# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

## FERNANDA MANSO PRADO

Hidroperóxido de timina como fonte biológica de

oxigênio molecular singlete  $[O_2 (^{1}\Delta_g)]$ 

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

24/09/2009

## FERNANDA MANSO PRADO

# Hidroperóxido de timina como fonte biológica de oxigênio molecular singlete $[O_2 (^1\Delta_g)]$

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

Orientador: Paolo Di Mascio

São Paulo

2009

Fernanda Manso Prado

Hidroperóxido de timina como fonte biológica de oxigênio molecular singlete  $[O_2 (^{1}\Delta_q)]$ 

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica). Aprovado em: \_\_\_\_\_ **Banca Examinadora** Prof. Dr. Instituição: Assinatura: \_\_\_\_\_ Prof. Dr. Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_ Prof. Dr. Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_\_ Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura:

Ao meu esposo, Flávio Henrique Savazzi, por me amar incondicionalmente e me apoiar em todos os momentos desta fase de estudo. Por ter acreditado no meu êxito e ter me dado todas as condições para eu concluir este trabalho. E, por me fazer feliz durante todos estes anos.

Ao meu orientador, Paolo Di Mascio, pela dedicação em me orientar cientificamente, pelo apoio,

confiança, respeito e amizade.

•

Aos meus pais e minhas irmãs pelo amor, apoio e confiança.

#### AGRADECIMENTOS

- À minha grande amiga, Graziella E. Ronsein, pela amizade, carinho e incentivo. Pelos inúmeros momentos de alegria e pelas produtivas discussões e colaborações científicas.
- À Marilene S. Oliveira e Fernando Mansano pela amizade, momentos de descontração e colaborações científicas.
- À Profa. Marisa H. G. Medeiros pelo apoio e críticas construtivas.
- A Profa. Sayuri Miyamoto pela integridade, confiança e amizade. Pelos vários momentos de discussão científica despendidos em minha tese.
- > Aos inúmeros amigos que fiz no Instituto de Química.
- Aos alunos e técnicos do laboratório do Prof. Paolo Di Mascio, da Profa. Marisa H. G. Medeiros e da Profa. Sayuri Miyamoto pela convivência e amizade.
- Ao técnico Osmar F. Gomes pelo excelente apoio técnico, especialmente na técnica HPLC.
- > A Profa. Iolanda Midea Cuccovia pela amizade e doçura.
- > A todos os docentes do Instituto de Química.
- A todos os funcionários do Instituto de Química, especialmente da seção de Pós-Graduação, Xerox e Pessoal.

#### **APOIO FINANCEIRO**

- FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CNPq-Milênio Redoxoma e CNPq INCT Redoxoma
- CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Pró-Reitoria de Pesquisa da USP

Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP

"Nada é impossível para aquele que persiste."

Alexandre o Grande

#### RESUMO

Prado, F. M. Hidroperóxido de timina como fonte biológica de oxigênio molecular singlete  $[O_2 ({}^{1}\Delta_g)]$ . 2009. 209pp. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A oxidação do DNA por espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio molecular singlete [O<sub>2</sub>  $({}^{1}\Delta_{g})$ ], pode estar relacionada ao aparecimento de mutações e ao desenvolvimento de doenças. O  $O_2(^1\Delta_{\sigma})$  pode ser gerado biologicamente por reação de fotossensibilização, pela reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCI e pela decomposição de peróxidos orgânicos contendo hidrogênio alfa (α-ROOH), na presença de metais de transição (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) ou HOCl. A decomposição de α-ROOH, como hidroperóxidos de lipídeos ou proteínas na presença de metais de transição, pode gerar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) via mecanismo de Russell. Neste mecanismo, a oxidação de α-ROOH gera radicais peroxila, que podem reagir entre si, formando um intermediário tetraóxido linear. Este intermediário tetraóxido linear pode decompor através de um mecanismo cíclico e produzir O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), um álcool e um composto carbonílico. Como a decomposição de α-ROOH pelo mecanismo de Russell pode ser uma importante fonte biológica de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{e}$ ), decidimos investigar se o  $\alpha$ -hidroperóxido de timina, 5-(hidroperoximetil)uracil (5-HMPU), poderia gerar esta espécie reativa na presença de metais (Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) e HOCl. Outro objetivo foi avaliar os efeitos oxidativos, em DNA plasmidial (pBR322), da decomposição de 5-HPMU na presença de  $Cu^{2+}$ . A geração de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCl foi demonstrada por meio do monitoramento da emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) na região do infravermelho próximo (IR-próximo,  $\lambda = 1270$  nm) e bimolecular na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm). A aquisição do espectro de emissão de O<sub>2</sub>  $({}^{1}\Delta_{g})$  forneceu evidências inequívocas da geração desta espécie reativa na reação de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  ou HOCl. Além disto, a formação de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup>,  $Cu^{2+}$  ou HOCl  $O_2$  ( $^1\Delta_{\sigma}$ ) foi demonstrada através da captação química de utilizando 9.10divinilsulfonatoantraceno (AVS) e detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido (AVSO<sub>2</sub>) formado. A detecção por HPLC/MS/MS dos produtos de decomposição de 5-HPMU, 5-(hidroximetil)uracila (5-HMU) e 5-formiluracila (5-FoU), reforçaram a hipótese de geração de O2  $({}^{1}\Delta_{g})$  pelo mecanismo de Russell. A análise dos resultados da incubação de pBR322, 5-HPMU e crescente concentração de Cu<sup>2+</sup> mostraram o aumento da forma circular aberta (OC), indicando a formação de quebra de fita simples do DNA, provavelmente proveniente da presença dos radicais peroxila e alcoxila de 5-HPMU. Já a utilização das enzimas de reparo FPG e NTH na incubação de pBR322, 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> forneceu evidências da formação preferencial de purinas oxidadas, especialmente de 2'-desoxiguanosina (dGuo). O aumento significativo da forma OC na presença de FPG indicou a formação de 8-oxo-2'-desoxiguanosina, resultante da oxidação da dGuo por O2  $({}^{1}\Delta_{g})$  e/ou pelos radicais derivados de 5-HPMU. Podemos concluir que 5-HPMU pode ser uma importante fonte biológica de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ). Além disto, a presença de 5-HPMU pode levar a propagação dos danos oxidativos no DNA, pois sua decomposição pode gerar radicais peroxila e alcoxila.

**Palavras-chave:** oxigênio molecular singlete, 5-(hidroperoximetil)uracil, hidroperóxido de timina, HPLC/MS/MS, captação química, luminescência.

