de luz resultante da formação de acetona triplete e de 1O_2 , durante a oxidação de IBAL catalisada pela HRP. Para tal, utilizou-se um contador de fótons Edinburgh Instruments, modelo FLSP920, acoplado a duas fotomultiplicadoras Edinburgh Instruments,

modelo R9110, mantidas a -20°C por um refrigerador termoelétrico da Edinburgh Instruments, modelo CO1. Um destes detectores foi utilizado sem qualquer rede de difração de luz e, portanto, detecta emissão total de onda eletromagnética UV-VIS, enquanto a segunda fotomultiplicadora era precedida de uma rede de difração permitindo a seleção de comprimento de onda específico ou a obtenção de espectros. Utilizou-se também um terceiro detector para infra-vermelho próximo marca Hamamatsu, modelo H10330A-45, também precedido de uma grade de difração.

Pesquisou-se também a emissão de luz resultante da formação de carbonilas triplete sem precursores de melanina através de um contador de cintilografia da marca Perkin Elmer, modelo TriCarb 2900, no modo *Single Photon Counting Assay*, portanto, desligando a contagem por coincidência. O intervalo entre cada leitura da cinética é de 15 s e o tempo total de leitura, 10 min. Cada amostra foi preparada em frascos de vidro, previamente mantidos por uma hora no escuro, apropriados para o tipo de suporte do aparelho. As misturas de reação foram preparadas em tampão fosfato, pH 7.4, 50 mM com 0.10 mM de EDTA na presença e ausência de 9,10-dibromooantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) 50 μM ou de melanina sintética ou seus precursores (0.1 mg/mL) contendo HRP 5 μM e H_2O_2 200 μM . A cinética das reações foi monitorada imediatamente após a inclusão do último reagente, H_2O_2 . Os experimentos com melanina foram realizados nos laboratórios do Prof. Douglas Brash, da Yale University.

4.10. Análise de adutos DHICA por MS

A separação dos adutos gerados pela incubação do DHICA com HRP (5 μM) e H_2O_2 (200 μM) (HPLC), da marca Agilent Technologies, modelo 1200, com uma coluna Phenomenex, Luna (5 μ de partícula), C18 fase reversa, 100 Å, 250 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi solução de ácido fórmico 0,05% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Variou-se o gradiente, aumentando linearmente a proporção do solvente B de 1% para 10% em 25 min. A proporção de 10% foi mantida isocrática por 5 min. Após um minuto, voltou-se à proporção inicial de 4% e esta foi mantida isocrática por outros 4 min para estabilização da coluna. A detecção e análise dos adutos foram realizadas através de um espectrômetro de massa da Micromass, modelo Quatro II, uma fonte *Z-spray*. Uma pequena fração do eluente do HPLC foi separada e injetada diretamente no massas, a um fluxo contínuo de 150 mL.min⁻¹. Realizaram-se análises de MS/MS com ionizador *electrospray* no modo de íon negativo. As condições de análises do espectrômetro de massas

foram: temperatura da fonte: 100°C; temperatura de dessolvatação: 200°C; voltagem do cone: 20 V; gás de secagem: 300 L.h⁻¹; gás de nebulização 15 L.h⁻¹; intervalo de massa 100-600 m/z.

4.11. Cultura de células, irradiação e análise de CPD

Melanócitos C57BL/6 foram cultivados em meio OptiMEM (Life Technologies), contendo 7% de soro de cavalo, 16,5 nM de 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Sigma) e 1% Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies). Após a ressuspensão das células por degradação da matriz usando solução de tripsina (0,25% de tripsina em solução contendo EDTA e o corante *phenolred*) (Life Technologies), a densidade de células foi contada e transferiu-se 10⁶ células/mL de suspensão em placas de 30 mm de diâmetro, sendo mantidas com 3 mL do meio acima descrito. Após atingir a confluência (cerca de 48 h após a sedimentação), as células foram lavadas com PBS e 2 mL de PBS a 4°C foi adicionado. As placas foram mantidas em uma superfície contendo gelo e submetidas à irradiação (sem a proteção da tampa), usando uma lâmpada de UV, na faixa do UVA (75 kJ/m² de irradiação). Após este procedimento, os controles eram imediatamente raspados, transferidos para um microtubo de 1,5 mL, centrifugados e o sobrenadante era descartado, sendo as células congeladas para futura análise de CPD. As demais amostras eram alimentadas com o meio de cultura e mantidas na incubadora pelo período selecionado. O DNA era extraído utilizando-se o kit de Dnaesy Tissue Kit (Quiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Análises de CPD eram realizadas através da técnica de ELISA. Após a extração do DNA, este foi desnaturado através de alta temperatura e 2 ng/μL de DNA foi transferido para uma placa de 96 poços e mantido por 12 h a 37°C, para secagem do PBS. A microplaca foi, então, incubada com 4% de albumina bovina por 30 min, depois com anticorpo TDM-2 (1:1000 4% FBS) (Cosmobio) por 30 min, com anticorpo Biotin-F(ab') fragmento de anti-ratIgG (1:2000) (Life Technologies) e, finalmente, com o anticorpo terciário Peroxidase-Streptavidin (Sigma) (1:10000). Entre cada incubação, a placa foi lavada com PSB contendo 0,05% de Tween 20. A revelação foi feita através da oxidação de o-fenilenodiamina, cujo produto quinônico apresenta absorbância em 490 nm.

Os mesmos procedimentos foram realizados para fibroblastos NIH3T3. Porém, estes eram mantidos com meio DMEM (com alta glicose), com 20% de FBS e 1% Penicilina-Estreptomicina.

4.12. Captação química de $^1\text{O}_2$ por EAS

Para determinação e quantificação de $^1\text{O}_2$, utilizou-se o captador 9,10-diildietil-antraceno disulfato de sódio (EAS). O EAS sofre uma 9,10-cicloadição de $^1\text{O}_2$ produzindo o endoperóxido correspondente (EASO₂). Quando 8 mM de EAS é utilizado, este capta 50% de oxigênio singlete produzido no meio de reação (concentração β de EAS). Oito mM de EAS foi transferido para o meio reacional em tampão fosfato deuterado, 50 mM (pD 7,4), com 8 mM de TMD e colocado em um sistema fechado. O meio reacional foi rapidamente congelado através de banho de etanol e gelo seco e, então, descongelado, utilizando-se uma bomba a vácuo para retirada do O_2 do meio reacional. O ciclo de congelamento e descongelamento foi repetido 3 vezes. Após, a solução degaseificada foi saturada com $^{18}\text{O}_2$. A reação foi mantida por 2 h a 70°C. O mesmo procedimento foi utilizado para o sistema enzimático contendo 8 mM EAS, 5 μM HRP e 50 mM de IBAL, mas a incubação foi mantida por 72 horas à temperatura ambiente.

Quando não se utilizou a marcação isotópica, solução normalmente aerada contendo 8 mM de EAS e 8 mM de TMD foi preparada e incubada por 24 h a 70°C. Para a reação enzimática, 8 mM EAS, 5 μM HRP e 50 mM de IBAL foram incubados por 24 h a 37°C, mas, nestes experimentos, não se realizaram os ciclos de congelamento/descongelamento.

4.13. Determinação de EASO₂ por HPLC-MS/MS

A análise de HPLC-MS/MS de EASO₂ foi realizada por injeção de 25 μL das amostras em um sistema de cromatografia Shimadzu Proeminence, e o endoperóxido foi separado através de uma coluna Phenomenex, Luna (5 μm de partícula), C18 fase reversa, 100 Å, 250 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada foi solução de 25 mM de formiato de amônio (solvente A) e acetonitrila:metanol 7:3 (solvente B). A fase móvel foi mantida isocrática com 25% de B por 15 min com fluxo de 0,8 mL/min. A detecção e análise dos adutos foram realizadas através de um espectrômetro de massa da Micromass, modelo Quatro II, uma fonte *Z-spray*. Uma pequena fração do eluente do HPLC foi separada e injetada diretamente no massas, a um fluxo contínuo de 100 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$. Realizaram-se análises de MS/MS com ionizador *electrospray* no modo de íon negativo. As condições de análises do espectrômetro de massas foram: temperatura da fonte: 120°C; temperatura de dessolvatação: 200°C; voltagem do cone: 20 V; energia de colisão: 10 eV; gás de secagem: 300 L.h⁻¹; gás de nebulização 15 L.h⁻¹; intervalo de massa 100-400 *m/z*. Os endoperóxidos foram

detectados pela perda da molécula de oxigênio, pelo modo de monitoramento de reação selecionada (SRM). As transições analisadas foram $\text{EAS}^{16}\text{O}_2$ (m/z 228) para EAS (m/z 212), $\text{EAS}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ (m/z 229) para EAS (m/z 212), $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$ (m/z 230) para EAS (m/z 212). Os resultados foram comparados com uma curva padrão contendo diferentes concentrações de EASO_2 previamente preparados por irradiação de azul de metileno dissolvido na solução de EAS.

4.14. Avaliação de Resultados

Através dos espectros de massas, os produtos de reação foram analisados qualitativamente, com a finalidade de determinar os possíveis mecanismos de formação dos adutos e avaliar as alterações causadas por derivados da acetona triplete. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste *student's t* com, no mínimo, três replicações para cada experimento. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5. Resultados e Discussão

5.1. Alterações estruturais em HRP durante a Incubação com IBAL e formação de espécies excitadas

Inicialmente, os experimentos foram realizados com o intuito de demonstrar e caracterizar o sistema enzimático gerador de carbonilas tripletes. Neste sentido, é importante salientar que os experimentos referentes à quimioluminescência produzida durante a oxidação do IBAL e as alterações espectroscópicas da HRP não são inéditas, mas foram realizadas sob adaptações dos respectivos sistemas descritos na literatura, como a substituição do solvente etanol por acetonitrila, pois o etanol em excesso pode ser um alvo das espécies tripletes.

Análises por espectrofotometria UV/Visível foram realizadas com a finalidade de se observar alterações estruturais na HRP, durante a incubação com IBAL, na tentativa de verificar a conversão da enzima nos compostos I e II. Na figura 7, observam-se as alterações espectrais causadas durante a incubação, por 30 min, de 4 μM de HRP com 8 mM de IBAL, na região da banda Soret (figura 13A) e na região do visível (figura 13B).

É possível observar que, conforme o esperado (Hewson;Hager, 1979), no início do experimento os espectros são característicos de HRP nativa, com picos de banda Soret em 400 nm ($\text{abs} = 0,541$ – figura 13A, linha preta; $\epsilon = 1,02 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e na região do visível em 495 nm ($\text{abs} = 0,164$ – figura 13B, linha preta) (Hewson;Hager, 1979).

Na região da banda Soret, é possível observar que, após 10 min de incubação de HRP com IBAL, a enzima passa para o estado de composto II ($\lambda_{\text{máx}} = 420 \text{ nm}$; $\epsilon = 1,05 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\text{abs} = 0,470$ – figura 13A, linha ciano). Tal fato também é evidenciado no espectro da região do visível ($\lambda_{\text{máx}} = 529 \text{ e } 556 \text{ nm}$; $\text{abs} = 0,128 \text{ e } 0,130$ respectivamente – figura 13B, linha ciano). Após 50 min de incubação, na banda Soret, há indicação de formação de composto I ($\epsilon = 5,7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), visto que a intensidade da banda Soret da enzima neste estado é menor que no estado nativo e no composto II ($\lambda_{\text{máx}} = 405 \text{ nm}$; $\text{abs} = 0,376$ – figura 13A, linha laranja). Porém no espectro relativo à região de luz visível, o traço correspondente indica que a enzima apresenta espectro mais semelhante ao de sua forma nativa ($\lambda_{\text{máx}} = 500 \text{ nm}$; $\text{abs} = 0,134$ – figura 13B, linha laranja). Tanto na banda Soret quanto na região do visível, há um deslocamento de 5 nm observado, o que pode indicar que há enzimas tanto na sua forma nativa quanto na forma de composto II. De acordo com os resultados obtidos por Bechara *et al.* (1979), a intensidade da

banda Soret deveria ser equivalente à original mas, considerando-se que moléculas tripletes possam reagir com o grupo heme, há a hipótese de que a própria proteína seja alvo de alterações.

Estes resultados confirmam o ciclo da HRP entre nativa, Composto I e Composto II, portanto a enzima está catalisando a oxidação do aldeído (figura 13). Embora seja conhecido o fato de que a HRP use peróxido para catalisar as reações de oxidação, trabalhos demonstram que a enzima também pode usar outros substratos, como o ânion radical superóxido e oxigênio singlete e, além disso, a própria amostra utilizada pode conter traços de peróxido de IBAL para iniciar a reação (Cilento *et al.*, 1978; Metodiewa *et al.*, 1992).

Figura 13 – Variações espectrais (UV-Visível) de HRP 4 μM incubado com 8 mM de IBAL durante 50 min a 37°C em tampão fosfato 50 mM pH 7,4. A curva preta se refere ao espectro de HRP antes da incubação com o aldeído e as demais curvas foram obtidas nos tempos indicados na legenda. A- Espectros referentes à região da Banda Soret; B- Espectros referente à região visível.

Realizaram-se novas análises por espectrofotometria UV-Vis com a finalidade de comparar o efeito de sorbato (2,4-hexadienoato, um eficiente supressor de carbonilas tripletes) (Velosa *et al.*, 2007) sobre as alterações estruturais na HRP, causadas pela incubação com IBAL, com os resultados já obtidos anteriormente. A figura 14A apresenta a região da banda Soret da HRP (5 μM), incubado com 10 mM de IBAL. Observa-se novamente o deslocamento do pico de 400 nm para 420 nm, característico de composto II, durante os seis primeiros minutos de incubação e, após este tempo, a banda retorna para o λ máximo de 400 nm. A intensidade da banda é menor que a original, indicando que ocorreu o descoramento da proteína.

Na presença de 0,5 mM de sorbato (figura 14B) também ocorre o deslocamento da banda Soret para 420 nm e após cinco minutos de incubação ocorre o retorno da banda ao máximo de 400 nm (figura 14B, linha amarela) só que desta vez a intensidade desta banda ao final do experimento é semelhante à inicial, indicando que houve proteção causada pelo sorbato. Sendo

este composto conhecido supressor de moléculas excitadas ao estado triplete, este resultado indica que o descoramento da HRP pode ser causado pela acetona excitada gerada pela oxidação do IBAL. Bechara *et al.* (1979) e Baader *et al.* (1985) já haviam demonstrado que acetona triplete gerada por HRP abstrai átomo de hidrogênio da porção polissacarídea da enzima (~18%), reduzindo-se ao radical 2-hidroxi-*i*-propila que leva à formação de *n*-propanol e pinacol (3,4-dimetil-3,4-dihidroxibutano, mas não relataram alterações no grupo heme da enzima.