#### ABSTRACT

Prado, F. M. Thymine hydroperoxide as biological source of singlet molecular oxygen  $[O_2 ({}^{1}\Delta_g)]$ . 2009. 209pp. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Oxidation of DNA by singlet molecular oxygen (O<sub>2</sub>  $^{1}\Delta_{g}$ ) can be involved in the development of mutations and diseases. In vivo,  $O_2(^1\Delta_g)$  can be generated by photosensitization reaction,  $H_2O_2$ and HOCl reaction and decomposition of organic hydroperoxides with  $\alpha$ -hydrogen ( $\alpha$ -ROOH) in the presence of metal ions (Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>) or HOCl. The  $\alpha$ -ROOH decomposition, such as lipid or protein hydroperoxides in the presence of metal ions or HOCl can generate  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) by Russell mechanism. In this mechanism, the self-reaction of peroxyl radicals generates a linear tetraoxide intermediate that decomposes to  $O_2(^1\Delta_g)$ , an alcohol and an aldehyde. Therefore, the purpose of this work is to investigate if  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_g$ ) can be generated by  $\alpha$ -thymine hydroperoxide, 5-(hydroperoxymethyl)uracil (5-HPMU) in the presence of Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> or HOCl. Another purpose is to study base modification and strand breaks formation in plasmid DNA (pBR322) by 5-HPMU decomposition in the presence of  $Cu^{2+}$ . The generation of  $O_2(^{1}\Delta_g)$  in the reaction of 5-HPMU and Ce<sup>4+</sup> or HOCl was monitored by monomol light emission in the near-infrared region (NIR,  $\lambda = 1270$  nm) and dimol light emission in the visible region ( $\lambda = 634$  e 703 nm). The generation of O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) during the reaction of 5-HPMU and Ce<sup>4+</sup> or HOCl was confirmed by acquisition of the light emission spectrum in the NIR. Furthermore, the generation of  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produced by 5-HPMU and Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> or HOCl was also confirmed by chemical trapping using anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS) and HPLC/MS/MS detection of the corresponding endoperoxide (AVSO<sub>2</sub>). The detection by HPLC/MS/MS of 5-(hydroxymethyl)uracil (5-HMU) and 5-formyluracil (5-FoU), two 5-HPMU decomposition products, support the Russell mechanism. Plasmid results from pBR322, 5-HPMU and Cu2+ reaction showed formation of DNA open circular form (OC), probably produced by 5-HPMU peroxyl and alkoxyl radicals. Additionally, the reaction of pBR322, 5-HPMU and Cu<sup>2+</sup> following by Fpg and NTH enzyme treatment demonstrated evidences of purine modification, especially 2'-deoxyguanosine (dGuo). The use of FPG enzyme indicated the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, a dGuo oxidation product formed by  $O_2({}^{1}\Delta_g)$  and/or 5-HPMU peroxyl and alkoxyl radicals. We can conclude that 5-HPMU can be a biological source of  $O_2({}^{1}\Delta_{g})$  and 5-HPMU decomposition can lead to an enhancing of DNA oxidative damage by 5-HPMU peroxyl and alkoxyl radicals formation.

**Keywords:** singlet molecular oxygen, 5-(hydroperoxymethyl)uracil, thymine hydroperoxide, HPLC/MS/MS, chemical trapping, luminescence.

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\phi_{\Delta}$ : rendimento quântico
- $\pi$ \*2p: orbital molecular  $\pi$  antiligante
- $\epsilon$ : coeficiente de absortividade molar
- $\lambda$ : comprimento de onda
- <sup>•</sup>OH: radical hidroxila
- 10-LAOOH: ácido 10-hidroperoxi-8,13-octadecadienoico
- 12-LAOOH: ácido 12-hidroperoxi-9,13-octadecadienoico
- 13-LAOOH: ácido 13-hidroperoxi-9,11-octadecadienoico
- <sup>18</sup>O-8-oxodGuo: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina marcada isotopicamente
- <sup>1</sup>F<sup>\*</sup>: fotossensibilizador no estado excitado singlete
- <sup>3</sup>F<sup>\*</sup>: fotossensibilizador no estado excitado triplete
- 5α-OOH: 3β-hidroxi-5α-colestano-6-ene-5-hidroperóxido
- 5-OOPMU: radical peroxila de 5-(hidroperoximetil)-2'-desoxiuridina
- 5-OOPMU: radical peroxila de 5-HPMU
- 5-OPMU: radical alcoxila de 5-(hidroperoximetil)-2'-desoxiuridina
- 5-<sup>•</sup>OPMU: radical alcoxila de 5-HPMU
- 5-FodU: 5-formil-2'-desoxiruridina
- 5-FoU: 5-formiluracila
- 5-HMdU: 5-(hidroximetil)-2'-desoxiuridina
- 5-HMU: 5-(hidroximetil)uracila
- 5-HPMdU: 5-(hidroperoximetil)-2'-desoxiuridina
- 5-HPMU: 5-(hidroperoximetil)uracila

- 5-OH-8-oxodGuo: 5-hidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina
- 5-OOH-6-OH-timidina: 5-hidroperoxi-6-hidroxi-5,6-dihidrotimidina
- 5-OOH-6-OH-timina: 5-hidroperoxi-6-hidroxi-5,6-dihidrotimina
- 5-OOH-8-oxodGuo: 5-hidroperoxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina
- $6\alpha$ -OOH: 3 $\beta$ -hidroxicolestano-4-ene- $6\alpha$ -hidroperóxido
- 6β-OOH: 3β-hidroxicolestano-4-ene-6β-hidroperóxido
- 6-OOH-5-OH-timidina: 6-hidroperoxi-5-hidroxi-5,6-dihidrotimidina
- 6-OOH-5-OH-timina: 6-hidroperoxi-5-hidroxi-5,6-dihidrotimina
- $7\alpha$ -OOH: 3 $\beta$ -hidroxicolestano-5ene- $7\alpha$ -hidroperóxido
- 7β-OOH: 3β-hidroxicolestano-5ene-7β-hidroperóxido
- 8-oxodGuo: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
- 9-LAOOH: ácido 9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoico
- AAPH: 2,2'-azobis(amidinopropano)
- ABAP: 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina)
- ACN: acetonitrila
- ACN- $d_3$ : acetonitrila deuterada
- AES: 9,10-dietilsulfonatoantraceno
- AP: sítio apurínico e apirimídico
- AVS: 9,10-divinilsulfonatoantraceno
- AVSO<sub>2</sub>: endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno
- COSY: Correlation Spectroscopy
- CuOOH: hidroperóxido de cumeno
- Cys: cisteína

D<sub>2</sub>O: água deuterada

dGuo: 2'-desoxiguanosina

DHPA: N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-9,10-antracenodipropanamida

DHPN: N,N`-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftalenodipropionamida

DHPNO<sub>2</sub>: endoperóxido de N,N<sup>-</sup>-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftalenodipropionamida

dlz: 2-amino-5-[(2-desoxi-\beta-D-eritro-pentafuranosil)-amino]-4H-imidazol-4-ona

DMNO<sub>2</sub>: endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno

DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado

dOxa: ácido oxalúrico

dOz: 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi-\beta-D-eritro-pentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona

DPA: 9,10-difenilantraceno

DPAO<sub>2</sub>: endoperóxido de 9,10-difenilantraceno

dSp: diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína

E°': potencial de redução

EAS: 9,10-diildietil disulfatoantraceno

 $F^{\bullet-}$ ,  $R^{\bullet+}$ : radicais do fotossensiblizador e substrato, respectivamente

F: fotossensibilizador

F<sub>0</sub>: fotossensibilizador no estado fundamental

Fe-alaranjado de xilenol: complexo entre Fe<sup>3+</sup> e alaranjado de xilenol

FMK: N-formilquinurenina

Fo: N-(2-desoxi- $\beta$ -D-eritro-pentafuranosil)formamida

FO2: fotossensibilizador oxidado

FPG: formamidopirimidina-DNA-glicosilase

#### His: histidina

- His-His: dímero formado entre dois resíduos de His
- His-Lys: dímero formado entre um resíduo de His e um residuo de Lys
- HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HMNO<sub>2</sub>: endoperóxido de 1,4-dihidroximetilnaftaleno
- HPLC/MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa em

tandem

- HPLC/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
- IR: região do infravermelho
- IR-próximo: região do infravermelho próximo
- ISC: cruzamento intersistemas
- kn: quinurenina
- $k_t$ : constante de velocidade total
- L<sup>•</sup>: radical de lipídeo ou de ácido linoleico centrado no átomo de carbono
- LAO<sup>•</sup>: radical alcoxila de ácido linoleico
- LAOO<sup>•</sup>: radical peroxila de ácido linoleico
- LAOOH: hidroperóxido de ácido linoleico
- LH: lipídeo insaturado
- LO<sup>•</sup>: radical alcoxila de lipídeo
- LO<sup>\*</sup>: carbonila no estado eletrônico excitado triplete
- LOO<sup>•</sup>: radical peroxila de lipídeo
- LOOH: hidroperóxido de lipídeo
- LP: enzima lactoperoxidase

*m/z*: relação massa/carga

MeOH: metanol

Met: metionina

MNEAO<sub>2</sub>: endoperóxido de *N*,*N*,*N*-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio

MNPO<sub>2</sub>: endoperóxido de 3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio

MPO: enzima mieloperoxidase

NDPO2: endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

NTH: endonuclease III

 $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ): oxigênio molecular no estado eletrônico singlete

 $O_2\,(^{l}\Sigma_{g}^{\phantom{g}+})$ : oxigênio molecular no estado eletrônico singlete

 $O_2({}^{3}\Sigma_{g})$ : oxigênio molecular no estado fundamental triplete

O2<sup>•-</sup>: radical ânion superóxido

pBR322: DNA plasmidial pBluescript

RH: substrato

RMN: ressonância magnética nuclear

RO<sup>•</sup> radical alcoxila de hidroperóxido orgânico

ROO<sup>•</sup>: radical peroxila de hidroperóxido orgânico

ROOH: hidroperóxido orgânico

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOD: enzima superóxido dismutase

t-BuOOH: terc-butilhidroperóxido

Trp: triptofano

Tyr: tirosina

### SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1 Introdução	23
1.1 Oxigênio molecular singlete	23
1.2 Fontes de oxigênio molecular singlete	
1.2.1 Fontes biológicas de oxigênio molecular singlete	
1.2.1.2 Fotossensibilização	
1.2.1.3 Peroxidação lipídica: Geração de oxigênio molecular singlete por meio do mecanismo de Russell	25
1.2.1.4 Reações enzimáticas	29
1.2.2 Fontes físicas e químicas de oxigênio molecular singlete	32
1.2.2.1 Fotossensibilização	32
1.2.2.2 Reação de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso ou íon hipoclorito	
1.2.2.3 Decomposição térmica de endoperóxidos	
1.3 Reações mediadas por oxigênio molecular singlete	37
1.3.1 Reação do tipo ene	37
1.3.2 Reação do tipo [4+2], Diels-Alder	37
1.3.3 Reação do tipo [2+2]	38
1.4 Técnicas de detecção oxigênio molecular singlete	39
1.4.1 Emissão de luz	39
1.4.2 Solventes deuterados	42
1.4.3 Supressão física e química de oxigênio molecular singlete	43
1.4.4 Captação química de oxigênio molecular singlete	44
1.5 Alvos biológicos de oxigênio molecular singlete	46
1.5.1 Reação de oxigênio molecular singlete e DNA	46
1.5.2 Reação de oxigênio molecular singlete e aminoácidos	50
1.5.3 Reação de oxigênio molecular singlete e lipídeos	54
1.6 Efeito mutagênico de oxigênio molecular singlete e sistemas de reparo	57
1.7 Hidroperóxidos de DNA	58
1.7.1 Formação de hidroperóxidos de timina e timidina	59
1.7.2 Decomposição dos hidroperóxidos de timina e timidina	65

1.8 Consequências biológicas da formação de hidroperóxidos de timina e timidina
1.8.1 Formação de lesões de DNA em <i>tandem</i>
1.8.2 Formação de produtos mutagênicos na decomposição de 5-(hidroperoximetil)-2'-
desoxiuridina e 5-(hidroperoximetil)uracila71
OBJETIVO
2 Objetivo
2.1 Estratégias
MATERIAIS E MÉTODOS
3 Materiais e Métodos
3.1 Materiais
3.2 Equipamentos
3.3 Síntese de 5-(hidroximetil)uracila
3.4 Síntese de 5-(hidroperoximetil)uracila
3.5 Purificação de 5-(hidroperoximetil)uracila por HPLC
3.6 Caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila por RMN
3.7 Quantificação de 5-(hidroperoximetil)uracila pelo método alaranjado de xilenol
3.8 Quantificação de 5-(hidroperoximetil)uracila pelo método iodometria
3.9 Análise da pureza de hidroperóxido de cumeno
3.10 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e Ce <sup>4+</sup> ou ácido hipocloroso
3.11 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>
3.12 Decomposição de 5-(hidroperoximetil)uracila na presença de borohidreto de sódio 86
3.13 Decomposição térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila
3.14 Medidas de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo
3.15 Medidas de emissão de luz bimolecular de oxigênio molecular singlete na região do visível
3.16 Espectro de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo
3.17 Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete
3.18 Captação química de oxigênio molecular singlete utilizando 9,10-
divinilsulfonatoantraceno

3.19 Síntese do endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno	92
3.20 Destilação de ácido hipocloroso	92
3.21 Experimentos envolvendo DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu <sup>2+</sup>	93
3.21.1 Competência bacteriana	93
3.21.2 Transformação de bactérias competentes	94
3.21.3 Extração de DNA plasmidial	94
3.21.4 Eletroforese em gel de agarose	96
3.21.5 Incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu <sup>2+</sup> na presença e ausência de metais contaminantes	97
3.21.6 Incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu <sup>2+</sup> em diferentes concentrações	97
3.21.7 Incubação de DNA plasmidial, Cu <sup>2+</sup> e 5-(hidroperoximetil)uracila em diferentes concentrações	98
3.21.8 Incubação de DNA plasmidial, Cu <sup>2+</sup> e 5-(hidroperoximetil)uracila na presença das enzimas de reparo formamidopirimidina-DNA-glicosilase e endonuclease III	98
RESULTADOS10	00
4 Resultados	01
4.1 Síntese e detecção por HPLC/MS de 5-(hidroximetil)uracila 10	01
4.2 Síntese e detecção por HPLC/MS de 5-(hidroperoximetil)uracila 10	02
4.3 Caracterização estrutural de 5-(hidroperoximetil)uracila por RMN 10	04
4.4 Análise do produto de decomposição de 5-(hidroperoximetil)uracila na presença de borohidreto de sódio	05
4.5 Avaliação da estabilidade térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila 10	07
4.6 Análise comparativa da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila obtida pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria	s 10
4.7 Análise da pureza de hidroperóxido de cumeno1	13
4.8 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e íons Ce <sup>4+</sup>	13
4.8.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo	о 14
4.8.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do visível 1	18
4.9 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e compostos presentes em sistemas biológicos	19

	4.9.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e ácido hipocloroso
	4.9.1.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo
	4.9.1.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do visível 123
	4.9.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e íons Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>
4	.10 Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete
4	.11 Síntese e detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno 127
4 (ł	.12 Captação química de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5- nidroperoximetil)uracila, ácido hipocloroso, Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>
4. de	.13 Efeito da concentração de ácido hipocloroso na geração e decomposição do endoperóxido e 9,10-divinilsulfonatoantraceno: Detecção por HPLC/MS/MS
4 di	.14 Efeito do tempo de incubação na geração do endoperóxido de 9,10- ivinilsulfonatoantraceno: Detecção por HPLC/MS/MS135
4 9	.15 Efeito do tempo de exposição a ácido hipocloroso na decomposição do endoperóxido de ,10-divinilsulfonatoantraceno
4. íc	.16 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ons Ce <sup>4+</sup>
4. co	.17 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ompostos presentes em sistemas biológicos
	4.17.1 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e ácido hipocloroso
	4.17.2 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5- (hidroperoximetil)uracila e íons Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>
4	.18 Experimentos envolvendo DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu <sup>2+</sup> 147
	<ul> <li>4.18.1 Efeito da presença e ausência de metais contaminantes na incubação DNA plasmidial,</li> <li>5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu<sup>2+</sup></li></ul>
	4.18.2 Efeito do aumento da concentração de íons $Cu^{2+}$ na incubação de DNA plasmidial, 5- (hidroperoximetil)uracila e $Cu^{2+}$
	4.18.3 Efeito do aumento da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila na incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu <sup>2+</sup>