As cinéticas apresentadas na figura 15 mostram variações nos máximos de 400 nm (HRP nativa), 420 nm (HRP composto II) e 410 nm (ponto isobéstico entre estes dois máximos) deixando clara a diferença na intensidade final durante a incubação apenas com IBAL (figura 15A) ao se comparar o efeito do sorbato (figura 15B) com o retorno aos níveis iniciais de absorvância. Esgotado o oxigênio dissolvido, a reação em cadeia é finalizada e as absorvâncias retornam aos valores originais (Figs, 14 e 15)

Figura 14 – Variações espectrais de HRP (5 μ M) incubado com IBAL (10 mM, 37°C) na A- ausência e B- presença de 0,5 mM de sorbato. Cada traço equivale a um espectro obtido nos tempos de incubação indicados na legenda.

Figura 15 – Variação temporal de absorvância dos máximos em 400 nm (linha preta), 410 nm (linha vermelha) e 420 nm (linha verde) de HRP (5 μ M) incubado com IBAL (10 mM, 37°C) na A- ausência e B- presença de 0,5 mM de sorbato.

Figura 16 – Cinética da variação de absorvância dos máximos em 400 nm (linha preta), 410 nm (linha vermelha) e 420 nm (linha verde) de HRP (5 μ M) incubado com IBAL (10 mM, 37°C) antes (primeiros 10 min) e após um min de injeção de 0,5 kgf.cm⁻³ de O₂ comercial (últimos 9 min).

A figura 16 mostra o monitoramento da variação da absorção de luz em 400 nm, 410 nm e 420 nm, durante 10 min de incubação de HRP (5 μ M) com IBAL (10 mM). Após este período, purgou-se O₂ (0,5 kgf.cm⁻³) durante um min na solução cuja HRP já apresentava o máximo em 400 nm e, então, nova cinética foi traçada. É possível observar que, após injeção de O₂ no meio de reação, a banda Soret desloca-se novamente para o máximo de 420 nm, demonstrando formação de composto II. Salienta-se, porém, que a intensidade obtida é menor do que a observada durante os primeiros 10 min de reação, reafirmando a hipótese de que a HRP sofreu descoramento durante o processo. O mesmo experimento foi realizado adicionando-se novamente IBAL 10 mM ao meio de reação, após 10 min de reação. Neste caso observou-se apenas a continuidade do descoramento, sem novos deslocamentos do máximo de 400 nm para 420 nm, demonstrando que após o consumo de O₂ no meio, nova adição de IBAL apenas descora a proteína, sem reiniciar o ciclo de geração de composto II. Este resultado indica o O₂ é um fator limitante para a oxidação do IBAL e que pode contribuir para formação de peróxido do IBAL, já que a HRP volta a ser oxidada.

Com a finalidade de observar possíveis lesões causadas pelos produtos excitados da reação de oxidação causada pela HRP, foram realizados experimentos de eletroforese em gel desnaturante de acrilamida (12%) (SDS-PAGE) de HRP 1 mg/mL incubados com diferentes concentrações de IBAL (figura 17A) ou com 10 mM de IBAL mas variando-se o tempo de incubação (figura 17B). Ao variar o tempo de incubação, a banda perde cerca de $30 \pm 12\%$ de sua intensidade inicial, chegando a perder até cerca de $75 \pm 5,7\%$ após 24 h de incubação (figura 17B). Observa-se também que a incubação a 37°C causa pouca alteração na proteína, já que as

amostras mantidas nestas condições não apresentaram diferenças significativas ($96 \pm 5,7\%$) com relação ao controle não incubado. A concentração de IBAL também afetou a intensidade das bandas, indicando uma perda de $58 \pm 6,3\%$ (figura 18A) na presença 4 mM de IBAL, após 24 h de incubação. Pelo formato das bandas obtidas após a alteração na HRP provocada por IBAL, especula-se que houve apenas a perda de massa da proteína, já que se formou uma extensão da banda (cometa). Não há evidências da formação de dímeros (*crosslinking*) da proteína.

Após estes experimentos, novas amostras foram preparadas sob atmosfera de N_2 , para verificar se as alterações observadas eram decorrentes da formação de compostos excitados (figura 19). Observa-se que a diminuição das bandas ocorre já com 1,0 mM de IBAL, enquanto, na presença de O_2 , são necessários 4,0 mM de IBAL para variar significativamente a densidade da banda. Tal resultado é indicativo de que a oxidação do aldeído protege a proteína do efeito lesivo deste composto.

Figura 17 – Géis de acrilamida 12 % (SDS-*Page*) da HRP (1 mg/mL) incubada a 37°C com A- diferentes concentrações de IBAL e B- com 10 mM de IBAL, variando-se o tempo de incubação.

Figura 18 - Densitometria das bandas dos géis de SDS-*Page* da HRP (1 mg/mL) incubada a 37°C com (A) diferentes concentrações de IBAL e (B) com 10 mM de IBAL, variando-se o tempo de incubação.

Figura 19 - Gel de acrilamida 12% (SDS-*Page*) da HRP (1 mg/mL) incubada a 37°C com diferentes concentrações de IBAL em atmosfera de N₂.

Realizaram-se experimentos para verificar o efeito da concentração de IBAL na velocidade da emissão de luz. Observa-se na figura 20A, B e C que a velocidade máxima de emissão de luz, analisada através da região linear do gráfico de emissão, é atingida com a concentração de 20 mM de IBAL, incubados a 37°C com 5 μ M de HRP em tampão fosfato. Porém, na figura 20D é possível verificar que há uma diminuição exponencial na quantidade total de luz emitida (determinada pela área), à medida que a concentração do aldeído aumenta, sendo as emissões máximas obtidas com 3 e 5 mM de IBAL. Embora quanto mais rápido for o consumo de oxigênio menor seja a desativação dos compostos excitados, a rápida depleção deste gás também limita a atividade da enzima (Cilento, 1984). Na figura 20E é possível observar o espectro de emissão obtido durante a oxidação de 10 mM de IBAL por 5 μ M de HRP, em tampão fosfato 50 mM contendo 20 μ L de acetonitrila (volume final da solução preparada foi 3 mL). Observa-se que o máximo de emissão é próximo de 450 nm, confirmando a presença de acetona excitada, conforme resultados obtidos anteriormente em meio contendo etanol para solubilizar o aldeído (Bechara *et al.*, 1979).

Para verificar o consumo de oxigênio no meio reacional, experimentos de oximetria foram realizados nas mesmas condições utilizadas para o experimento de luminescência (figura 21). A velocidade de consumo de O₂ foi analisada a partir da região linear do gráfico de consumo deste gás (Baader *et al.*, 1985). Observa-se na figura 21B o aumento linear na velocidade de consumo de oxigênio com o aumento na concentração de IBAL ($k_{2app} = 1,11 \text{ Ms}^{-1}$). Estes resultados, embora

não sejam inesperados (Bechara *et al.*, 1979), demonstram a formação de espécies excitadas durante a oxidação enzimática de IBAL no meio reacional selecionado.

Figura 20 - Gráficos da emissão de luz no sistema IBAL/O₂/HRP em tampão fosfato pH 7,4 contendo 20 μ L de acetonitrila (volume final 3 mL). Em A- apresenta-se a variação na velocidade e emissão de luz alterando-se a concentração de IBAL (de 3 a 30 mM) na presença de 5 μ M de HRP. B- Aumento da velocidade na emissão de luz, mostrando que o limite deste aumento ocorre com 20 mM. C- Região linear do aumento da velocidade de emissão de luz. D- Correlação entre a variação do total de luz emitida e concentração de IBAL (mM). E- Espectro de emissão obtido durante a incubação de 10 mM de IBAL com 5 μ M de HRP. Para obtenção do espectro de emissão de luz, utilizou-se um monocromador antes do detector, variando de 5 em 5 nm, começando em 350 a 550 nm com acúmulo de 30 varreduras.

Figura 21 - Consumo de O_2 na presença de 5 μ M de HRP e diferentes concentrações de IBAL. A- Consumo de O_2 . B- Plotagem da velocidade observada de consumo de O_2 pela variação da concentração de IBAL.

5.2. Detecção dos radicais formados no sistema HRP/ O_2 /IBAL através de EPR utilizando MNP como captador de spin.

Experimentos de EPR foram realizados adicionando-se o *spin trap* MNP (20 mM) ao sistema contendo HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM). Após a preparação das amostras, estas foram incubadas durante 1 min sendo então transferidas para a cubeta específica. As primeiras detecções foram iniciadas depois de 2 min do término da incubação.

Observa-se na figura 22 que, passados 6 min da preparação da amostra, torna-se evidente a formação de um sinal triplete, de constante de acoplamento com valor de 0.81 mT. Segundo Buettner (1987), estes espectros podem ser atribuídos ao aduto radical de MNP com o radical acetil, que pode ser formado por clivagem α da acetona triplete. Seis minutos depois do aparecimento deste primeiro sinal, surge um novo triplete de constante de acoplamento de 1,59 mT. Há na literatura descrição de um radical de aminoácido com este valor de constante de acoplamento, correspondente ao radical $\dot{C}H(NH_2)COO^-$ (Makino *et al.*, 1984). Nesta referência, o radical foi formado por radiação γ a partir de glicina. Considerando-se que o sinal visualizado na figura 22 é isotrópico e estreito (Davies; Hawkins, 2004), não se espera que semelhante radical de aminoácido seja formado na proteína. Portanto, o sinal em questão deve se referir a um radical de baixo peso molecular formado no meio de reação. Desta forma, devido à semelhança com o radical do aminoácido, atribuiu-se este sinal ao radical terciário $(CH_3)_2\dot{C}COH$, formado a partir da

abstração de hidrogênio do IBAL, o que é consistente com o mecanismo proposto para a reação IBAL/HRP com base nos produtos formados – acetona e fomiato.

Figura 22 - Espectros de EPR de adutos do MNP (20 mM) gerados após 1 min de incubação com HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM) a 37°C em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4. Em destaque, os valores calculados de constante de acoplamento do radical acetil (x) e do radical do IBAL (o). Os tempos de obtenção dos radicais estão indicados na figura. Dados para obtenção destes sinais: *Ganho*: 5.02×10^5 ; *Modulação da Frequência*: 100.0 kHz; *Modulação da Amplitude*: 0.5 G; *Frequência do Microondas*: 9.849 GHz; *Canal*: *Conversão*: 40.960 ms; *Constante do Tempo* *Time Const*: 81.920 ms; *Tempo de Varredura*: 41.943 s.

Figura 23 - Simulação do espectro de EPR obtido após 15 min da preparação do meio de reação contendo MNP (20 mM), HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM), em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4, sugerindo os radicais acetila ($a_N = 0,8$ mT) e o radical *terc*-bútflico do IBAL ($a_N = 1,6$ mT).

Comparando-se os espectros obtidos apenas com o MNP, MNP e IBAL ou MNP e HRP (figura 24), observa-se que nestes espectros-controle houve a formação de um sinal de baixa intensidade, de uma espécie química com constante de acoplamento igual a 1,7 mT, correspondente ao sinal de um radical contaminante produzido pelo próprio MNP (Massari *et al.*, 2010).

Para verificar novamente o efeito supressor de sorbato na formação destes radicais, observa-se que a inclusão de 5 mM de sorbato (figura 25, linha B) no meio de reação contendo 100 mM de IBAL, 20 mM de MNP e 20 μ M de HRP causou uma diminuição significativa na intensidade do sinal correspondente ao radical acetil, transcorridos 12 min da preparação do meio de reação. No controle sem sorbato (figura 25, linha A), a intensidade do sinal correspondente ao radical acetila é máxima. Tal resultado se repete na presença de 20 mM de IBAL (figura 25, linha C). Verifica-se também, aos 21 min, que houve uma diminuição na intensidade do sinal correspondente ao radical do IBAL (figura 25, linhas D, E e F). Esta diminuição é maior na presença de 20 mM de sorbato (figura 25, linha F) comparando-se com 5 mM de sorbato (figura 25, linha E). Tal resultado indica que tanto a primeira quanto a segunda espécie radicalares são dependentes da formação de acetona triplete, visto que a presença do supressor de compostos excitados diminuiu a intensidade dos sinais de EPR dos dois radicais.

Salienta-se o fato de o sinal do radical do IBAL aparecer posteriormente ao do radical acetila. Isto pode ser decorrente das diferentes velocidades de reação destes radicais com o MNP, já que a formação do radical do IBAL pela enzima antecede a geração de espécies tripletes, além de que o radical acetila intermediário pode abstrair átomo de hidrogênio do próprio IBAL, iniciando outra cadeia de reação.

Outros experimentos de EPR, utilizando o captador de spin DMPO, foram realizados para verificar se há formação de outros radicais. Os resultados obtidos com DMPO (100 mM), após incubação com IBAL (100 mM) e HRP (20 μ M) mostram que, após 3 min do início da reação, já é possível perceber a formação de um spin aduto (figura 26A, linha a), cuja intensidade aumenta após 6 min (figura 26A, linha b). Aos 9 min de incubação (figura 26A, linha c), o sinal já não pode mais ser observado, indicando baixa estabilidade do aduto.

Através da simulação (figura 26B, linha vermelha) do espectro obtido após 6 min do início da reação (figura 26A, linha b), obteve-se a constante de acoplamento do aduto da interação

dipolar entre o radical observado e o spin nuclear do ^{14}N do DMPO, de valores a_{N} 1,56 mT e a_{H} 2,11 mT. Estes valores foram comparados com aqueles do banco de dados do *National Institute of Environmental Health Sciences* do *National Institute of Health*, o Spin Trap Database (Li *et al.*, 1988), através do qual se obteve informação de que estas constantes de acoplamento são semelhantes às de diferentes radicais centrados em carbono. Uma das constantes de acoplamento de valores semelhantes ao obtido nestes experimentos foi descrita por Inanami *et al.* (1988), para um radical $\cdot\text{CHR}_1\text{R}_2$, com a_{N} 17,7 G e a_{H} 20,8 G, obtido a partir de lisozima irradiada com radiação gama. Timmins *et al.* (1997) também descreveram um radical centrado em carbono derivado de oxidação do produto de adição-1,3 de oxigênio singlete em tetrametiletileno promovida por HRP, de constante de acoplamento a_{N} 16.2 G e a_{H} 23.3 G.

Buscas no mesmo banco de adutos entre DMPO e radical metila revelaram constantes de acoplamento, em meio aquoso, de valores próximos à a_{N} 1,6 mT e a_{H} 2,3 mT, semelhantes à descritas por Timmins *et al.* (1997). Para o radical acetila somente foram obtidos dados para reação em solução de acetona, com a_{N} 1,3 mT e a_{H} 1,7 mT. Estes dados sugerem que o aduto descrito nesta tese se trata de um radical centrado em carbono diferente dos radicais acetila e metila, esperados devido à clivagem alfa da acetona triplete. Considerando-se todos estes dados, sugere-se que este aduto pode ser formado por uma reação entre o radical terciário do IBAL e o DMPO. Controles preparados apenas com IBAL ou HRP não resultaram na formação de qualquer aduto (figura 26C). Outros ensaios utilizando sorbato como supressor de carbonilas tripletes, levaram à diminuição da intensidade do sinal do referido aduto (figura 26D, linhas b e c). Estes resultados sugerem que o sinal do aduto antes mencionado é formado a partir da geração de acetona triplete, já que a supressão destes compostos excitados também interfere na produção do sinal anteriormente descrito. Porém é importante mencionar que o sorbato também pode reagir com o radical do IBAL, o que poderia resultar em diminuição de seu sinal de EPR.