4.18.4 Efeito da atividade enzimática de formamidopirimidina-DNA-glicosilase e	
incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu <sup>2+</sup>	. 153
DISCUSSÃO	. 157
5 Discussão	. 158
5.1 Síntese e caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila por alaranjado de xilenol, iodometria, HPLC/MS e RMN	. 158
5.2 Análise da diferença da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila obtida pelos métor alaranjado de xilenol e iodometria	dos . 160
5.3 Avaliação da estabilidade térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila	. 161
5.4 Geração de oxigênio molecular singlete na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Ce <sup>4+</sup> : Confirmação do mecanismo de Russell	. 163
5.5 Geração de oxigênio molecular singlete na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ácid hipocloroso, Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>	o . 167
5.6 Lesões oxidativas produzidas em DNA plasmidial na presença de 5- (hidroperoximetil)uracila e íons Cu <sup>2+</sup>	. 174
5.7 Caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila, 5-(hidroximetil)uracila e 5-formiluracila HPLC/MS/MS	n por . 178
CONCLUSÕES	. 182
6 Conclusões	. 183
PERSPECTIVAS	. 184
7 Perspectivas	. 185
REFERÊNCIAS	. 186
8 Referências	. 187
APÊNDICES	. 202
Apêndice A - Análise de 5-(hidroperoxi)metiluracila por RMN	. 202
Apêndice B - Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete	. 206

INTRODUÇÃO

#### 1 Introdução

#### 1.1 Oxigênio molecular singlete

O oxigênio molecular presente na atmosfera possui dois elétrons de spins paralelos, localizados em dois orbitais moleculares  $\pi$  antiligante de mesma energia, ou seja, orbitais degenerados ( $\pi^*2p$ ) (Figura 1.1). O oxigênio molecular no estado fundamental triplete é representado como  $O_2$  ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ). É possível observar que a molécula de  $O_2$  ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ) possui dois elétrons desemparelhados, qualificando esta molécula como um radical livre (Figura 1.1). Embora seja por definição um radical livre, o  $O_2$  ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ) não reage rapidamente com moléculas orgânicas devido à regra de conservação de *spin*. Portanto, a restrição cinética da reação de  $O_2$  ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ) com moléculas biológicas deve-se a dificuldade de redução direta do oxigênio molecular por dois elétrons de spins paralelos (regra de conservação de spin). No entanto, há outras formas de oxigênio molecular mais reativo. Após absorção de energia, podem ser geradas duas formas de oxigênio molecular eletronicamente excitado no estado singlete ( ${}^{1}\Sigma_{g}$  + e  ${}^{1}\Delta_{g}$ ). Estas formas excitadas de oxigênio molecular são mais reativas devido à remoção da regra de conservação de *spin*. O O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) possui 22,5 kcal/mol acima do estado fundamental e tempo de meia-vida de 10<sup>-6</sup> s (Figura 1.1). Já o O<sub>2</sub> ( $^{1}\Sigma_{g}^{+}$ ) tem 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e tempo de meiavida menor  $(10^{-11} \text{ s})$ , podendo decair rapidamente para a forma O<sub>2</sub>  $(^{1}\Delta_{g})$ . A única forma eletronicamente excitada de oxigênio molecular singlete que possui relevância no meio biológico é a forma O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Figura 1.1) (Halliwell, 2007).

Estado	Orbital π*2p	Energia (kcal/mol)	Meia-vida (s)
Excitado singlete $O_2 ({}^{1}\Sigma_{g}^{+})$		37,5	10 <sup>-11</sup>
Excitado singlete $O_2$ ( $^1\Delta_g$ )	$(\uparrow\downarrow)\bigcirc$	22,5	10 <sup>-6</sup>
Fundamental $O_2 ({}^{3}\Sigma_{g})$			

**Figura 1.1** Representação dos elétrons localizados nos orbitais  $\pi^*2p$  do oxigênio molecular no estado fundamental triplete ( ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ ) e nos estados excitado singlete ( ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$  e  ${}^{1}\Delta_{g}$ ).

#### 1.2 Fontes de oxigênio molecular singlete

#### 1.2.1 Fontes biológicas de oxigênio molecular singlete

#### 1.2.1.2 Fotossensibilização

O O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) pode ser gerado no meio biológico através da absorção de luz visível ou UV por fotossensibilizadores endógenos, como riboflavinas, porfirinas e derivados de nicotinamida (Carbonare e Pathak, 1992, Halliwell, 2007). A reação do O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com biomoléculas pode ter efeitos deletérios, como formação de produtos oxidados, desativação de enzimas e aumento da permeabilidade da membrana celular. Entretanto, a geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) por fotossensibilização pode ter um caráter terapêutico, como o tratamento de icterícia neonatal (Halliwell, 2007) ou terapia fotodinâmica (Calzavara-Pinton, *et al.*, 2007, Calzavara-Pinton, *et al.*, 2007). O processo de fotossensibilização ocorre quando há um fotossensibilizador (F), oxigênio molecular e luz (hv) (Figura 1.2). Inicialmente, o fotossensibilizador no estado fundamental (F<sub>0</sub>) absorve energia e passa a um estado excitado singlete ( ${}^{1}F^{*}$ ). O  ${}^{1}F^{*}$  pode decair para o estado fundamental, emitindo fluorescência ou pode decair para o estado excitado triplete ( ${}^{3}F^{*}$ ), de mais baixa energia em um processo conhecido como cruzamento intersistemas (ISC). Uma vez formada, a molécula de  ${}^{3}F^{*}$ pode ser desativada ao estado fundamental emitindo fosforescência ou reagir por dois diferentes mecanismos: tipo I ou tipo II. O mecanismo tipo I está relacionado à transferência de elétron entre  ${}^{3}F^{*}$  e o substrato (RH), formando radicais (ex: F<sup>•</sup> e R<sup>•+</sup>). Os radicais F<sup>•-</sup> e R<sup>•+</sup> podem então, reagir com o oxigênio molecular e formar produtos oxidados. No mecanismo tipo II, ocorre transferência de energia de  ${}^{3}F^{*}$  para o O<sub>2</sub> ( ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ ), levando à excitação eletrônica dos elétrons dos orbitais  $\pi$ \*2p e consequentemente a formação de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ). O O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) formado pode ser desativado ao estado fundamental [O<sub>2</sub> ( ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ )] liberando fóton (hv) ou pode reagir com um supressor (Q) gerando O<sub>2</sub> ( ${}^{3}\Sigma_{g}^{-}$ ) e o supressor no estado excitado triplete ( ${}^{3}Q^{*}$ ) ou pode reagir com o fotossensibilizador e formar FO<sub>2</sub> (Figura 1.2) (Straight e Spikes, 1985).



Figura 1.2 Representação dos mecanismos tipo I e II referentes à exposição de um fotossensibilizador a luz.

# 1.2.1.3 Peroxidação lipídica: Geração de oxigênio molecular singlete por meio do mecanismo de Russell

Outra possível fonte de O<sub>2</sub>  $(^{1}\Delta_{g})$  é a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é o processo de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, iniciado por

espécies reativas de oxigênio (ROS). Os produtos formados são hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) e também aldeídos, epóxidos e cetonas (Halliwell, 2007). A presença de LOOH pode alterar a composição da membrana e produzir espécies altamente reativas, que podem inclusive oxidar outras biomoléculas, como proteínas e o DNA. A peroxidação lipídica inicia-se através da abstração de um átomo de hidrogênio bis-alílico de um lipídeo insaturado (LH), formando um radical de lipídeo centrado no átomo de carbono (L<sup>•</sup>) (Figura 1.3). O hidrogênio bis-alílico pode ser facilmente abstraído por radicais com potencial de redução (E°') superior ao de LH (0,6 V), como o radical hidroxila (°OH), alcoxila (RO<sup>•</sup>) e peroxila de peróxido orgânico (ROO<sup>•</sup>) (Halliwell, 2007). Estes radicais possuem altos valores de E°' e podem abstrair um átomo de hidrogênio de LH (E°'  $^{\circ}$ OH, H<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O = 2,31 V; E°' ROO $^{\circ}$ , H<sup>+</sup>/ROOH = 1 V; E°' RO $^{\circ}$ , H<sup>+</sup>/ROH = 1,6 V) (Koppenol, 1990, Halliwell, 2007). O processo autocatalítico é iniciado quando o radical L<sup>•</sup> reage rapidamente com o oxigênio molecular ( $k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) e gera radical peroxila de lipídeo (LOO<sup>•</sup>) (Figura 1.3). O radical LOO<sup>•</sup> pode então, abstrair um átomo de hidrogênio de outra molécula de LH, produzindo LOOH e L<sup>•</sup>. O LOOH pode ser reduzido por Fe<sup>2+</sup> ou oxidado por Cu<sup>2+</sup>, formando radical alcoxila (LO<sup>•</sup>) e radical peroxila de lipídeo, respectivamente. O radical LO<sup>•</sup> formado pode reagir com outro radical LO<sup>•</sup> (reação de terminação), gerando aldeídos, cetonas ou epóxidos. Alternativamente, o radical LO<sup>•</sup> pode sofrer redução ao álcool (LOH). Se não for reduzido a LOOH, o radical LOO<sup>•</sup> formado pode reagir com outra molécula de LOO<sup>•</sup> e produzir um intermediário tetraóxido linear (LOOOOL) em um mecanismo proposto por Russell (Russell, 1957).



**Figura 1.3** Etapas da peroxidação lipídica iniciada pela abstração de um átomo de hidrogênio bis-alílico de um lipídeo insaturado (LH).

Russell (Russell, 1957) propôs que a reação de terminação de dois radicais peroxila primários ou secundários envolve a formação de um intermediário tetraóxido linear. O intermediário tetraóxido pode decompor *via* um mecanismo cíclico em cetona, álcool e oxigênio molecular. De acordo com o princípio de conservação de *spin* existem duas possibilidades de decomposição do intermediário tetraóxido linear: (i) formação de uma cetona eletronicamente excitada no estado triplete e oxigênio molecular no estado fundamental  $[O_2 ({}^3\Sigma_g)]$  ou (ii) formação de oxigênio molecular no estado excitado singlete ( ${}^1\Sigma_g^+$  e  ${}^1\Delta_g$ ), álcool e um composto carbonílico (aldeído ou cetona) (Figura 1.3). Em 1968, Howard e Ingold comprovaram a hipótese de Russell, mostrando que a decomposição do intermediário tetraóxido linear através de um mecanismo cíclico pode gerar uma molécula de oxigênio, sendo que o oxigênio molecular gerado estaria no estado excitado singlete ( ${}^1\Sigma_g^+$  ou  ${}^1\Delta_g$ ) (Howard e Ingold, 1968). Como a forma excitada

de oxigênio molecular singlete  ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$  decai rapidamente para a forma  ${}^{1}\Delta_{g}$ , a molécula de oxigênio singlete gerada seria a forma  ${}^{1}\Delta_{g}$ . Experimentos utilizando o captador químico 9,10difenilantraceno (DPA) demonstraram a geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de *sec*-butil hidroperóxido e Ce<sup>4+</sup>, através do mecanismo de Russell (Howard e Ingold, 1968). A detecção do endoperóxido de DPA (DPAO<sub>2</sub>) comprovou a geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de terminação de dois radicais peroxila de *sec*-butil hidroperóxido *via* formação e decomposição de um intermediário tetraóxido linear.

De maneira análoga, o intermediário tetraóxido LOOOL proveniente da reação de dois radicais LOO<sup>•</sup> pode decompor em uma carbonila eletronicamente excitada triplete (LO<sup>\*</sup>) (Figura 1.4B) ou oxigênio molecular no estado eletrônico excitado singlete  $[O_2 (^{1}\Delta_g)]$  (Figura 1.4A). Uma vez formada, LO<sup>\*</sup> pode transferir energia para  $O_2 (^{3}\Sigma_g^{-})$  e gerar indiretamente  $O_2 (^{1}\Delta_g)$  com rendimento de 30 % (Niu e Mendenhall, 1992). No entanto, a geração indireta de  $O_2 (^{1}\Delta_g)$  a partir de LO<sup>\*</sup> é pouco provável, porque o rendimento de LO<sup>\*</sup> é inferior a 0,1 % (Mendenhall, *et al.*, 1991). Logo, a decomposição de LOOOOL favorece a geração direta de  $O_2 (^{1}\Delta_g)$ , além da geração de um álcool (LOH) e um composto carbonílico (LO) (Figura 1.4A).



**Figura 1.4** Esquema do mecanismo de Russell proposto para a reação de dois radicais peroxila de lipídeo (LOO<sup>•</sup>), que resulta na formação de um intermediário tetraóxido linear (LOOOOL). (A) Decomposição de LOOOOL gerando um composto carbonílico (LO), um álcool (LOH) e oxigênio molecular no estado

excitado singlete  $[O_2 ({}^{1}\Delta_g)]$ . (B) Decomposição de LOOOOL gerando carbonila eletronicamente excitada triplete (LO<sup>\*</sup>), um álcool (LOH) e oxigênio molecular no estado fundamental  $[O_2 ({}^{3}\Sigma_g^{-})]$ .

Recentemente, Miyamoto e colaboradores demonstraram a geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de hidroperóxido de ácido linoleico (LAOOH) e metais (Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) (Miyamoto, *et al.*, 2003), peroxitrito (Miyamoto, *et al.*, 2003) ou HOCl (Miyamoto, *et al.*, 2006), através do mecanismo de Russell. A formação de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foi comprovada por meio do monitoramento da emissão de luz monomolecular na região do infravermelho próximo (IR-próximo,  $\lambda = 1270$  nm) e da emissão de luz bimolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do visível ( $\lambda = 703$  e 634 nm). A aquisição do espectro de emissão característico de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo forneceu uma prova inequívoca da geração desta espécie reativa. A captação química de oxigênio molecular singlete marcado isotopicamente [ ${}^{18}O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ )] por DPA e a detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (HPLC/MS/MS) do endoperóxido  ${}^{18}DPAO_2$  mostraram claramente que o hidroperóxido LA<sup>18</sup>O<sup>18</sup>OH pode gerar  ${}^{18}O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), através do mecanismo de Russell. Neste mecanismo, cada átomo de oxigênio marcado isotopicamente do intermediário tetraóxido é proveniente de moléculas diferentes de LAOOH e sua decomposição gera uma molécula de  ${}^{18}O_2$  ( ${}^{1}\Delta_g$ ) (Figura 1.4).

#### 1.2.1.4 Reações enzimáticas

O O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) também pode ser gerado em reações catalisadas por enzimas, como lactoperoxidase (LP) (Kanofsky, 1983, Waldemar, *et al.*, 2000, Sun, *et al.*, 2007), cloroperoxidase (Kanofsky, 1984) e mieloperoxidase (MPO) (Kiryu, *et al.*, 1999, Tatsuzawa, *et al.*, 1999, Halliwell, 2006, Lau e Baldus, 2006). A enzima LP é encontrada no leite e seus derivados. É utilizada como conservante natural, devido a sua ação antimicrobicida. Kanofsky mostrou que os sistemas Cl<sup>-</sup> ou Br<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/LP podem gerar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Kanofsky, 1983). A geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) foi confirmada através do monitoramento da emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em 1270 nm. O autor observou que não ocorria emissão de luz quando a enzima estava inativa ou quando um dos reagentes não estava presente (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cl<sup>-</sup> ou Br<sup>-</sup>). A enzima LP também pode catalisar a reação de decomposição de LAOOH (Sun, *et al.*, 2007). Experimentos de quimiluminescência e de ressonância eletrônica de spin foram utilizados para comprovar a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e dos radicais LAO<sup>•</sup>, LAOO<sup>•</sup> e L<sup>•</sup>. A detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (HPLC/MS) dos produtos de decomposição de LAOOH indicaram a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), a partir de um intermediário tetraóxido linear *via* mecanismo de Russell. Resultados indicaram que as espécies reativas geradas no sistema LAOOH/LP podem estar envolvidas na formação de quebra de fita simples e dupla de DNA plasmidial e também na formação de produtos oxidados de 2'-desoxiguanosina (dGuo) (Waldemar, *et al.*, 2000).