Figura 24 - Comparação entre o espectro obtido após incubação de solução contendo MNP, HRP e IBAL, com espectros controles. Espectro obtido após 15 min da preparação do meio de reação contendo A- MNP (20 mM), HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM), em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4, demonstrando os radicais acetila (x) e o radical do IBAL (o), com espectros controles obtidos no mesmo período de B- MNP (20 mM), e IBAL (100 mM), C- MNP (20 mM) e HRP (20 μ M) e apenas D- MNP (20 mM), apresentando o sinal do radical contaminante de MNP (z). Em detalhe os valores calculados para os sinais mencionados.

Figura 25 – Comparação entre o espectro obtido após incubação de solução contendo MNP, HRP e IBAL, com os espectros obtidos com a adição de sorbato. Espectro obtido após 12 min e 21 min da preparação do meio de reação contendo MNP (20 mM), HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM), em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4, com os espectros obtidos com a adição de sorbato 5 mM e 20 mM no meio de reação. A- MNP (20 mM), HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM), 12 min; B- MNP (20 mM), HRP (20 μ M), IBAL (100 mM) e Sorbato (5 mM) 12 min; C- MNP (20 mM), HRP (20 μ M), IBAL (100 mM) e Sorbato (20 mM) 12 min; D- MNP (20 mM), HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM), 21 min; E- MNP (20 mM), HRP (20 μ M), IBAL (100 mM) e Sorbato (5 mM) 21 min; F- MNP (20 mM), HRP (20 μ M), IBAL (100 mM) e Sorbato (20 mM) 21 min.

Figura 26 – Espectros e simulação de EPR de DMPO obtidos após incubação de solução contendo HRP e IBAL. **A** - Espectros de EPR de DMPO (100 mM) obtidos após incubação com HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM) (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). Linha a: Espectro de DMPO obtido após 3 min de incubação com IBAL e HRP; linha b: Espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL e HRP; linha c: Espectro de DMPO obtido após 9 min de incubação com IBAL e HRP. **B** - Simulação do espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL (100 mM) e HRP (20 μ M). Linha preta: resultado experimental; linha vermelha: simulação ($a_N = 1,56$ mT, $a_H = 2,11$ mT, g shift = 0,39). **C** - Controles do EPR do DMPO (100 mM) obtidos após incubação de IBAL 100 mM e HRP 20 μ M (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). Linha a: Espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL e HRP; linha b: Controle com apenas HRP; linha c: Controle com apenas IBAL. **D** - Espectros de EPR de DMPO (100 mM) obtidos 6 min após incubação com HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM) na presença de sorbato (10 e 20 mM) (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). Linha a: Espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL e HRP; linha b: Espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL, HRP e sorbato 10 mM; linha c: Espectro de DMPO obtido após 6 min de incubação com IBAL, HRP e sorbato 20 mM.

5.3. Detecção de $^1\text{O}_2$ gerado a partir de fontes enzimática e química de acetona tripleto

A figura 26 apresenta as cinéticas de decomposição térmica de 10 mM TMD (70°C) tanto na faixa do UV-Vis (figura 27A), quanto na região do infravermelho próximo em 1270 nm (IV) (figura 27B). As linhas “a” representam as cinéticas obtidas em CCl_4 , enquanto as linhas “b” se referem às cinéticas obtidas em acetonitrila (Figura 27A e B). A figura 27C mostra a espectro de

emissão da acetona excitada proveniente da decomposição térmica de TMD em CCl_4 e a figura 27D corresponde à emissão de $^1\text{O}_2$ obtida nas mesmas condições.

Demonstrou-se formação de $^1\text{O}_2$ a partir de acetona triplete formada durante a decomposição térmica do dioxetano em CCl_4 já que não havia nenhuma outra fonte de espécies excitadas no meio. Porém, não foi possível realizar a detecção direta de $^1\text{O}_2$ pela decomposição do TMD em acetonitrila (figura 27B, linha "b"). Este resultado pode ser explicado pela diferença do tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em CCl_4 (0,02–0,03 s) em comparação com o tempo de vida em acetonitrila ($5,0\text{--}8,0 \times 10^{-5}$ s) (Wilkinson *et al.*, 1995; Briviba *et al.*, 1996). A diferença entre a contagem obtida em CCl_4 e em acetonitrila também tem contribuição da maior concentração de O_2 dissolvido no solvente menos polar.

Outros experimentos, variando-se a concentração de TMD de 2,0 a 10,0 mM, com produção de acetona triplete variando de $2,2 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ a $9,7 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$, resultaram em cinéticas de geração de $^1\text{O}_2$ semelhantes, em concentração aproximadamente $4,89 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1} \pm 0,98 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1}$. Estes dados indicam que deve ter havido "saturação" na produção de $^1\text{O}_2$, possivelmente em decorrência da concentração limitada do O_2 dissolvido. Conforme Briviba *et al.* (1996) já haviam observado, a geração de $^1\text{O}_2$ é pouco eficiente e o rendimento calculado foi de 0,2%.

Tentativas de detecção direta de $^1\text{O}_2$ utilizando o sistema IBAL/HRP foram realizadas e não foi possível obter, mesmo em D_2O , qualquer sinal de emissão em 1270 nm, equivalente ao $^1\text{O}_2$. Ressalta-se que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em D_2O ($5,0\text{--}6,5 \times 10^{-5}$ s) e em acetonitrila são semelhantes (Wilkinson *et al.*, 1995). Além disso, é importante considerar que a oxidação do IBAL depende do consumo de oxigênio e, portanto, mesmo que haja formação de espécie excitada produzida no centro catalítico da enzima, a concentração de O_2 neste microambiente tende a zero. Assim, somente as carbonilas tripletes que "escapam" do centro catalítico poderiam transferir energia para outras moléculas dissolvidas no meio.

Foram realizados, então, experimentos de EPR utilizando o *spin trap* TEMP. Este *spin trap* já foi utilizado para detecção de $^1\text{O}_2$ em células, portanto, em ambiente de baixa concentração desta molécula excitada (Lavi *et al.*, 2004). Durante a incubação de IBAL (100 mM) com HRP (20 μM) (figura 28A, linha a) observou-se a formação de um sinal triplete, que não foi detectado na presença de somente IBAL ou HRP (figura 28A, linhas b e c respectivamente). Adicionando-se conhecidos supressores de $^1\text{O}_2$, como a azida de sódio (NaN_3) (figura 28A, linha f) e a diamina

terciária 1,4-diazabicyclooctano (DABCO) (figura 28A, linha e) (Krinsky, 1974), o sinal do EPR é também suprimido (Di Mascio;Sies, 1989). O mesmo ocorre na presença de sorbato (figura 28A, linha g) (Velosa *et al.*, 2007). Observa-se, na figura 28B, a simulação (linha vermelha) do sinal do TEMP obtido após incubação com IBAL e HRP, cuja constante de acoplamento calculada foi de 1,59 mT e, assim o sinal triplete observado de EPR pode ser correlacionado com o produto de reação de TEMP com $^1\text{O}_2$, o 4-O-TEMPO ($a_N = 1,56$ mT). Realizou-se também ensaios em tampão D_2O (pD 7,4) (figura 28A, linha d). Neste ensaio, esperava-se que o sinal aumentasse devido ao maior tempo de vida do $^1\text{O}_2$ neste solvente, mas, inexplicavelmente, ocorreu uma diminuição de sua intensidade.

Novos espectros de EPR foram obtidos (figura 28C), incubando-se o TEMP, tanto com o sistema enzimático IBAL (100 mM) e HRP (20 μM), quanto com TMD (4 mM). Imediatamente após a aquisição dos sinais apresentados, adicionou-se à solução já previamente preparada, solução de 0,4 μM de 4-O-TEMPO comercial como padrão interno, para verificar se aparecia um novo sinal, indicando outra espécie diferente daquela formada da reação entre o TEMP e o $^1\text{O}_2$. Os resultados obtidos mostram perfeita sobreposição dos sinais e corroboram hipótese de formação de $^1\text{O}_2$ durante a oxidação do IBAL pela HRP, sendo que a supressão por sorbato sugere que $^1\text{O}_2$ é formado por transferência de energia do produto primário da reação, acetona triplete.

Figura 27 – Luminescência resultante da decomposição térmica do TMD (70°C). A- Cinética de emissão na região do UV-Vis em CCl_4 (linha a) e acetonitrila (linha b). B- Cinética de emissão em 1270 nm em CCl_4 (linha a) e acetonitrila (linha b). C- Espectro de emissão na região do UV-Vis durante a decomposição térmica do TMD em CCl_4 . D- Espectro obtido durante a decomposição de TMD na região do infravermelho próximo.

Figura 28 – **A** - Espectros de EPR de TEMP (30 mM) obtidos após incubação com HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM) (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, 37°C). Linha a: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL e HRP; linha b: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL; linha c: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com HRP; linha d: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL e HRP em tampão fosfato de sódio (50 mM pD 7,4) preparado em D₂O.; linha e: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL, HRP e 10 mM de DABCO; linha f: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL, HRP e 10 mM de NaN₃; linha g: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL, HRP e 10 mM de sorbato.

B - Simulação do espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP (30 mM) com IBAL (100 mM) e HRP (20 μ M). Linha preta: resultado experimental; linha vermelha: simulação ($a_N = 1,59$ mT, $g\text{-shift} = 0,4$).

C - Espectros de EPR de TEMP (30 mM) obtidos após incubação com HRP (20 μ M) e IBAL (100 mM) (37°C) ou TMD (4 mM, 60°C) (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4). Linha a: Espectro obtido após 4 min de incubação de TEMP com TMD; linha b: Espectro obtido após 4 min de incubação de TEMP com TMD e, imediatamente após a incubação, foi acrescentado 0,4 μ M de 4-*O*-TEMPO; linha c: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL e HRP; linha d: Espectro obtido após 6 min de incubação de TEMP com IBAL e HRP e, imediatamente após a incubação, foi acrescentado 0,4 μ M de 4-*O*-TEMPO.

Para corroborar os resultados obtidos através da técnica de EPR, utilizou-se técnica considerada inequívoca para captação de ¹O₂ por EAS. Para tal, 8 mM de TMD foi incubado em tampão fosfato preparado em D₂O (pD 7,4) em atmosfera enriquecida com ¹⁸O₂. Através de HPLC/MS, pode-se constatar, na figura 30, a geração do endoperóxido de EAS (EASO₂) e, a

figura 29 mostra o cromatograma do EAS não incubado. A análise de transição de relação m/z (equivalente à perda de O_2 após a fragmentação do $EASO_2$) revela que houve produção de cerca de 12 vezes mais $EAS^{18}O_2$ (m/z 230 $\rightarrow$ 212) do que $EAS^{16}O_2$ (m/z 228 $\rightarrow$ 212). Apenas traços de $EAS^{16}O^{18}O$ (m/z 229 $\rightarrow$ 212) foram observados. Estes resultados são indício inequívoco de que a geração de 1O_2 se deu por transferência de energia de acetona triplete formada pela termólise do TMD para o oxigênio dissolvido o qual não contém ^{18}O em sua composição. A formação de $EAS^{16}O_2$ pode ser explicada por traços de $^{16}O_2$ que permaneceram na solução após o ciclo de congelamento e descongelamento e/ou durante a manipulação da solução, por irradiação luminosa (Wasserman;Larsen, 1972).

A mesma reação foi preparada sob pressão atmosférica de $^{16}O_2$ e não se observou, como esperado, $EAS^{18}O_2$ (figura 31). Neste experimento, a concentração de $EASO_2$ calculado (através de curva padrão de $EASO_2$ preparado por irradiação de azul de metileno) foi de aproximadamente $385 \pm 34 \mu M$. É preciso considerar, porém, que a concentração de EAS utilizada corresponde à sua concentração β e, portanto, ele capta 50% do 1O_2 produzido. Este resultado indica que a produção de 1O_2 foi de cerca de $770 \pm 67 \mu M$. Considerando o rendimento de geração de acetona triplete a partir de 8 mM de TMD de 30% (Turro;Lechtken, 1972), portanto capaz de produzir aproximadamente 2,4 mM de acetona triplete, neste caso, o rendimento de 1O_2 calculado foi de aproximadamente 25,6%, bem maior que aquele obtido através dos experimentos de detecção direta. Como o 1O_2 é sequestrado pelo EAS, ao invés de decair para o estado fundamental (como ocorre nos experimentos de luminescência), a acetona triplete pode transferir energia para outra molécula de O_2 , o que pode explicar o aumento calculado do rendimento obtido por esta técnica.

O mesmo experimento de captação de oxigênio singlete foi realizado utilizando o sistema enzimático IBAL/HRP como fonte de acetona triplete, em atmosfera enriquecida com $^{18}O_2$, porém, os resultados obtidos (figura 32) indicam que, neste caso, o sinal de transição obtido para $EAS^{18}O_2$ (m/z 230 $\rightarrow$ 212) equivale a apenas 1,64 vezes o sinal obtido para $EAS^{16}O_2$ (m/z 228 $\rightarrow$ 212). Entretanto, é importante salientar que este experimento foi realizado incubando-se o sistema reacional durante 72 h e, neste intervalo de tempo, o $^{16}O_2$ pode ter-se difundido para dentro da vidraria já que a bomba de vácuo não foi ligada durante este período. Tendo em vista que a reação de geração de dioxetano a partir do IBAL ocorre através da formação de um peróxido

(Baader *et al.*, 1985), poderia haver geração de $^1\text{O}_2$ através de mecanismo de Russel, porém, novamente, não se observou a formação de $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$.

Quando se repetiu o mesmo experimento em pressão atmosférica de O_2 (figura 33), a concentração obtida de $^1\text{O}_2$ foi de $1,98 \pm 0,44 \mu\text{M}$, o que corresponde a um rendimento de 0,004% em comparação com a concentração inicial de IBAL (50 mM). Considerando que o rendimento de geração de acetona triplete na oxidação de IBAL por HRP é de cerca de 20% (Cilento, 1984), o rendimento de geração de $^1\text{O}_2$ seria de 0,02%. É importante salientar, novamente, que o O_2 dissolvido é consumido durante a reação, o que pode afetar o rendimento da reação.