A enzima MPO foi igualmente relacionada com a geração de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) em sistemas contendo  $H_2O_2$  e ácido hipocloroso (HOCl), ácido bromídrico (HBr), Cl<sup>-</sup> ou Br<sup>-</sup>. Esta enzima pode ser encontrada em neutrófilos (Tatsuzawa, *et al.*, 1999), monócitos e macrófagos (Halliwell, 2006), e sua função está associada ao mecanismo de defesa contra vírus e bactérias. Basicamente, os neutrófilos são responsáveis pela fagocitose, destruição e eliminação de micro-organismos. No neutrófilo, o processo é iniciado pela formação de um fagossomo contendo o micro-organismo e subsequente liberação da enzima MPO dentro do fagossomo. Durante a fagocitose, os neutrófilos exibem um aumento significativo no consumo de oxigênio (*burst* respiratório) acompanhado da ativação da NADPH oxidase e formação de ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) (equação 1). O  $O_2^{\bullet}$  pode sofrer dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (equação 2). O peróxido H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser gerado dentro o fagossomo ou difundir na célula e entrar no fagossomo (Suzuki, et al., 1982). Estima-se que a concentração dos dois substratos da enzima MPO, Cl<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja alta no meio intracelular (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> > 100  $\mu$ M, Cl<sup>-</sup> = 100-140 mM). Portanto, é possível a formação biológica de HOCl em uma reação catalisada pela MPO (equação 3) (Suzuki, et al., 1982, Lau e Baldus, 2006). No meio fisiológico, há um equilíbrio entre o ácido HOCl e sua base conjugada, o íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>). Estudos in vitro mostraram a geração quantitativa de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de OCl<sup>-</sup> e  $H_2O_2$  (equação 4). Steinbeck e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a geração intracelular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) com a participação de neutrófilos, utilizando partículas revestidas com o captador químico de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), DPA (Steinbeck, *et al.*, 1992). A quantificação do  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) gerado em condições fisiológicas (pH 7.4, 1-30 nM de MPO, 10-100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100-130 mM de OCI<sup>-</sup>) foi realizada através do monitoramento da emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em 1270 nm (Kiryu, et al., 1999). A viabilidade intrafagossomal de bactérias (E. coli) normais e transformadas para produzir licopeno, um conhecido supressor de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), foi analisada em neutrófilos (Tatsuzawa, *et al.*, 1999). Observou-se que a linhagem transformada (produtora de licopeno) possuía uma viabilidade superior a linhagem normal.

$$\begin{array}{cccc} \mathsf{NADPH} + 2 & \mathsf{O}_2 \left({}^3\Sigma_9\right) & \longrightarrow & \mathsf{NADP}^+ + \mathsf{H}^+ + 2 & \mathsf{O}_2 \\ 2 & \mathsf{O}_2^- + 2 & \mathsf{H}^+ & \xrightarrow{\mathsf{SOD}} & \mathsf{H}_2\mathsf{O}_2 + \mathsf{O}_2 \left({}^3\Sigma_9^-\right) & (equação 2) \\ \mathsf{H}_2\mathsf{O}_2 + \mathsf{CI}^- & \xrightarrow{\mathsf{MPO}} & \mathsf{HOCI} + \mathsf{OH}^- & (equação 3) \end{array}$$

$$H_2O_2 + OCI^- \longrightarrow O_2(^1\Delta_g) + H_2O + CI^-$$
 (equação 4)

#### 1.2.2 Fontes físicas e químicas de oxigênio molecular singlete

#### 1.2.2.1 Fotossensibilização

A fotossensibilização também é um processo utilizado como fonte química de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ). Igualmente como no meio biológico, é necessária uma fonte luminosa (UV ou visível), um fotossensibilizador que absorva a radiação incidente e oxigênio molecular. O fotossensibilizador deve ser solúvel no solvente escolhido e seu estado excitado triplete deve possuir energia superior a 22,5 kcal/mol para que possa transferir energia para o  $O_2$  ( ${}^3\Sigma_g$ ) e gerar  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) (Figura 1.2) (Straight e Spikes, 1985). O processo de formação de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) através da fotossensibilização é o mesmo descrito no item 1.2.1.2. Alguns fotossensibilizadores comumente usados no laboratório, como azul de metileno, rosa bengala e derivados de porfirina possuem absorção na região do visível (Tabela 1.1). As características estruturais do fotossensibilizador afetam sua solubilidade e o rendimento quântico ( $\phi_{\Delta}$ ) de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ). O azul de metileno possui carga positiva e a rosa bengala possui carga negativa, sendo, portanto utilizados em solventes polares. Os derivados de porfirina e compostos aromáticos são utilizados em solventes apolares (Tabela 1.1) (Kochevar e Redmond, 2000).

Fotossensibilizador	Faixa de absorção, λ (nm)	$  \phi_{\Delta} de \\ O_2 (^{1}\Delta_g) $	Solvente
Azul de metileno	550-700	0,52	Polar (água, metanol)
Rosa bengala	450-580	0,76	Polar (água, metanol)
Porfirina meso-tetrafenil	300-650	0,62	Apolar (benzeno, clorofórmio)

**Tabela 1.1** Fotossensibilizadores comumente usados na geração de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ).

Adaptada de (Kochevar e Redmond, 2000)

#### 1.2.2.2 Reação de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso ou íon hipoclorito

A reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl ou OCl<sup>-</sup> é uma conhecida fonte de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), sendo que esta espécie reativa é produzida com alto rendimento (100 %) (equação 4). O mecanismo de oxidação por dois elétrons de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a redução de OCl<sup>-</sup> foi extensivamente estudado. Experimentos contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> isotopicamente marcado mostraram que a molécula de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) é proveniente do peróxido e não de OCl<sup>-</sup> (Rosenthal, 1985). A geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl foi primeiramente demonstrada através da emissão de luz bimolecular na região do visível ( $\lambda$  = 634 e 703 nm) (equação 9) (Khan e Kasha, 1963, Arnold, *et al.*, 1964). Esta emissão de luz é proveniente da desativação de duas moléculas de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) ao estado fundamental. Posteriormente, Browne e Ogryslo identificaram uma banda de emissão na região do IR-próximo ( $\lambda$  = 1270 nm) e atribuíram ao decaimento de uma molécula de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) ao estado de funtamental (equação 8) (Browne e Ogryzlo, 1964). Nos anos subsequentes, a reação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl continuou a ser usada como uma importante fonte química de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), principalmente com o objetivo de se estudar a geração e os efeitos oxidativos desta espécie reativa.

#### 1.2.2.3 Decomposição térmica de endoperóxidos

A decomposição térmica de endoperóxidos tem se mostrado uma valiosa fonte de O2  $({}^{1}\Delta_{g})$ , pois gera exclusivamente esta espécie reativa. Com isto, pode-se evitar a produção de outras espécies oxidantes, que também poderiam oxidar as moléculas de interesse. Além disto, o uso de endoperóxido possibilita a geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) em condições fisiológicas, como pH 7,4, meio aquoso e temperatura moderada. Wasserman e colaboradores foram os primeiros a observar que a decomposição térmica do endoperóxido DPAO<sub>2</sub> produzia os mesmos produtos oxidados observados na fotossensibillização (Wasserman, et al., 1972). Eles observaram que DPAO<sub>2</sub> era estável se estocado seco entre 0 e 5 °C, mas decompunha quando aquecido a 80 °C, gerando O<sub>2</sub>  $(^{1}\Delta_{g})$  com rendimento de 32 %. Evidências químicas mostraram que endoperóxidos de derivados de antraceno e naftaleno podem ser fontes "limpas" de O2 (1/2), pois não geram outras espécies reativas. No entanto, os endoperóxidos de antraceno podem gerar  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) somente quando são aquecidos em temperaturas superiores a 50 °C. Já os endoperóxidos de naftaleno geram O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) a 37 °C, o que os torna importantes fontes "limpas" de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) no meio biológico (Pierlot, *et al.*, 2000). Diante disto, muitos trabalhos foram feitos com o objetivo de sintetizar endoperóxidos hidrossolúveis de naftaleno, que pudessem gerar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em sistemas biológicos (Martinez, et al., 2000, Pierlot, et al., 2000, Nardello, et al., 2005, Martinez, et al., 2006). Os endoperóxidos de nafatleno, como endoperóxido de 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO2), endoperóxido de 1,4dihidroximetilnaftaleno (HMNO<sub>2</sub>), endoperóxido de 3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio (MNPO<sub>2</sub>), endoperóxido de 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDPO<sub>2</sub>), endoperóxido de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio (MNEAO2) e endoperóxido de N,N'-di(2,3dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO<sub>2</sub>) geralmente são utilizados como fontes de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), pois decompõem a 37 °C (Figura 1.5). O endoperóxido hidrossolúvel DHPNO<sub>2</sub> por exemplo, decompõe quando aquecido a 37 °C, produzindo O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) (59 % de rendimento), O<sub>2</sub> ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ) e DHPN (Figura 1.6) (Dewilde, *et al.*, 1998, Pierlot, *et al.*, 2000). Com o objetivo de mostrar a geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) no meio biológico e analisar o potencial desta espécie reativa em oxidar o DNA celular, experimentos foram feitos incubando células com DHPNO<sub>2</sub> e com DHPNO<sub>2</sub> isotopicamente marcado com <sup>18</sup>O (DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub>). Observou-se por HPLC/MS/MS a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina marcada isotopicamente (<sup>18</sup>O-8-oxodGuo) no DNA nuclear, mostrando que o O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) liberado dentro das células é capaz de oxidar diretamente o DNA celular (Ravanat, *et al.*, 2000). Além disto, experimentos utilizando DHPN<sup>18</sup>O<sub>2</sub> foram feitos para estudar a reação de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e 8-oxodGuo presente em oligonucleotídeo (Duarte, *et al.*, 2000) ou em nucleosídeo (Martinez, *et al.*, 2002).



Figura 1.5 Endoperóxidos derivados de naftaleno.



Figura 1.6 Decomposição térmica do endoperóxido hidrossolúvel DHPNO<sub>2</sub>.
## 1.3 Reações mediadas por oxigênio molecular singlete

Diversas ROS, como o  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) podem ser geradas na célula em decorrência do metabolismo celular. Sendo uma espécie reativa, o  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) pode reagir com biomoléculas ricas em elétrons, como DNA, lipídeos e proteínas. Há três tipos principais de reações mediadas pelo  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ): reação do tipo ene, reação do tipo [4+2], Diels-Alder e reação do tipo [2+2].

## 1.3.1 Reação do tipo ene

Na reação tipo ene, olefinas contendo átomo de hidrogênio alilíco são oxidadas por O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) a seus respectivos hidroperóxidos. No mecanismo desta reação, além da transferência da dupla ligação entre C1 e C2 para C2 e C3, ocorre a clivagem da ligação entre C3 e o hidrogênio alílico (equação 5) (Frimer e Stephenson, 1985). Ácidos graxos insaturados e colesterol são exemplos de alvos biológicos de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) *via* reação do tipo ene.



## 1.3.2 Reação do tipo [4+2], Diels-Alder

A reação do tipo [4+2], Diels Alder ocorre entre  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) e dienos conjugados, como derivados de antraceno e naftaleno (equação 6) (Bloodworth e Eggelte, 1985). Como produto final obtém-se endoperóxidos. Alguns endoperóxidos formados podem decompor quando submetidos a aquecimento e gerar  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ).



# 1.3.3 Reação do tipo [2+2]

A reação do tipo [2+2] entre O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) e alquenos substituídos com átomos ricos em elétrons, como nitrogênio (-NR<sub>2</sub>), oxigênio (-OR) ou enxofre (-SR) gera 1,2-dioxetanos. Os dioxetanos são peróxidos cíclicos que podem decompor em dois compostos carbonílicos, sendo que um deles pode ser formado em um estado eletronicamente excitado singlete ou triplete (equação 7) (Wasserman e Murray, 1979, Baumstark, 1985). Os 1,2-dioxetanos substituídos com átomos ricos em elétrons, preferencialmente decompõem em um composto carbonílico excitado no estado singlete.



 $R_2 e R_3 = CH_3$ 

\* eletronicamente excitado

### 1.4 Técnicas de detecção oxigênio molecular singlete

#### 1.4.1 Emissão de luz

O oxigênio molecular singlete  $({}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$  e  ${}^{1}\Delta_{g})$  é a forma eletronicamente excitada do oxigênio molecular. Sendo uma espécie excitada, o oxigênio molecular singlete pode emitir luz quando desativado a estados de mais baixa energia. Em 1947, Kaplan relatou que a desativação monomolecular de  $O_2$  ( ${}^{1}\Sigma_{g}^{+}$ ) em fase gasosa poderia produzir luminescência, a qual estava relacionada a uma banda de absorção de oxigênio em 762 nm (Kaplan, 1947). Posteriormente, foi observado em fase gasosa que a desativação monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) ao estado fundamental em 1270 nm (Noxon e Vallance Jones, 1962) e a transição de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Sigma_{g}^{+}$ ) a O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em 762 nm (Noxon, 1961) também produziam emissão de luz. Em 1963, Khan e Kasha (Khan e Kasha, 1963) atribuíram a emissão de luz observada, em 634 e 703 nm, a desativação de duas moléculas de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) ao estado fundamental. Somente em 1964, Browne e Ogryzlo reportaram de forma definitiva que o decaimento monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produz emissão de luz na região do IRpróximo ( $\lambda = 127$  nm) e que o decaimento dimolecular produz emissão de luz na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm) (Browne e Ogryzlo, 1964). Nos anos seguintes, diversos estudos relataram as mesmas emissões de luz de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na região do IR-próximo e visível (Khan e Kasha, 1970, Khan e Kasha, 1979, Khan, 1980). Portanto, o oxigênio molecular singlete ( ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$  e  $^{1}\Delta_{g}$ ) possui diversas bandas de emissão (Figuras 1.7 e 1.8), como na região do IR-próximo (traço a: 1270 nm), na região do infravermelho (IR) (traço b: 1580 nm,) e na região do visível (traços c: 762; d: 703; e: 634; f: 580; g: 520; h: 480 nm). Existem também duas bandas de emissão pouco intensas na região do UV (traços i: 400; j: 380 nm).



**Figura 1.7** Espectros de emissão de luz de oxigênio molecular singlete ( ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$  e  ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IRpróximo, do IR, do visível e UV. (A) Espectro de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do IR-próximo e IR, produzido na reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OCI<sup>-</sup>. (B) Espectro de emissão de luz bimolecular de oxigênio molecular singlete na região do visível, produzido por descarga elétrica. (C) Espectro de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do IR-próximo, produzido por excitação direta com laser ( $\lambda = 1064$  nm). (D) Espectro de emissão de luz bimolecular de oxigênio molecular singlete na região do visível, produzido por excitação direta com laser ( $\lambda = 1064$  nm). Figura adaptada de (Gray e Ogryzlo, 1969, Khan, 1980, Jockusch, *et al.*, 2008).

$$\begin{array}{c} O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(1270 \text{ nm})(a) \\ \end{array} \right\} \text{ IR-próximo} \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=1} + hv(1580 \text{ nm})(b) \\ \end{array} \right\} \text{ IR} \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(762 \text{ nm})(c) \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=1} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(703 \text{ nm})(d) \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(634 \text{ nm})(e) \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=1} + O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(580 \text{ nm})(f) \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(480 \text{ nm})(h) \\ O_{2}(^{1}\Delta_{g})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(480 \text{ nm})(h) \\ O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(480 \text{ nm})(h) \\ O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(380 \text{ nm})(j) \\ O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} + O_{2}(^{1}\Sigma_{g}^{+})_{v=0} \rightarrow O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + O_{2}(^{3}\Sigma_{g}^{-})_{v=0} + hv(380 \text{ nm})(j) \\ \end{array}$$

**Figura 1.8** Equações de decaimento monomolecular e dimolecular de oxigênio molecular singlete ( ${}^{1}\Sigma_{g}{}^{+}$  e  ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com emissão de luz na região do IR-próximo (a), do IR (b), visível (c-h) e UV (i-j).