Experimentos de supressão de acetona triplete foram realizados usando sorbato como supressor (Velosa *et al.*, 2007) durante incubação de TMD em CCl_4 , com acompanhamento de emissão de onda eletromagnética, tanto na região do UV-Vis, quando em 1270 nm. Como se pode observar na figura 34, embora tenha ocorrido alguma supressão de acetona triplete, nestas condições, a geração de $^1\text{O}_2$ não sofreu mudança significativa. O mesmo resultado foi observado utilizando o método de captação por EAS, na presença de até 32 mM de sorbato, indicando que, embora o sorbato possa suprimir parte da acetona triplete gerada, ainda havia acetona excitada suficiente para produzir $^1\text{O}_2$ no sistema contendo TMD (figura 35). Porém, quando o sorbato (8 mM) foi utilizado como supressor durante a incubação de 50 mM de IBAL com HRP, o pico correspondente à transição $m/z\ 228 \rightarrow 212$ (figura 36) apresentou área cerca de 4 vezes menor que aquela correspondente ao controle. Salienta-se que, pelo fato do sorbato ser um dieno, o $^1\text{O}_2$ pode reagir com este composto, porém a constante de reação do sorbato com o $^1\text{O}_2$ varia de 10^4 e $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, enquanto a constante de supressão da acetona triplete por sorbato é de $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. (Velosa *et al.*, 2007).

Considerando que a concentração de O_2 pode ser um fator limitante para a geração de $^1\text{O}_2$ durante a incubação do TMD em CCl_4 , novos experimentos de luminescência (figura 37) foram realizados, mas, desta vez, 10 min após a iniciação da decomposição térmica, purgou-se O_2 comercial através de uma cânula, no interior da cubeta. Como se pode observar na figura 37, não houve aumento de emissão a 1270 nm, mas, houve queda na emissão obtida na região do UV-Vis e também na região do infra-vermelho. A capacidade do O_2 de suprimir carbonilas tripletes é conhecida há algumas décadas (Merkel; Kearns, 1973). Mais tarde, Mcgarvey *et al.* (1992) também observaram, testando naftalenos no estado triplete em benzeno, uma correlação inversa entre a

supressão causada pelo O_2 e a formação de 1O_2 , tendo concluído que este fenômeno estava relacionado com a estrutura do naftaleno, não com as diferentes concentrações de O_2 .

Figura 29 – A- Cromatograma monitorado pela absorção em 210 nm de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO₂ em tampão fosfato D₂O (pD 7,4). B- Cromatograma monitorado pela detecção de íons em fase gasosa de separação do EAS de EASO₂. C- Cromatograma de transição de m/z de 230 para 212, correspondente ao EAS-¹⁸O₂, com determinação da área (UA). D- Cromatograma relativo à transição de m/z de 229 para 212, correspondente ao EAS-¹⁶O¹⁸O, com determinação da área (UA). E- Cromatograma relativo à transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao EAS-¹⁶O₂, com determinação da área (UA). As estruturas de EAS e EASO₂ estão representadas na figura.

Figura 30 – A- Cromatograma monitorado pela absorção em 210 nm demonstrativo da separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO₂ formado na incubação de TMD em tampão fosfato D₂O (pD 7,4) e atmosfera enriquecida com $^{18}\text{O}_2$ (2 horas 70°C). B- Cromatograma de detecção de íons em fase gasosa de separação do EAS de EASO₂. C- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao EAS¹⁶O₂, com determinação da área (UA). D- Cromatograma de transição de m/z de 229 para 212, correspondente ao EAS¹⁶O¹⁸O, com determinação da área (UA). E- Cromatograma de transição de m/z de 230 para 212, correspondente ao EAS¹⁸O₂, com determinação da área (UA). F- Espectro de fragmentação do íon de m/z 228. G- Espectro de fragmentação do íon de m/z 230. As estruturas correspondentes estão representadas na figura.

Figura 31 – A- Cromatograma traçado via detecção de íons em fase gasosa referente à separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO_2 sob incubação com TMD em tampão fosfato D_2O (pD 7,4) (24 horas 60°C). B- Cromatograma de transição de m/z de 230 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$, com determinação da área (UA). C- Cromatograma de transição de m/z de 229 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, com determinação da área (UA). D- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}_2$, com determinação da área (UA).

Figura 32 – A- Cromatograma monitorado pela absorção em 210 nm indicativo da separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO₂, sob incubação com IBAL/HRP em tampão fosfato D₂O (pD 7,4) e atmosfera enriquecida com ¹⁸O₂ (72 horas 25°C). B- Cromatograma de detecção de íons em fase gasosa de separação do EAS de EASO₂. C- Cromatograma de transição de m/z de 230 para 212, correspondente ao EAS¹⁸O₂, com determinação da área (UA). D-Cromatograma de transição de m/z de 229 para 212, correspondente ao EAS¹⁶O¹⁸O, com determinação da área (UA). E-Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao EAS¹⁸O₂, com determinação da área (UA). F- Espectro de fragmentação do íon de m/z 228. G- Espectro de fragmentação do íon de m/z 230. As estruturas correspondentes estão representadas na figura.

Figura 33 – A- Cromatograma monitorado pela detecção de íons em fase gasosa de separação de EAS (concentração inicial 8mM) de EASO_2 , incubado com IBAL/HRP em tampão fosfato D_2O (pD 7,4) (24 horas 37°C). B- Cromatograma de transição de m/z de 230 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$, com determinação da área (UA). C- Cromatograma de transição de m/z de 229 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, com determinação da área (UA). D- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}_2$, com determinação da área (UA).

Figura 34 – Luminescência resultante da decomposição térmica do TMD (80°C). A- Cinética de quimioluminescência de TMD 2 mM na região do UV-Vis em CCl_4 (linha a) e na presença de 0,50 mM (linha b) e 1,0 mM (linha c) de sorbato. B- Cinética de emissão em 1270 nm em CCl_4 (linha a) e com 0,5 mM (linha b) e 1,0 mM (linha c) de sorbato.

Figura 35 – A- Cromatograma monitorado pela detecção de íons em fase gasosa de separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO_2 , incubado com TMD 8 mM em tampão fosfato D_2O (pD 7,4) (24 horas 70°C). B- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}_2$, com determinação da área (UA). C- Cromatograma de detecção de íons em fase gasosa de separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO_2 incubado com TMD e 8 mM de sorbato em tampão fosfato D_2O (pD 7,4) (24 horas 60°C). D- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao $\text{EAS}^{16}\text{O}_2$, com determinação da área (UA).

Figura 36 – A- Cromatograma monitorado pela detecção de íons em fase gasosa de separação de EAS (concentração inicial 8 mM) de EASO₂ incubado com IBAL/HRP em tampão fosfato D₂O (pD 7,4) (24 horas 37°C). B- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao EAS¹⁶O₂, com determinação da área (UA). C- Cromatograma de detecção de íons em fase gasosa de separação de EAS (concentração inicial 8mM) de EASO₂ incubado com IBAL/HRP e sorbato 8 mM em tampão fosfato D₂O (pD 7,4) (24 horas 37°C). D- Cromatograma de transição de m/z de 228 para 212, correspondente ao EAS¹⁶O₂, com determinação da área (UA).

Figura 37 – Quimioluminescência resultante da decomposição térmica do TMD (80°C). A- Cinética de emissão de TMD 5 mM na região do UV-Vis em CCl₄. B- Cinética de emissão em 1270 nm em CCl₄. Após 10 min de incubação, injetou-se fluxo de O₂ comercial, conforme indicado através da seta.

5.4. Estudo do efeito de aminoácidos sobre a emissão de luz no sistema HRP/O₂/IBAL.

Com o intuito de verificar quais aminoácidos são alvos de acetona triplete, estudou-se o efeito dos aminoácidos selecionados, L-Ser, L-Thr, L-Cys, L-Lys, L-Tyr, L-His, L-Trp sobre a acetona triplete gerada através do sistema IBAL/HRP, observando-se quais deles são supressores da luz emitida. Os quatro primeiros aminoácidos foram selecionados como possíveis doadores de hidrogênio à acetona triplete, a L-Tyr como acceptor de radical hidroxila, a L-His como acceptora de oxigênio singlete e o L-Trp como possível acceptor de radical hidroxila, alvo de oxigênio singlete e acceptor dos radicais de IBAL no grupo ϵ -amino. Primeiramente estudou-se o efeito da concentração de IBAL sobre a velocidade da emissão de luz. Para estudar o efeito dos aminoácidos, utilizou-se 20 mM de IBAL e 5 μ M de HRP, variando-se as concentrações dos aminoácidos estudados. Na figura 38 encontram-se os resultados para L-Ser (figura 38A), L-Thr (figura 38B) e L-Lys (figura 38C). Observa-se, porém, que nenhum destes aminoácidos suprime a emissão de luz. Inesperadamente houve leve aumento na emissão de luz (figuras 38A e B). Salienta-se que, mesmo com a inclusão de 10 mM de aminoácido, o pH do sistema não sofreu variações, manteve-se entre 7,40 e 7,42.

Na figura 39 estão apresentados os resultados para a L-His (A), L-Cys (B), L-Trp (C) e L-Tyr (D). Observou-se que estes aminoácidos foram capazes de suprimir a quimioluminescência dos compostos excitados. Aplicou-se, então, a equação de Stern-Volmer, mesmo considerando que as cinéticas de reações modificaram com a incorporação dos aminoácidos selecionados. Para realização do cálculo de supressão por Stern-Volmer, é necessário que a cinética da reação mantenha-se constante, o que difere dos resultados de emissão de luz obtidos. Porém, o cálculo foi realizado ainda assim, para selecionar o aminoácido à ser pesquisado nas próximas etapas. Assim determinou-se as constantes de supressão ($k_q\tau$), à partir do coeficiente angular da equação obtida, para cada um dos compostos: L-His ($k_q\tau = 6,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), L-Cys ($k_q\tau = 5,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$), L-Trp ($k_q\tau = 6,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) e L-Tyr ($k_q\tau = 1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), onde k_q e τ são constante de supressão e vida média do estado, respectivamente. Considerando-se que o τ de acetona triplete é cerca 20 μ s em meio deaerado, pode-se então deduzir que os valores de k_q estejam na faixa de $3,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para L-His, $2,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para L-Cys e três ordens de grandeza maior para o L-Trp e L-Tyr ($3,2 \times 10^{10}$ e $7,0 \times 10^{10}$, respectivamente). Estes dados são indicativos de supressão colisional por L-His e L-Cys, mas são inexplicáveis para os casos de L-Trp e L-Tyr.

Figura 38 – Emissão de luz obtida durante a incubação de IBAL (20 mM) com HRP (5 μ M) na presença dos aminoácidos (A) L-Ser, (B) L-Thr e (C) L-Lys.

Figura 39 – Emissão de luz obtida durante a incubação de IBAL (20 mM) com HRP (5 μ M) na presença dos aminoácidos (A) L-His, (B) L-Cys, (C) L-Trp e (D) L-Tyr.

Para verificar se os valores de k_q observado para L-Trp e L-Tyr podem ser explicados por alteração na velocidade da reação enzimática, realizou-se experimentos de oximetria. Na figura 40 são apresentados os resultados de consumo de oxigênio na presença de diferentes concentrações dos aminoácidos L-His (figura 40A), L-Cys (figura 40B), L-Trp (figura 40C) e L-Tyr (figura 40D). Observa-se que, para os três primeiros aminoácidos, não houve alteração significativa na velocidade de consumo de oxigênio. Este resultado indica que a atividade da enzima não está sendo alterada significativamente pela presença dos aminoácidos e, a diminuição na quantidade de luz emitida deve estar relacionada à interação entre os aminoácidos e os compostos excitados produzidos durante a reação. Duas observações, porém, devem ser feitas. Para o L-Trp, somente cerca de 75% do O_2 foi consumido ao final da cinética e, para a L-Tyr, houve uma pequena variação de velocidade de consumo de O_2 , para as cinéticas obtidas nas maiores concentrações do aminoácido (25 e 50 μM) ($k_{obs} = 1,517 \pm 0,006$) em comparação com as cinéticas obtidas no controle contendo somente IBAL ou de menores concentração de aminoácido (5, 10 e 15 μM) ($k_{obs} = 2,563 \pm 0,18$). Esta variação mostrou-se significativa ($p < 0,001$). Estes resultados podem ajudar a explicar o motivo pelo qual o k_q observado é uma ordem de grandeza maior que o esperado para supressão colisional, porém, não foram localizadas informações na literatura que correlacionem estes dois aminoácidos com inibição da HRP. Tais resultados se explicam apenas no caso da L-Cys, que se oxida espontaneamente a cistina quando se prepara solução de L-Cys em pH 7,4 (Zollner, 1993).

Figura 40 – Consumo de O_2 na presença de $5 \mu M$ de HRP, $20 mM$ de IBAL e diferentes concentrações de (A) L-His, (B) L-Cys, (C) L-Trp e (D) L-Tyr.

5.5. Determinação de produtos de oxidação de L-Trp por geradores de acetona triplete

Considerando os resultados anteriormente apresentados e as ferramentas analíticas disponíveis, selecionou-se o L-Trp como biomolécula alvo para estudos da formação de produtos de reação com derivados de acetona triplete derivadas tanto da oxidação de IBAL por HRP quanto pela decomposição térmica de TMD. Baader *et al.* (1985) haviam sugerido geração do radical do IBAL como um passo intermediário para a formação do dioxetano. Porém de acordo com os resultados de EPR apresentados, pode-se levantar a hipótese de que tanto os radicais acetila, quando o radical terciário de IBAL podem gerar produtos com o L-Trp. Além disso, esperava-se também, a formação de produtos do tipo base de Schiff, no sistema enzimático, tendo em vista a presença do aldeído. Desta forma, tentou-se então o uso de HPLC dotado de uma coluna C18 fase reversa, descrita em Materiais e Métodos para separar os produtos da reação. Inicialmente, utilizaram-se as mesmas condições descritas por Ronsein *et al.* (2008), as quais consistem de uma fase aquosa de 0,05% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila (fase B), em fluxo isocrático de $1 mL \cdot min^{-1}$. Ocorre que, nestas condições, o Trp demorou cerca de 25 min para ser eluído (resultado não apresentado). Além disso, obtiveram-se apenas picos próximos ao tempo de

retenção da coluna (*void volume*), indicando a formação de produtos mais polares. Como se esperava a formação de produtos com menor polaridade, como o aduto do radical do IBAL e da base de Schiff, diversos outros ensaios foram realizados.

Depois de realizar diversas alterações no fluxo da fase móvel (resultados não apresentados), chegou-se à condição de fluxo total de 0,8 mL com variação linear de 4% a 30% de acetonitrila (fase B) em 30 min, seguido de um período de 10 min com fluxo isocrático de 30%. Após, durante 1 min, retornou-se o fluxo para 4% da fase B, condição esta que foi mantida isocrática por mais 9 min. Nestas condições, obteve-se o cromatograma apresentado na figura 41, no qual se observa a presença de diversos pequenos picos e uma diminuição do pico correspondente ao Trp.

Figura 41: Cromatografia HPLC de solução de L-Trp na presença e ausência do sistema enzimático de geração de acetona triplete. L-Triptofano incubado por 24 h a 37°C, em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 nas seguintes condições: Vermelho – controle L-Trp 1 mM; cinza: controle IBAL 20 mM e HRP 5 μ M, sem L-Trp; rosa: controle L-Trp 1 mM incubado com HRP 5 μ M; verde: controle L-Trp 1 mM incubado com IBAL 20 mM; ciano: L-Trp 1 mM tratado com IBAL 20 mM e HRP 5 μ M; Cromatografias realizadas em coluna Luna 5 μ C18 100 Å 250 x 4,6 mm. Fase móvel consistiu de ácido fórmico 0,05% v/v (fase A) e acetonitrila (fase B).

Após a determinação das condições cromatográficas, obtiveram-se os resultados referentes à determinação de produtos de oxidação de L-Trp produzidos durante incubação com o sistema enzimático IBAL/HRP, apresentados na figura 42, sendo que foram propostos sete possíveis produtos, cujas estruturas estão, também, apresentadas nas figuras. A partir das

injeções realizadas no espectrômetro de massa, pesquisou-se, inicialmente, a presença de um aduto de L-Trp após a reação com o citado radical do IBAL (por 275 m/z) e um aduto 259 m/z , de relação massa carga correspondente à base de Schiff.

A formação de adutos de 1O_2 possivelmente gerado pela reação com o Trp adicionado, já descritos por Ronsein *et al.* (2008), foi também pesquisada, sendo observados os produtos de m/z 221 e 237. Também se buscou adutos de Trp com radicais intermediários como acetila, metila e *iso*-propila, possivelmente formados durante a clivagem α (acetila e metila) ou abstração de hidrogênio (*iso*-propila) da acetona triplete.

Novos experimentos foram realizados para observar a fragmentação destes possíveis produtos, porém, desta vez, foram realizados experimentos em MS de alta resolução. Na figura 42, observa-se o cromatograma total (figura 42A) após 24 h de incubação a 37°C com o sistema enzimático. Os cromatogramas (figura 42B à 42I) apresentados correspondem aos valores de massa/carga selecionados, cujas estruturas propostas estão apresentadas em cada cromatograma. Como é possível observar nas figuras 42 C e 42F, os picos correspondentes aos produtos metilado (219 m/z) e acetilado (247 m/z) do L-Trp não forma detectados.

As figuras 43 a 48 mostram os cromatogramas dos possíveis produtos selecionados e seus espectros de fragmentação correspondentes, com proposta de fragmentação em cada uma das figuras. Tendo em vista que os resultados foram obtidos utilizando um equipamento de alta resolução, compararam-se as massas obtidas para os diferentes produtos com as massas teóricas, conforme se observa na figura 49.

Para os adutos com m/z de 221 (figura 43) e 237 (figura 44), obteve-se padrão de fragmentação correspondente ao aduto-álcool do Trp, 2-carboxi-3-hidroxi-1,2,3,3,8,8-hexahidropirroló[2,3]indol (WOH), derivado do peróxido de Trp, e a formilquinurenina (FMK), respectivamente, caracterizados tanto pelo seus padrões de fragmentação, quanto pelo espectro na região do UV (Ronsein *et al.*, 2009). Salienta-se que estes produtos podem ser obtidos por oxidação do L-Trp, por 1O_2 (Ronsein *et al.*, 2008), o qual, como demonstrado no item 6.3, pode ser gerado durante a oxidação de IBAL por HRP. Embora, em reações com 1O_2 , o peróxido de Trp seja um dos produtos esperados, este não foi observado. Pode-se especular que a presença da peroxidase HRP no meio reacional possa ter consumido este produto. Além disso, Ronsein *et al.* (2008) demonstraram que 80% deste produto (partindo-se de uma solução 3 mM) é degradado

quando incubado por 6 h a 37°C, pH 7,4. Ressalta-se que a mistura de reação foi analisada após um período de 24 h de incubação na citada temperatura.

Figura 42 – Separação por HPLC dos produtos de solução de L-Trp incubada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) com IBAL 20 mM e HRP 5 μ M. **A:** Cromatografia total; **B:** Seleção de m/z 205 correspondente ao L-Trp; **C:** Seleção de m/z 219 correspondente ao produto metilado do L-Trp; **D:** Seleção de m/z 221 correspondente ao WOH; **E:** Seleção de m/z 237, correspondente ao FMK; **F:** Seleção de m/z 247 correspondente ao produto acetilado de L-Trp; **G:** Seleção de m/z 259 correspondente a base de Schiff do Trp; **H:** Seleção de m/z 263 correspondente ao produto L-Trp-hidroxipropionil; **I:** Seleção de m/z 275 correspondente ao produto de oxidação do L-Trp pelo radical intermediário terciário centrado no carbono do IBAL. As estruturas propostas para cada produto são apresentadas ao lado do cromatograma.

Figura 43–**A:** HPLC de seleção de m/z 221 correspondente ao WOH com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 202, 235 e 294 nm; **B:** ESI MS/MS do produto de m/z 221, correspondente ao WOH e proposta de fragmentação.

Figura 44—**A**: HPLC de seleção de m/z 237 correspondente ao FMK com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 230, 260 e 322 nm; **B**: ESI MS/MS do produto de m/z 237, correspondente ao FMK e proposta de fragmentação.

Figura 45—**A**: HPLC de seleção de m/z 259 correspondente à base de Schiff do L-Trp; **B**: ESI MS/MS do produto de m/z 259, correspondente ao pico de 22,2 min, da base de Schiff do L-Trp e proposta de fragmentação, com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 222, 280 nm; **C**: ESI MS/MS do produto de m/z 259, correspondente ao pico de 22,8 min, da base de Schiff do L-Trp, com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 222 e 280 nm.

Figura 46–**A**: Cromatografia de seleção de m/z 263 correspondente ao Trp oxidado por radical hidroxipropil; **B**: ESI MS/MS do produto de m/z 263, correspondente ao pico de 31,8 min, do Trp oxidado por radical hidroxipropil; **C**: ESI MS/MS do produto de m/z 263, correspondente ao pico de 32,6 min, do Trp oxidado por radical hidroxipropil. Não se traçou o espectro destes produtos na região UV-Vis.

Figura 47–**A**: HPLC de seleção de m/z 275 correspondente ao L-Trp oxidado pelo radical do IBAL; **B**: ESI MS/MS do produto de m/z 275, correspondente ao pico de 14,5 min, do L-Trp oxidado pelo radical do IBAL e proposta de fragmentação, com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 206 e 238 nm; **C**: ESI MS/MS do produto de m/z 275, correspondente ao pico de 15,0 min, do L-Trp oxidado pelo radical do IBAL, com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 207 e 238 nm; **D**: ESI MS/MS do produto de m/z 275, correspondente ao pico de 17,5 min, do L-Trp oxidado pelo radical do IBAL, com apresentação de espectro de UV do produto, com máximos em 207 e 256 nm.

Figura 48 – HPLC de solução de L-Trp incubada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) com TMD 5 mM. **A:** Cromatografia total; **B:** Seleção de m/z 205 correspondente ao L-Trp; **C:** Seleção de m/z 219 correspondente ao produto metilado do Trp; **D:** Seleção de m/z 221 correspondente ao WOH; **E:** Seleção de m/z 237, correspondente ao FMK; **F:** Seleção de m/z 247 correspondente ao produto acetilado de Trp; **G:** Seleção de m/z 263 correspondente ao produto Trp-hidroxipropionil.

Produto Observado	Massa Observada (MO)	Massa Teórica Calculada (MTC)	Δ Massa (MTC-MO)
WOH	221,094	221,092	-0,002
FMK	237,089	237,087	-0,002
Base de Schiff-Trp	259,147	259,144	-0,003
Trp-2-hidroxipropil	263,142	263,139	-0,003
Trp-IBAL	275,142	275,139	-0,003

Figura 49 – Quadro das diferenças das massas observadas através da técnica de MS de alta resolução e as massas teóricas de cada um dos produtos propostos.

Produto	Fragmentação	Massa observada
WOH	$[M + H]^+$	221
	$[M - H_2O + H]^+$	203
	$[M - (CO + H_2O) + H]^+$	175
FMK	$[M + H]^+$	237
	$[M - NH_3 + H]^+$	220
	$[M - (NH_3 + H_2O) + H]^+$	202
	$[M - (NH_3 + CO) + H]^+$	192
Trp + IBAL	$[M + H]^+$	275
	$[M - H_2CO_2 + H]^+$	229
	$[M - (H_2CO_2 + NH_3) + H]^+$	212
	$[M - (H_2CO_2 + NH_3 + C_2H_2) + H]^+$	186
	$[M - (H_2CO_2 + NH_3 + C_2H_2 + CO) + H]^+$	158
Base de Schiff	$[M + H]^+$	259
	$[M - OH + H]^+$	242
	$[M - (COOH + CH_3) + H]^+$	200
	$[M - (C_3H_6 + COOH + CH_3) + H]^+$	159
Trp + hidroxipropil	$[M + H]^+$	263
	$[M - NH_3 + H]^+$	246

Figura 50 – Resumo das correlações entre massa observada e fragmentos liberados determinadas para os produtos de oxidação.

Conforme se observa na figura 45, obteve-se dois picos de 259 m/z . Na figura, também são apresentados os espectros de UV obtidos para cada pico, mostrando que eles são semelhantes. Por este motivo, especula-se que tais produtos são isômeros ópticos da base de Schiff, possivelmente devido à variação da posição em relação ao carbono α , já que este, nesta molécula proposta, seria o único local com quiralidade. Além disso, na figura 47, observam-se três picos correspondentes a 275 m/z e, novamente, apresentam-se os espectros de absorção na região do UV, mostrando que dois destes compostos também apresentam características espectroscópicas semelhantes. Para estes produtos, propomos duas possíveis estruturas na figura 47, sendo que uma delas corresponderia a um estereoisômero possível no carbono 3 do anel indólico. Em todos os casos, a proposta de modificação foi feita com alterações no anel devido à maior estabilidade em decorrência das insaturações, no caso de uma reação radicalar.

A figura 48 apresenta uma das cromatografias realizadas após a incubação de L-Trp com TMD 5 mM. Como se pode observar, apenas na seleção de 221 m/z foi possível obter um pico de produto (correspondente ao WOH). Todas as reações são realizadas na presença de quelantes de metais de transição (DTPA), porém, diferentemente do produto de reação enzimática, em que o produto excitado estaria “protegido” pela própria enzima (Rivassuarez; Cilento, 1981), a acetona

tripleto gerada pelo TMD pode estar transferindo energia para O_2 , resultando em 1O_2 capaz de produzir o produto observado. A acetona tripleto também poderia estar sofrendo desativação “escura” por O_2 .

Está sendo tentado o isolamento dos produtos de m/z 259 e 275 para traçar o espectro de RMN destes compostos. No caso dos produtos de m/z 221 e 237, não será realizado o isolamento porque (i) a intensidade dos picos observados nos cromatogramas é muito baixa, (ii) seu padrão de fragmentação e caracterização espectroscópica já foram anteriormente descritos (Ronsein *et al.*, 2008), e (iii) aqueles observados nesta pesquisa correspondem às características espectrais anteriormente descritas.

A figura 50 sumariza os principais picos de fragmentação (MS/MS) e os fragmentos perdidos para cada um dos produtos observados.

No item 6.1, descrevemos estudos de HRP incubada com diferentes concentrações de IBAL, sob fluxo contínuo de O_2 , analisados por eletroforese em gel, para verificar eventuais alterações protéicas decorrentes da formação dos produtos excitados. Considerando-se os resultados obtidos com L-Trp, demonstrando que ele é alvo tanto das espécies excitadas quanto do próprio aldeído, diferentes concentrações deste aminoácido foram incubadas com o sistema HRP/IBAL/ O_2 . Este experimento intencionou verificar a capacidade do aminoácido de proteger a HRP de compostos oxidantes gerados pela própria enzima, entre eles o produto excitado – acetona tripleto. Para tal, realizou-se experimento de eletroforese em gel, com cálculo da densitometria de banda das imagens. Conforme se observa nas figuras 51 e 52, não se observou diminuição da intensidade da banda em nenhum dos tratamentos correspondentes à incubação com Trp, ao contrário do que se observa na ausência do aminoácido. Desta forma, aparentemente o Trp protegeu o HRP de alterações estruturais.

A figura 53 representa uma tentativa de esquematizar os eventos moleculares que descrevem as reações estudadas nesta tese com IBAL/HRP.

Figura 51: Gel de eletroforese de HRP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) incubada com IBAL, sob fluxo contínuo de O_2 , na presença de diferentes concentrações de L-Trp.

Figura 52: Densitometria de bandas de gel de eletroforese de HRP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) incubada com IBAL, sob fluxo contínuo de O_2 , na presença de diferentes concentrações de L-Trp.

Figura 53 – Proposta mecanística dos estudos da oxidação de IBAL catalisada por HRP na presença de L-Trp. O radical 2-hidroxi-*iso*-propil também pode se formar por doação de átomo de hidrogênio da porção sacarídica da HRP para acetona triplete.

5.6. Geração de espécies excitadas tripletes por moléculas precursoras de melanina.

A mutagênese induzida pela formação de dímeros de timina por irradiação de DNA isolado ou culturas de células ou sua exposição a fontes de acetona triplete foi investigada no passado por Lamola (1971), Adam *et al.* (1990) e outros autores. Transferência de energia triplete de compostos carbonílicos para outras biomoléculas, em particular precursores de melanina visando elucidar os mecanismos de sua reticulação e interação com DNA está sendo perseguida pelo grupo do Dr. Douglas Brash, do *Department of Therapeutic Radiology*, na *Yale University Medical School*. De 17 de setembro de 2012 a 28 de fevereiro de 2013, em estágio “sanduíche” com colaboração do Dr. Douglas Brash, procuramos colaborar para a elucidação do mecanismo de formação de CPD posteriormente à irradiação de melanócito (murino) contendo melanina C57BL/6. A formação de CPD é comum em células da epiderme após a irradiação de onda eletromagnética na região do UVB (entre 280 e 320 nm) e UVA (entre 320 e 400 nm). Neste

laboratório, foi observado um aumento de CPD, apenas aproximadamente 2 h após a irradiação com UVA.

Foram realizados experimentos iniciais para aquisição da técnica de irradiação das células e quantificação da geração de CPD via ELISA. Conforme se observa na figura 54, 2 h após o término da irradiação forma-se um pico dos dímeros de timina que decai para os níveis basais até 12 h após o procedimento.

Utilizando sorbato de etila e, considerando o aumento da expressão de NO sintase (NOS) pela exposição destas células à radiação UV, utilizando um inibidor de iNOS (aminoguanidina), verificou-se que a formação dos CPDs após o período de 2 h era inibida (resultados não apresentados). Outros ensaios foram realizados utilizando-se TEMPOL (figura 55) para inibir a ação de ânion radical superóxido, que poderia ser eventualmente gerado durante a irradiação de melanina. Novamente, reverteu-se a formação tardia de CPDs. Estes resultados foram interpretados como indicativos de que o ONOO^- poderia estar envolvido na formação destes dímeros, fato este que já havia sido observado por (Gordon-Thomson *et al.*, 2012) em queratinócitos. Além disso, a inibição da formação de CPD através do sorbato de etila, conhecido supressor de tripletes (Velosa *et al.*, 2007), quando colocado no meio de cultura após a irradiação, constitui forte indício de que o efeito de geração de CPD "no escuro" deve ocorrer por formação de compostos excitados tripletes (Velosa *et al.*, 2007).

Realizaram-se então experimentos de emissão do captador fluorescente de tripletes, hidrossolúvel, DBAS, de melanócitos lisados (figura 57). Como se pode observar na figura 57, houve aumento da quimioluminescência do DBAS no período de 2 a 4 h. Tentou-se repetir o experimento usando o DBA insolúvel em meio aquoso, sem lisar as células, porém não foi possível observar a quimioluminescência. Tendo em vista os resultados que indicavam o envolvimento do estresse oxidativo, ensaios de lipoperoxidação foram realizados (figura 56). Novamente, observou-se aumento de lipoperoxidação entre 2 e 4 h, em comparação com os níveis inicialmente obtidos imediatamente após a irradiação na região do UVA.

Convém mencionar que anteriormente já havia sido observado pelo grupo do Dr. Brash que este fenômeno de "atraso" na geração de CPD ocorre somente com melanócitos produtores de melanina. Ensaios de irradiação realizados com melanócitos albinos (MEL C) ou fibroblastos murinos (NIH3T3) não apresentaram a formação tardia de CPD.

Com base nestes resultados, especularam-se algumas possibilidades para a formação destes dímeros. Uma delas consistia no aumento do estresse oxidativo que, em decorrência de lipoperoxidação (Kowaltowski *et al.*, 1996), poderia acarretar na geração de espécies tripletes e os dímeros seriam formados por transferência de energia. Porém, neste caso, tanto células contendo melanina quando os melanócitos albinos apresentariam o mesmo efeito. Assim, propôs-se que poderia haver envolvimento da melanina no processo.

Desta forma, inicialmente, tentou-se reproduzir os resultados obtidos em células através de reações *in vitro*, utilizando ácido α -linolênico (2 mM), DNA extraído de fibroblastos ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e o SIN-1 como gerador de peroxinitrito e melanina extraída de *Sepia officinalis*. Porém, não se observaram diferenças significativas na formação de CPD em nenhum dos ensaios realizados (figura 58).

Considerando-se a possibilidade do envolvimento da melanina na geração de espécies excitadas, realizaram-se experimentos de quimioluminescência do DBAS, utilizando melanina sintética, HRP ($5 \mu\text{M}$) e H_2O_2 como fonte de peróxido. Conforme se observa na figura 59, obteve-se aumento na emissão do DBAS, variável de acordo com o aumento da concentração de melanina, indicando um rápido consumo do peróxido presente no meio reacional. O perfil de emissão (figura 59B) difere dos perfis obtidos para a oxidação do IBAL, no sentido de que não há um aumento na emissão antes que seu súbito decaimento ocorra (exemplo observado na figura 20A), indicando o consumo do O_2 . Tal diferença se deve ao fato de que a emissão (singlete) do DBAS é menos sensível à variação de O_2 no meio do que a emissão direta de compostos excitados tripletes (Baader *et al.*, 1985).

Embora estes resultados indiquem que a própria melanina oxidada poderia ser uma fonte de espécies excitadas, nas células, aquela molécula se encontra no citoplasma, não sendo possível a transferência de energia para moléculas do DNA. Alguns estudos mostram que a melanina pode se localizar em corpúsculos denominados supranucleares, porém estes se encontram fora do núcleo celular (Kobayashi *et al.*, 1998). Considerando-se que a transferência a longa distância de Förster é inversamente proporcional à sexta potência da distância entre as moléculas envolvidas e a espessura da membrana nuclear é cerca de $75 \text{ \AA}$ (Kashnig;Kasper, 1969), considerou-se a possibilidade de monômeros da melanina, quando oxidados, gerarem compostos no estado excitados. Desta forma, DHICA (precursor de eumelanina) e 5-S-

cysteinyldopa (5SCD) (precursor de feomelanina) foram testados como fontes de espécies excitadas, através da quimioluminescência do DBAS (figura 60). Destes dois compostos, somente o DHICA resultou no aumento da quimioluminescência do DBAS com relação aos controles. Desta forma, testou-se a variação de emissão, em relação à variação de concentração de H_2O_2 e de DBAS (figura 61). Como se pode observar, a emissão do DBAS aumenta, tanto com o aumento da concentração de H_2O_2 quanto de DBAS. O $k_{\text{et}}\tau^0$ calculado do duplo recíproco foi de $1,5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$, onde k_{et} é a constante de velocidade de transferência de energia do composto triplete para o DBAS e τ^0 é tempo de vida do triplete gerado sem o DBAS. Se assumirmos $k_{\text{et}} \sim 5 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Catalani;Bechara, 1984) então a vida média da espécie excitada poderia ser estimada em cerca de 300 μs , que pode ser comparado com o tempo de vida da *p*-quinona triplete, que é de aproximadamente 210 μs (Yuasa *et al.*, 2004).

Considerando-se que o DHICA pode gerar compostos excitados e que, compostos com anel indólico são conhecido por formar espécies excitadas tripletes (De Melo *et al.*, 1992; Metodiewa *et al.*, 1992), formulou-se a proposta de geração de produtos apresentada na figura 62 (A), através de um dioxetano intermediário entre os carbonos 2 e 3 do anel indol. Porém, Slawinska;Slawinski (1982) propuseram que a formação do intermediário dioxetano ocorreria entre os carbonos 5 e 6 do anel (figura 62 B).

Com base nesta proposta, a reação do DHICA (0.10 mg/mL) com HRP (5 μM) e H_2O_2 (200 μM) os produtos foram analisados através da técnica de HPLC/MS. Ensaio iniciais mostraram que a polimerização do DHICA já começa logo nos cinco primeiro minutos de reação, com aumento no pico de m/z 383 (dímero), que também está presente logo no controle (figura 63, possivelmente em decorrência de irradiação luminosa durante a manipulação da amostra (Maeda;Hatao, 2004). Embora não tenha sido demonstrado, também se observa o pico de trímero de DHICA (m/z 578). É importante salientar que o aparente “arraste” do pico de 383 pode ser explicado pelo fato de que a reação de dimerização pode ocorrer em diferentes locais da molécula, o que confere à melanina a sua característica “amorfa” (Jimbow, 1991). Mas é possível observar o claro aumento do pico em, aproximadamente, 14,40 min (figura 64). A rápida polimerização do DHICA durante reações causadas por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio já fora relatada (Novellino *et al.*, 1998; Padmaja;Madison, 1999).

Embora a polimerização do DHICA seja uma característica de que esta molécula esteja sendo oxidada, realizaram-se novos experimentos com a finalidade de tentar localizar produtos de aproximadamente $m/z = 225$, correspondente ao produto resultante da formação do dioxetano. Como se pode observar na figura 65, foi possível obter um produto com estas características, mas a sua separação ainda não está bem definida e não foi possível realizar a sua fragmentação. Salienta-se, porém, que este produto eluiu da coluna com cerca de 5% de acetonitrila e 95% ácido fórmico, indicando que é um produto de caráter mais polar que o DHICA, o que é esperado para o produto proposto. Novos experimentos serão realizados com a finalidade de se verificar o padrão de fragmentação deste produto para que posteriormente se possa efetuar a busca destes produtos em lisados de melanócitos.

Como a proposta de Slawinska; Slawinski (1982) foi feita com base na presença de quinona no anel indol, realizou-se o mesmo experimento de quimioluminescência usando o ácido 5-hidróxi-indolil acético (5OHCA). Este composto não apresenta o segundo grupo OH presente no carbono 6 do anel do DHICA. Como se observa na figura 63, este composto não apresentou luminescência, um indicativo de que a proposta estrutural mais plausível corresponde à proposta feita por aqueles autores.

Figura 54 – Quantificação de CPD após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA 75 kJ/m².

Figura 55 – Quantificação de CPD após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA em diferentes amostras contendo o sequestrador de ânion radical superóxido, o TEMPOL.

Figura 56 – Teste de TBARs para determinação de lipoperoxidação após a exposição de melanócitos C57BL/6 à radiação UVA 75 kJ/m².

Figura 57 – Quimioluminescência do DBAS em lisados de melanócitos C57BL/6, após a exposição das células à radiação UVA 75 kJ/m².

Figura 58 – Quantificação de CPD no experimento de reconstituição in vitro, com suspensão contendo ácido α -linolênico (2 mM), DNA extraído de fibroblastos (2 μ g.mL⁻¹), SIN-1 como gerador de peroxinitrito, e melanina extraída de *Sepia officinalis* (0.1 mg/mL).

Figura 59 – Quimioluminescência do DBAS (50 μ M) em suspensões contendo melanina sintética, desfiada com HRP (5 μ M) e H₂O₂ (50 μ M). A- Comparação entre a emissão do DBAS variando-se a presença, ou da melanina, ou do HRP ou do peróxido. B- Variação de massa de melanina presente no meio reacional.

Figura 60 – Quimioluminescência do DBAS (50 μM) em soluções contendo DHICA (0,05 mg/mL) ou 2SCD (0,05 mg/mL), desafiados com HRP (5 μM) e H_2O_2 (50 μM), com comparação entre a emissão do DBAS variando-se a presença, ou do DHICA/2SCD, ou do HRP ou do peróxido.

Figura 61 – Quimioluminescência do DBAS (50 μM) em soluções contendo ou DHICA, desafiados com HRP (5 μM) e H_2O_2 (50 μM). A- Comparação entre a emissão do DBAS variando-se a concentração de peróxido. B- Comparação entre a emissão do DBAS variando-se a concentração deste composto; C- Duplo recíproco de três repetições do experimento de variação da emissão do DBAS em relação à variação deste composto. D- regressão linear da integração da área de três repetições do experimento de variação de peróxido na presença de DHICA e HRP.

Figura 62 – Propostas de oxidação do DHICA que poderiam resultar na formação de um dioxetano, com consequente formação de espécie excitada. A- Proposta de oxidação entre os carbonos 2 e 3. B- Proposta de oxidação entre os carbonos 5 e 6. Esta última proposta foi feita por Slawinska; Slawinski (1982).

Figura 63 – HPLC de DHICA 0.1 mg/mL. A- Cromatograma monitorado pela absorvância na região do UV-Vis. B- Cromatograma de seleção de massa 192, correspondente ao DHICA. C- Cromatograma de seleção de massa 383, correspondente ao dímero do DHICA.

Figura 64 – HPLC de DHICA 0.1 mg/mL em tampão fosfato pH 7.4. A- Cromatograma monitorado pela absorvância na região do UV-Vis de DHICA. B- Cromatograma de DHICA incubado por 5 min com HRP e H_2O_2 100 μM . C- Cromatograma de DHICA incubado por 10 min com HRP e H_2O_2 100 μM . D- Cromatograma de DHICA incubado por 30 min com HRP e H_2O_2 100 μM . E- Cromatograma de DHICA incubado por 60 min com HRP e H_2O_2 100 μM . Observa-se o aumento no pico de 14,44 min, correspondente ao dímero de DHICA.

Figura 65 – HPLC de DHICA 0.1 mg/mL incubado com HRP e H_2O_2 100 μM por 1 h, em tampão fosfato pH 7.4. A- Cromatograma monitorado pela absorvância na região do UV-Vis de DHICA. B- Cromatograma de ionização total. C- Cromatograma seleção de massa 383. D- Cromatograma de seleção de massa 192. E- Cromatograma de seleção de massa 225. F- Espectro ESI/MS do pico 383 m/z. G- Espectro ESI/MS do pico de massa 192. G- Espectro ESI/MS do pico de massa 225 m/z.

Figura 66 – Quimioluminescência do DBAS (50 μ M) em soluções contendo 5OHCA (500 μ M), desafiados com HRP (5 μ M) e H₂O₂ (50 μ M), com comparação entre a emissão do DBAS variando-se a presença, ou 5OHCA, ou do HRP ou do peróxido.

6. Considerações finais

No início deste texto, apresentaram-se exemplos da importância biológica de reações envolvendo compostos no estado excitado, alguns dos quais são amplamente estudados, por exemplo a fotossíntese e a bioluminescência.

As propostas apresentadas por White (1970) e Cilento (1973) foram pouco exploradas e ainda se tratam de um campo fértil para a investigação científica. Algumas das pesquisas já realizadas, especialmente entre as décadas de 70 e 90 do século passado, mostraram que se pode obter (*in vitro*) metabólitos de plantas e lesões típicas de irradiação por UV em DNA, utilizando-se compostos que geram carbonilas excitadas.

Neste trabalho, apresentaram-se resultados que confirmam a oxidação de IBAL catalisada por HRP e que estes produtos da oxidação podem levar à formação de carbonilas tripletes. Também se demonstrou a geração de $^1\text{O}_2$, à partir da acetona triplete. Trabalhos anteriores já mostram que estes compostos excitados podem causar alterações em biomoléculas alvo. Para o $^1\text{O}_2$, vários produtos de reação com diferentes biomoléculas já são conhecidos, porém, para carbonilas tripletes, apenas produtos de reação com ácidos nucleicos e seus polímeros foram estudados.

Assim, é ampla a possibilidade de estudos de reação de cetonas tripletes com diferentes biomoléculas. Ainda que como uma pequena contribuição, parte desta possibilidade foi aqui apresentada pela L-His, L-Cys, L-Tyr e L-Trp. Destes quatro alvos, estudou-se os diferentes produtos de oxidação de L-Trp, evidenciando que o resíduo deste aminoácido é um potencial alvo em proteínas. Os resultados de oxidação de L-Trp, juntamente com os resultados observados para o descoramento do HRP, demonstraram que a formação de compostos excitados tem potencial para contribuir com a lesão na própria peroxidase e em outras biomoléculas.

Conforme mencionado na introdução deste texto, a maior parte dos experimentos envolvendo a hipótese de fotoquímica no escuro foi realizada *in vitro*. Porém, as novas evidências apontadas, sobre a demonstração de transferência de energia para o O_2 quando a formação de produtos com o L-Trp, são exemplos sobre como novos estudos *in vitro* ainda se mostram importantes, para que o papel dos compostos excitados tripletes possa ser evidenciado *in vivo*. Os

resultados obtidos para o L-Trp podem ser utilizados como modelo para busca de lesões em proteínas.

O sistema IBAL/HRP, neste trabalho, pode ser visto como “modelo” para estudo de “estresse carbonílico”, já que a oxidação do aldeído com geração de espécies excitadas exibe certa semelhança com as vias de glicação avançada, reconhecidas como operantes em diabetes e outras doenças associadas ao envelhecimento (Thornalley, 2002; Sartori *et al.*, 2013). Porém, a própria reação de oxidação do IBAL por HRP ainda pode ser posteriormente explorada, como, por exemplo, para compreensão das interações que ocorrem entre o aldeído e o sítio catalítico da enzima e modificações no estado de oxidação do ferro hemínico durante a reação. Novas investigações podem explorar a existência de diferentes enzimas capazes de realizar oxidações que resultem em produtos excitados tripletes e novos metabólitos alvo a serem oxidados.

Resultados de experimentos realizados em melanócitos foram aqui apresentados, indicando um papel biológico para compostos excitados tripletes, na formação “no escuro” de CPD em células contendo melanina, evidenciando uma nova possibilidade para a fotoquímica no escuro, que pode contribuir para o entendimento de alguns processos degenerativos, como tumores cutâneos. A hipótese apresentada por White e Cilento foi explorada como explicação para o evento observado.

Embora os resultados mencionados tratem da possibilidade de lesões em biomoléculas (formação de CPD e oxidação de L-Trp) é importante lembrar que a fotoquímica no escuro também pode ser explorada para estudar eventos “não degenerativos”. Espécies excitadas ou a formação de produtos de oxidação podem iniciar cadeias de sinalização celular que podem levar à diferentes resultados na célula/tecido onde a sinalização ocorreu. Salienta-se, porém, que não há estudos que envolvam sinalização celular envolvendo carbonilas tripletes ou seus produtos. Além disso, o conhecimento dos processos degenerativos envolvendo carbonilas tripletes podem causar a formulação de novas abordagens terapêuticas para evitar estes processos.

Os artigos iniciais do White (1970 e 1974) sobre o assunto já propunham explorar os benefícios da fotoquímica no escuro, na compreensão da formação de diferentes metabólitos. Esta proposta ainda também pode ser explorada, já que poucos trabalhos (*in vitro*) foram realizados. Além disso, é importante salientar que o estudo de diferentes compostos – como fármacos – levam em consideração sua reatividade no estado fundamental. Porém pode-se hipotetizar que o

acúmulo destes compostos em tecidos que podem ser irradiados, bem como a transferência de energia de outras moléculas excitadas, podem resultar na formação de diferentes tipos de produtos, já que compostos no estado excitado podem reagir de maneira diferente de seu estado fundamental.

Finalmente, este texto traz evidências e questionamentos que podem contribuir para compreensão da fotoquímica no escuro. Porém esta hipótese ainda pode ser amplamente explorada e tem potencial para trazer novos questionamentos e explicações científicas para diferentes fenômenos biológicos.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-SHAFI, A. A.; WORRALL, D. R.; WILKINSON, F. Singlet oxygen formation efficiencies following quenching of excited singlet and triplet states of aromatic hydrocarbons by molecular oxygen. **J. Photoch. Photobiol. A**, v. 142, n. 2-3, p. 133-143, Sep 14 2001.

ADAM, W.; ARNOLD, M. A.; SAHA-MOLLER, C. R. Photooxidative damage of guanine in DG and DNA by the radicals derived from the alpha cleavage of the electronically excited carbonyl products generated in the thermolysis of alkoxyethyl-substituted dioxetanes and the photolysis of alkoxyacetones. **J. Org. Chem.**, v. 66, n. 2, p. 597-604, Jan 26 2001.

ADAM, W.; BAADER, W. J. Effects of Methylation on the Thermal-Stability and Chemi-Luminescence Properties of 1,2-Dioxetanes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, n. 2, p. 410-416, 1985.

ADAM, W.; BEINHAUER, A.; MOSANDL, T.; SAHAMOLLER, C.; VARGAS, F.; EPE, B.; MULLER, E.; SCHIFFMANN, D.; WILD, D. Photobiological Studies with Dioxetanes in Isolated DNA, Bacteria, and Mammalian-Cells. **Environ. Health Persp.**, v. 88, p. 89-97, Aug 1990.

ADAM, W.; HEIL, M. Reaction of 1,2-Dioxetanes with Heteroatom Nucleophiles - Adduct Formation by Nucleophilic-Attack at the Peroxide Bond. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 114, n. 14, p. 5591-5598, Jul 1 1992.

ADAM, W.; KURZ, A.; SAHA-MOLLER, C. R. DNA and 2'-deoxyguanosine damage in the horseradish-peroxidase-catalyzed autoxidation of aldehydes: The search for the oxidizing species. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, n. 5-6, p. 566-579, Mar 1999.

ADAM, W.; SAHAMOLLER, C. R.; SCHONBERGER, A. Type I and type II photosensitized oxidative modification of 2'-deoxyguanosine (dGuo) by triplet-excited ketones generated thermally from the 1,2-dioxetane HTMD. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, n. 4, p. 719-723, Jan 29 1997.

ALMEIDA, A. M.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E.; NANTES, I. L. Diphenylacetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial DNA, phospholipids, and proteins. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 27, n. 7-8, p. 744-751, Oct 1999.

BAADER, W. J.; BOHNE, C.; CILENTO, G.; DUNFORD, H. B. Peroxidase-Catalyzed Formation of Triplet Acetone and Chemi-Luminescence from Isobutyraldehyde and Molecular-Oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 18, p. 217-225, 1985.

BASTOS, E. L.; DA SILVA, S. M.; BAADER, W. J. Solvent Cage Effects: Basis of a General Mechanism for Efficient Chemiluminescence. **J. Org. Chem.**, v. 78, n. 9, p. 4432-4439, May 3 2013.

BECHARA, E. J. H.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; DURAN, N.; DEBAPTISTA, R. C.; CILENTO, G. Peroxidase Catalyzed Generation of Triplet Acetone. **Photochem. Photobiol.**, v. 30, n. 1, p. 101-110, 1979.

BECHARA, E. J. H.; WILSON, T. Alkyl Substituent Effects on Dioxetane Properties - Tetraethyl-3,4-Di-Normal-Butyldioxetanes, Dicyclohexylidene-3,4-Di-Normal-Butyldioxetanes, and 3,4-Dimethyl-3,4-Di-Normal-Butyldioxetanes - a Discussion of Decomposition Mechanisms. **J. Org. Chem.**, v. 45, n. 26, p. 5261-5268, 1980.

BRIVIBA, K.; SAHAMOLLER, C. R.; ADAM, W.; SIES, H. Formation of singlet oxygen in the thermal decomposition of 3-hydroxymethyl-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane, a chemical source of triplet-excited ketones. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 38, n. 4, p. 647-651, Apr 1996.

BRUNETTI, I. L.; BECHARA, E. J. H.; CILENTO, G.; WHITE, E. H. Possible In vivo Formation of Lumicholchicines from Colchicine by Endogenously Generated Triplet Species. **Photochem. Photobiol.**, v. 36, n. 2, p. 245-249, 1982.

BUETTNER, G. R. Spin Trapping - Electron-Spin-Resonance Parameters of Spin Adducts. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 3, n. 4, p. 259-303, 1987.

CADET, J.; D'HAM, C.; DOUKI, T.; POUGET, J. P.; RAVANAT, J. L.; SAUVAIGO, S. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. **Free Rad. Res.**, v. 29, n. 6, p. 541-550, 1998.

CAMPBELL, A. K. **Chemiluminescence Principles and Applications in Biology and Medicine**. Chichester: Ellis Horwood Ltd., 1988. 608

CATALANI, L. H.; BECHARA, E. J. H. Quenching of Chemiexcited Triplet Acetone by Biologically Important Compounds in Aqueous-Medium. **Photochem. Photobiol.**, v. 39, n. 6, p. 823-830, 1984.

CHETYRKIN, S.; MATHIS, M.; PEDCHENKO, V.; SANCHEZ, O. A.; MCDONALD, W. H.; HACHEY, D. L.; MADU, H.; STEC, D.; HUDSON, B.; VOZIYAN, P. Glucose autoxidation induces functional damage to proteins via modification of critical arginine residues. **Biochemistry**, v. 50, n. 27, p. 6102-12, Jul 12 2011.

CILENTO, G. Excited electronic states in dark biological processes. **Q. Rev. Biophys.**, v. 6, n. 4, p. 485-501, Nov 1973.

CILENTO, G. Dioxetanes as Intermediates in Biological Processes. **J. Theor. Biol.**, v. 55, n. 2, p. 471-479, 1975.

CILENTO, G. Generation and Transfer of Triplet Energy in Enzymatic Systems. **Accounts Chem. Res.**, v. 13, n. 7, p. 225-230, 1980.

CILENTO, G. Generation of Electronically Excited Triplet Species in Biochemical Systems. **Pure Appl. Chem.**, v. 56, n. 9, p. 1179-1190, 1984.

CILENTO, G. Photobiochemistry without Light. **Experientia**, v. 44, n. 7, p. 572-576, Jul 15 1988.

CILENTO, G.; ADAM, W. Photochemistry and Photobiology without Light. **Photochem. Photobiol.**, v. 48, n. 3, p. 361-368, Sep 1988.

CILENTO, G.; ADAM, W. From Free-Radicals to Electronically Excited Species. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 19, n. 1, p. 103-114, Jul 1995.

CILENTO, G.; DURAN, N.; ZINNER, K.; VIDIGAL, C. C. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; HAUN, M.; FALJONI, A.; AUGUSTO, O.; CASADEIDEBAPTISTA, R.; BECHARA, E. J. H. Chemi-Energized Species in Peroxidase Systems. **Photochem. Photobiol.**, v. 28, n. 4-5, p. 445-451, 1978.

COSA, G.; SCAIANO, J. C. Reactivity of adrenaline toward alkoxyl radicals and carbonyl triplet states. **Org. Biomol. Chem.**, v. 6, n. 24, p. 4609-4614, 2008.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol. Med.**, v. 9, n. 4, p. 169-176, Apr 2003.

DARMANYAN, A. P.; FOOTE, C. S. Solvent Effects on Singlet Oxygen Yield from N,Pi-Asterisk and Pi,Pi-Asterisk Triplet Carbonyl-Compounds. **J. Phys. Chem.**, v. 97, n. 19, p. 5032-5035, May 13 1993.

DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. EPR spin trapping of protein radicals. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, n. 9, p. 1072-1086, May 1 2004.

DE MELO, M. P.; ESCOBAR, J. A.; METODIEWA, D.; DUNFORD, H. B.; CILENTO, G. Horseradish peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of indole-3-acetic acid. II. Oxygen uptake and chemiexcitation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 296, n. 1, p. 34-9, Jul 1992.

DI MASCIIO, P.; CATALANI, L. H.; BECHARA, E. J. H. Are Dioxetanes Chemiluminescent Intermediates in Lipoperoxidation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 12, n. 6, p. 471-478, 1992.

DI MASCIIO, P.; SIES, H. Quantification of Singlet Oxygen Generated by Thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)Dipropionate - Monomol and Dimol Photoemission and the Effects of 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]Octane. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, n. 8, p. 2909-2914, Apr 12 1989.

DULING, D. R. Simulation of Multiple Isotropic Spin-Trap Epr-Spectra. **J. Magn. Reson. B**, v. 104, n. 2, p. 105-110, Jun 1994.

EPE, B.; MULLER, E.; ADAM, W.; SAHAMOLLER, C. R. Photochemical DNA Modifications Induced by 1,2-Dioxetanes. **Chem-Biol. Interact.**, v. 85, n. 2-3, p. 265-281, Dec 1992.

FARNETH, W. E.; JOHNSON, D. G. Chemi-Luminescence in the Infrared Photochemistry of Oxetanes - the Formal Reverse of Ketone Photocycloaddition. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 106, n. 6, p. 1875-1876, 1984.

FELIX, C. C.; HYDE, J. S.; SEALY, R. C. Photoreactions of Melanin - New Transient Species and Evidence for Triplet-State Involvement. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 88, n. 2, p. 456-461, 1979.

FOOTE, C. S.; DENNY, R. W. Chemistry of Singlet Oxygen .7. Quenching by Beta-Carotene. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 90, n. 22, p. 6233-&, 1968.

FOOTE, C. S.; WEXLER, S.; ANDO, W.; HIGGINS, R. Chemistry of Singlet Oxygen .4. Oxygenations with Hypochlorite-Hydrogen Peroxide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 90, n. 4, p. 975-&, 1968.

GANINI, D.; CHRISTOFF, M.; EHRENSHAFT, M.; KADIISKA, M. B.; MASON, R. P.; BECHARA, E. J. H. Myoglobin-H₂O₂ catalyzes the oxidation of beta-ketoacids to alpha-dicarbonyls: Mechanism and implications in ketosis. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 51, n. 3, p. 733-743, Aug 1 2011.

GARCIA, C. C.; ANGELI, J. P.; FREITAS, F. P.; GOMES, O. F.; DE OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. [13C₂]-Acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 24, p. 9140-3, Jun 22 2011.

GORDON-THOMSON, C.; GUPTA, R.; TONGKAO-ON, W.; RYAN, A.; HALLIDAY, G. M.; MASON, R. S. 1 alpha,25 Dihydroxyvitamin D-3 enhances cellular defences against UV-induced oxidative and other forms of DNA damage in skin. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, n. 12, p. 1837-1847, 2012.

HENNING, C.; SMUDA, M.; GIRNDT, M.; ULRICH, C.; GLOMB, M. A. Molecular basis of maillard amide-advanced glycation end product (AGE) formation in vivo. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 52, p. 44350-6, Dec 30 2011.

HEWSON, W. D.; HAGER, L. P. Oxidation of Horseradish-Peroxidase Compound-II to Compound-I. **J. Biol. Chem.**, v. 254, n. 9, p. 3182-3186, 1979.

HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized Dopaminergic-Neurons Are Differentially Susceptible to Degeneration in Parkinsons-Disease. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 345-348, Jul 28 1988.

INANAMI, O.; KUWABARA, M.; SATO, F. Electron-Spin-Resonance and Spin-Trapping Study of Free-Radicals in Gamma-Irradiated Solid Lysozyme. **Free Rad. Res. Commun.**, v. 5, n. 1, p. 43-49, 1988.

INDIG, G. L.; CAMPA, A.; BECHARA, E. J. H.; CILENTO, G. Conjugated Diene Formation Promoted by Triplet Acetone Acting Upon Arachidonic-Acid. **Photochem. Photobiol.**, v. 48, n. 5, p. 719-723, Nov 1988.

IQBAL, J.; HUSAIN, A.; GUPTA, A. Photooxidation of acyclovir with thermally generated triplet excited ketones. A comparison with type I and II photosensitizers. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 4, p. 519-521, Apr 2006.

JIMBOW, K. F., T.B.; WICK, M.M. Biochemistry and Physiology of Melanin Pigmentation. In: GOLDSMITH, L. A. (Ed.). **Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin**. New York: Oxford University Press, 1991. cap. 32, p.873-909.

KALAPOUS, M. P. Methylglyoxal in living organisms - Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicol. Lett.**, v. 110, n. 3, p. 145-175, Nov 22 1999.

KALARIYA, N. M.; RAMANA, K. V.; SRIVASTAVA, S. K.; VAN KUIJK, F. J. Post-translational protein modification by carotenoid cleavage products. **Biofactors**, v. 37, n. 2, p. 104-16, Mar 2011.

KANOFISKY, J. R.; SIMA, P. Singlet Oxygen Production from the Reactions of Ozone with Biological Molecules. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 14, p. 9039-9042, May 15 1991.

KASHNIG, D. M.; KASPER, C. B. Isolation, Morphology, and Composition of Nuclear Membrane from Rat Liver. **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 14, p. 3786-&, 1969.

KLÁN, P. W., J. **Photochemistry of organic compounds: from concepts to practice**. Wiltshire: John Wiley and Sons LTD, 2009. 563

KOBAYASHI, N.; NAKAGAWA, A.; MURAMATSU, T.; YAMASHINA, Y.; SHIRAI, T.; HASHIMOTO, M. W.; ISHIGAKI, Y.; OHNISHI, T.; MORI, T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, n. 5, p. 806-10, May 1998.

KOPECKY, K. R.; MUMFORD, C. Luminescence in Thermal Decomposition of 3,3,4-Trimethyl-1,2-Dioxetane. **Can. J. Chem.**, v. 47, n. 4, p. 709-&, 1969.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; GRIJALBA, M. T.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions - A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 6, p. 2929-2934, Feb 9 1996.

KRINSKY, N. I. Singlet Excited Oxygen as a Mediator of Antibacterial Action of Leukocytes. **Science**, v. 186, n. 4161, p. 363-365, 1974.

KWOK, W. M.; MA, C.; PHILLIPS, D. L. A doorway state leads to photostability or triplet photodamage in thymine DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, n. 15, p. 5131-5139, Apr 16 2008.

LAMOLA, A. A. Production of Pyrimidine Dimers in DNA in Dark. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 43, n. 4, p. 893-&, 1971.

LAVI, R.; SINYAKOV, M.; SAMUNI, A.; SHATZ, S.; FRIEDMANN, H.; SHAINBERG, A.; BREITBART, H.; LUBART, R. ESR detection of O-1(2) reveals enhanced redox activity in illuminated cell cultures. **Free Rad. Res.**, v. 38, n. 9, p. 893-902, Sep 2004.

LI, A. S. W.; CUMMINGS, K. B.; ROETHLING, H. P.; BUETTNER, G. R.; CHIGNELL, C. F. A Spin-Trapping Database Implemented on the Ibm Pc/At. **J. Magn. Reson.**, v. 79, n. 1, p. 140-142, Aug 1988.

MAEDA, K.; HATAO, M. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, n. 2, p. 503-509, Feb 2004.

MAKINO, K.; MORIYA, F.; HATANO, H. Application of the Spin-Trap Hplc-Esr Method to Radiation-Chemistry of Amino-Acids in Aqueous-Solutions. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 23, n. 1-2, p. 217-228, 1984.

MASSARI, J.; TOKIKAWA, R.; MEDINAS, D. B.; ANGELI, J. P. F.; DI MASCIO, P.; ASSUNCAO, N. A.; BECHARA, E. J. H. Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal-Peroxynitrite System. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 51, p. 20761-20768, Dec 28 2011.

MASSARI, J.; TOKIKAWA, R.; ZANOLLI, L.; TAVARES, M. F. M.; ASSUNCAO, N. A.; BECHARA, E. J. H. Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal-Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 23, n. 11, p. 1762-1770, Nov 2010.

MATSUMOTO, M. Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence. **J. Photoch. Photobio. C**, v. 5, n. 1, p. 27-53, May 20 2004.

MCGARVEY, D. J.; SZEKERES, P. G.; WILKINSON, F. The Efficiency of Singlet Oxygen Generation by Substituted Naphthalenes in Benzene - Evidence for the Participation of Charge-Transfer Interactions. **Chem. Phys. Lett.**, v. 199, n. 3-4, p. 314-319, Nov 6 1992.

MENDENHALL, G. D.; SHENG, X. C.; WILSON, T. Yields of Excited Carbonyl Species from Alkoxyl and from Alkylperoxyl Radical Dismutations. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 113, n. 23, p. 8976-8977, Nov 6 1991.

MERKEL, P. B.; KEARNS, D. R. Oxygen Quenching and Radiationless Decay of Excited Singlet and Triplet-State Carbonyl-Compounds. **J. Chem. Phys.**, v. 58, n. 1, p. 398-400, 1973.

METODIEWA, D.; DE MELO, M. P.; ESCOBAR, J. A.; CILENTO, G.; DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase-catalyzed aerobic oxidation and peroxidation of indole-3-acetic acid. I. Optical spectra. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 296, n. 1, p. 27-33, Jul 1992.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: Studies

using O-18-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, n. 20, p. 6172-6179, May 21 2003.

NOVELLINO, L.; D'ISCHIA, M.; PROTA, G. Nitric oxide-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid under aerobic conditions: Non-enzymatic route to melanin pigments of potential relevance to skin (photo)protection. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1425, n. 1, p. 27-35, Sep 16 1998.

OLIVEIRA, O. M. M. F.; HAUN, M.; DURAN, N.; OBRIEN, P. J.; OBRIEN, C. R.; BECHARA, E. J. H.; CILENTO, G. Enzyme-Generated Electronically Excited Carbonyl-Compounds - Acetone Phosphorescence during Peroxidase-Catalyzed Aerobic Oxidation of Isobutanal. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 13, p. 4707-4712, 1978.

PADMAJA, S.; MADISON, S. A. Reaction of peroxynitrite with the melanin precursor, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Res. Chem. Intermediat.**, v. 25, n. 5, p. 441-458, 1999.

PROCTOR, P.; MCGINNIS, J.; CORRY, P. Hypothesis on Preferential Destruction of Melanized Tissues. **J. Theor. Biol.**, v. 48, n. 1, p. 19-22, 1974.

RAHIMTULA, A.; OBRIEN, P. J. Possible Involvement of Singlet Oxygen in Prostaglandin Biosynthesis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 70, n. 3, p. 893-899, 1976.

RAVANAT, J. L.; CADET, J. Reaction of Singlet Oxygen with 2'-Deoxyguanosine and DNA - Isolation and Characterization of the Main Oxidation-Products. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 8, n. 3, p. 379-388, Apr-May 1995.

REINBOTHE, C.; POLLMANN, S.; REINBOTHE, S. Singlet oxygen signaling links photosynthesis to translation and plant growth. **Trends Plant Sci.**, v. 15, n. 9, p. 499-506, Sep 2010.

RICHARDSON, W. H.; BURNS, J. H.; PRICE, M. E.; CRAWFORD, R.; FOSTER, M.; SLUSSER, P.; ANDEREGG, J. H. Effect of Aryl Substituents, Solvent, and Steric Effects on Efficiency of Excited-State Carbonyl Production from 1,2-Dioxetanes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 100, n. 24, p. 7596-7600, 1978.

RICHARDSON, W. H.; ONEAL, H. E. Thermochemistry and Estimated Activation Parameters for Thermal-Decomposition of 1,2-Dioxetanedione, 4-Tert-Butyl-1,2-Dioxetan-3-One, and 4,4-Dimethyl-1,2-Dioxetan-3-One. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 94, n. 25, p. 8665-&, 1972.

RIVASSUAREZ, E.; CILENTO, G. Quenching of Enzyme-Generated Acetone Phosphorescence by Indole Compounds - Stereospecific Effects of D-Tryptophan and L-Tryptophan - Photochemical-Like Effects. **Biochemistry**, v. 20, n. 26, p. 7329-7333, 1981.

ROLIM, J. P. M. L.; DE-MELO, M. A. S.; GUEDES, S. F.; ALBUQUERQUE, F. B.; DE SOUZA, J. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; ZANIN, I. C. J.; RODRIGUES, L. K. A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using

different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 106, p. 40-46, Jan 5 2012.

RONSEIN, G. E.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. Characterization of O(2) ((1)delta(g))-derived oxidation products of tryptophan: a combination of tandem mass spectrometry analyses and isotopic labeling studies. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 20, n. 2, p. 188-97, Feb 2009.

RONSEIN, G. E.; OLIVEIRA, M. C. B.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Tryptophan oxidation by singlet molecular oxygen [O-2 ((1)Delta(g))]: Mechanistic studies using O-18-labeled hydroperoxides, mass spectrometry, and light emission measurements. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, n. 6, p. 1271-1283, Jun 2008.

RUSSELL, G. A. Deuterium-Isotope Effects in the Autoxidation of Aromatic Hydrocarbons - Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, n. 14, p. 3871-3877, 1957.

SARTORI, A.; MANO, C. M.; MANTOVANI, M. C.; DYSZY, F. H.; MASSARI, J.; TOKIKAWA, R.; NASCIMENTO, O. R.; NANTES, I. L.; BECHARA, E. J. H. Ferricytochrome c Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress. **Plos One**, v. 8, n. 3, Mar 6 2013.

SAYRE, L. M.; LIN, D.; YUAN, Q.; ZHU, X. C.; TANG, X. X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: Focus on HNE and ONE. **Drug Metab. Rev.**, v. 38, n. 4, p. 651-675, 2006.

SCHULZ, I.; MAHLER, H. C.; BOITEUX, S.; EPE, B. Oxidative DNA base damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonucleases and mutagenicity. **Mutat. Res-DNA Repair**, v. 461, n. 2, p. 145-156, Oct 16 2000.

SCHUSTER, G. B.; TURRO, N. J.; STEINMETZER, H. C.; SCHAAP, A. P.; FALER, G.; ADAM, W.; LIU, J. C. Adamantylideneadamantane-1,2-Dioxetane - Investigation of Chemiluminescence and Decomposition Kinetics of an Unusually Stable 1,2-Dioxetane. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, n. 24, p. 7110-7118, 1975.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H. Mechanism of Luminescent Oxidation of Cypridina Luciferin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 44, n. 2, p. 340-&, 1971.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H. Exchange of Oxygen between Solvent H₂O and CO₂ Produced in Cypridina Bioluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 51, n. 3, p. 558-563, 1973.

SLAWINSKA, D.; SLAWINSKI, J. Electronically Excited Molecules in the Formation and Degradation of Melanins. **Physiol. Chem. Phys.**, v. 14, n. 4, p. 363-374, 1982.

SOARES, C. H. L.; BECHARA, E. J. H. Enzymatic Generation of Triplet Biacetyl. **Photochem. Photobiol.**, v. 36, n. 1, p. 117-119, 1982.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 928, p. 22-38, 2001.

STEINBECK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. J. Intracellular Singlet Oxygen Generation by Phagocytosing Neutrophils in Response to Particles Coated with a Chemical Trap. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 19, p. 13425-13433, Jul 5 1992.

SUZUKAWA, A. A.; VIEIRA, A.; WINNISCHOFER, S. M. B.; SCALFO, A. C.; DI MASCIO, P.; FERREIRA, A. M. D.; RAVANAT, J. L.; MARTINS, D. D.; ROCHA, M. E. M.; MARTINEZ, G. R. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 52, n. 9, p. 1945-1953, May 1 2012.

TAKEUCHI, S.; ZHANG, W. G.; WAKAMATSU, K.; ITO, S.; HEARING, V. J.; KRAEMER, K. H.; BRASH, D. E. Melanin acts as a cause an atypical potent UVB photosensitizer to mode of cell death in murine skin. **P. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 42, p. 15076-15081, Oct 19 2004.

THORNALLEY, P. J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 50, p. 37-57, 2002.

TIMMINS, G. S.; DOSSANTOS, R. E.; WHITWOOD, A. C.; CATALANI, L. H.; DI MASCIO, P.; GILBERT, B. C.; BECHARA, E. J. H. Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from the cyclization of alkylperoxyl radicals to bioxetane radical intermediates. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 10, n. 10, p. 1090-1096, Oct 1997.

TREZL, L.; PIPEK, J. Formation of Excited Formaldehyde in Model Reactions Simulating Real Biological-Systems. **Theochem-J. Mol. Struc.**, v. 47, p. 213-223, Sep 1988.

TURRO, N. J. **Molecular Photochemistry**. 2nd Edition. New York: W.A. Benjamin, INC., 1967. 286

TURRO, N. J.; LECHTKEN, P. Thermal-Decomposition of Tetramethyl-1,2-Dioxetane - Selective and Efficient Chemelectronic Generation of Triplet Acetone. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 94, n. 8, p. 2886-&, 1972.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249 - 259, 2004.

VELOSA, A. C.; BAADER, W. J.; STEVANI, C. V.; MANO, C. M.; BECHARA, E. J. H. 1,3-diene probes for detection of triplet carbonyls in biological systems. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 8, p. 1162-1169, Aug 2007.

VICO, L. D.; LIU, Y. J.; KROGH, J. W.; LINDH, R. Chemiluminescence of 1,2-dioxetane. Reaction mechanism uncovered. **J. Phys. Chem. A**, v. 111, n. 32, p. 8013-9, Aug 16 2007.

VIVIANI, V. R.; UCHIDA, A.; VIVIANI, W.; OHMIYA, Y. The influence of Ala243 (Gly247), Arg215 and Thr226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. **Photochem. Photobiol.**, v. 76, n. 5, p. 538-544, Nov 2002.

WASSERMAN, H. H.; LARSEN, D. L. Formation of 1,4-Endoperoxides from Dye-Sensitized Photooxygenation of Alkyl-Naphthalenes. **J. Chem. Soc. Chem. Comm.**, n. 5, p. 253-&, 1972.

WHITE, E. H.; KAGI, H. H.; HILL, J. H. M.; ZAFIRIOU, O. Chemiluminescence of Luminol - Chemical Reaction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, n. 5, p. 940-&, 1964.

WHITE, E. H.; MIANO, J. D.; WATKINS, C. J.; BREAU, E. J. Chemically Produced Excited-States. **Angew. Chem. Int. Edit.**, v. 13, n. 4, p. 229-243, 1974.

WHITE, E. H.; WEI, C. C. A Possible Role for Chemically-Produced Excited States in Biology. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 39, n. 6, p. 1219-&, 1970.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular-Oxygen in Solution - an Expanded and Revised Compilation. **J. Phys. Chem. Ref. Data.**, v. 24, n. 2, p. 663-1021, Mar-Apr 1995.

WILSON, T.; LANDIS, M. E.; BAUMSTARAL; BARTLETT, P. D. Solvent-Effects on Chemiluminescent Decomposition of Tetramethyl-1,2-Dioxetane - Competitive Dark Pathways. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 95, n. 14, p. 4765-4766, 1973.

YUASA, J.; OHKUBO, K.; GULDI, D. M.; FUKUZUMI, S. Drastic changes in the lifetime and electron transfer and energy transfer reactivity of the triplet excited state of p-benzoquinone by complex formation with scandium ion salts. **J. Phys. Chem. A**, v. 108, n. 40, p. 8333-8340, Oct 7 2004.

ZOLLNER, H. **Handbook of enzyme inhibitors**. 2. revised and enlarged. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1993. 2 parts (1065 s.)

Lista de Anexos

Anexo A – Autoria do artigo (em preparação): *Energy transfer from chemically and enzymically produced triplet acetone to ground state oxygen ($O_2^3\Sigma_g$) yields singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)*

Anexo B – Autoria do artigo: *Superoxide radical protects liposome-contained cytochrome c against oxidative damage promoted by peroxynitrite and free radicals*

Anexo C – Co-autoria do artigo: *Ferricytochrome c directly oxidizes aminoacetone to methylglyoxal, a catabolite accumulated in carbonyl stress*

Anexo D – Co-autoria do artigo: *Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits*

Anexo E – Co-autoria do artigo: *Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PGLA nanoparticles*

Anexo F – Co-autoria do artigo: *Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues*

Anexo G – Súmula Curricular