Embora seja uma espécie eletronicamente excitada e sua desativação produza emissão de luz em diferentes comprimentos de onda, somente a luz emitida em 634, 703 nm (visível, equação 9) e em 1270 nm (IR-próximo, equação 8) é regulamente observada para o estado  ${}^{1}\Delta_{g}$  do oxigênio molecular singlete (Khan e Kasha, 1979, Khan, 1981, Khan, 1985). Resumidamente, a emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) corresponde à desativação de uma molécula de oxigênio do estado excitado singlete para o estado fundamental triplete [O<sub>2</sub>( ${}^{1}\Delta_{g}$ )  $\rightarrow$  O<sub>2</sub>  ${}^{3}\Sigma_{g}$ )] (equação 8). Já a emissão de luz bimolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) corresponde à desativação de duas moléculas de oxigênio no estado excitado singlete para o estado fundamental triplete [2 O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ )  $\rightarrow$  2 O<sub>2</sub> ( ${}^{3}\Sigma_{g}$ ) (equação 9). A desativação de duas moléculas de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) pode gerar emissão de luz na região do visível, como em 634 nm (vermelho) e 703 nm (vermelho) (Khan e Kasha, 1963, Khan, 1985).

$$\begin{split} O_2 ({}^1\Delta_g) &\to O_2 ({}^3\Sigma_g{}^-) & \lambda = 1270 \text{ nm} \\ 2 O_2 ({}^1\Delta_g) &\to 2 O_2 ({}^3\Sigma_g{}^-) & \lambda = 634 \text{ e } 703 \text{ nm} \end{aligned} \tag{equação 8}$$

#### 1.4.2 Solventes deuterados

Os solventes deuterados têm sido extensivamente utilizados na detecção de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ), pois a meia-vida desta espécie reativa é consideravelmente maior nestes solventes, que em solventes não deuterados (Ogilby e Foote, 1982, Ogilby e Foote, 1983). O menor valor de meia-vida de  $O_2$ ( ${}^1\Delta_g$ ) em solventes não deuterados deve-se a maior desativação desta espécie reativa ao estado fundamental triplete. A desativação de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) pode ocorrer devido a transferência de energia de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) para o nível vibracional do solvente. Esta transferência de energia de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) para o solvente está relacionada à vibração das ligações C-H e O-H do solvente. Portanto, como em solventes não deuterados não há restrição vibracional das ligações C-H e O-H, a transferência de energia de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) para o solvente pode ocorrer com maior rendimento. Já em solventes deuterados, a presença do átomo de deutério gera uma restrição vibracional das ligações C-D e O-D, o que diminui o rendimento de transferência de energia do  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) para o solvente. Logo, em solventes deuterados a meia-vida de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) é maior (Monroe, 1985).

Medidas da meia-vida de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  em solventes deuterados e não deuterados foram feitas por diversos grupos (Merkel e Kearns, 1972, Ogilby e Foote, 1983). Os valores de meia-vida de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  obtidos diferem consideravelmente. Isto se deve aos métodos indiretos escolhidos, como o consumo de uma molécula (A) que reage com  $O_2 ({}^1\Delta_g)$ , gerando um produto oxidado (AO<sub>2</sub>) (Merkel e Kearns, 1972). No entanto, métodos diretos como a detecção da emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) em 1270 nm têm sido usados na determinação da meia-vida desta espécie reativa em diversos solventes (Ogilby e Foote, 1982, Ogilby e Foote, 1983) (Tabela 1.2). Os resultados mostram que em D<sub>2</sub>O e acetonitrla-*d*<sub>3</sub> a meia-vida de O<sub>2</sub> ( $^1\Delta_g$ ) é muito maior que nos respectivos solventes não deuterados (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** Valores de meia-vida de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em diferentes solventes.

Solvente	Meia-vida de O <sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (µs)
acetona- $h_6$ / acetona- $d_6$	46,5 ± 2 / 690 ± 20
acetonitrila- $h_3$ / acetonitrila- $d_3$	$54,4 \pm 1,3 \ / \ 600 \pm 33$
benzeno- $h_6$ / benzeno- $d_6$	$26,7 \pm 1,3 / 550 \pm 11$
$H_2O / D_2O$	4 / 68,1 ± 2,5

Adaptada de (Ogilby e Foote, 1983)

## 1.4.3 Supressão física e química de oxigênio molecular singlete

A supressão de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) é utilizada como uma confirmação adicional da presença de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ). A supressão ou *quenching* de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) pode ser classificada como física ou química. As moléculas responsáveis pela supressão de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) são conhecidas como supressores ou *quenchers*. Geralmente, a supressão física e a química ocorrem paralelamente, com a ocorrência preferencial de uma delas.

A supressão química ocorre quando a molécula de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) reage com Q e gera um produto oxidado (QO<sub>2</sub>). Como exemplo de supressores químicos pode-se citar a dGuo, o triptofano (Trp), histidina (His), o ácido linoleico (LA) e os derivados de naftaleno e antraceno (Wasserman e Murray, 1979). Na supressão física ocorre a desativação do  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) ao estado fundamental. Neste caso não há formação de produtos e nem consumo de oxigênio. Há dois mecanismos de supressão física de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ): transferência de energia ou transferência de carga. O mecanismo de transferência de energia envolve a formação do Q no estado excitado triplete ( ${}^3Q^*$ ), devido à absorção de energia proveniente de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ). Além de  ${}^3Q^*$ , também é formado oxigênio molecular no estado fundamental triplete.  $\beta$ -Caroteno, quinonas, fenóis e sulfetos são moléculas que podem suprimir o  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) por meio do mecanismo de transferência de energia.

A supressão física de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) por transferência de carga envolve a formação de um complexo de transferência de carga entre  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) e Q, que posteriormente decompõe e gera  $O_2$  ( $^3\Sigma_g^-$ ). Alguns compostos, como aminas secundárias e terciárias (DABCO), fenóis, complexos metálicos, sulfetos, iodetos e azida podem desativar a molécula de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) por este mecanismo (Wasserman e Murray, 1979, Li, *et al.*, 2001).

## 1.4.4 Captação química de oxigênio molecular singlete

A captação química é considerada uma valiosa técnica de detecção de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) no meio biológico, pois pode-se detectar esta espécie reativa com alta sensibilidade e seletividade. Os captadores químicos geralmente são moléculas que reagem com o  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) através de uma cicloadição [4+2], Diels-Alder, gerando os respectivos endoperóxidos (item 1.3.2, Introdução). Os derivados de antraceno são moléculas largamente utilizadas como captadores químicos de  $O_2$ ( ${}^1\Delta_g$ ). Os endoperóxidos derivados de antraceno são moléculas estáveis à temperatura ambiente e podem decompor em temperaturas superiores a 100 °C (Aubry, *et al.*, 2003).

A eficiência da captação química de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) é influenciada pela estrutura e concentração do captador químico, além da solubilidade em determinado solvente. A concentração necessária

para captar 50 % de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) gerado é conhecida como valor  $\beta$  (Monroe, 1985). O EAS (9,10diildietil disulfatoantraceno) é um exemplo de captador químico de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) com valor  $\beta$ conhecido (Figura 1.9) (McCall, 1984, Di Mascio e Sies, 1989). O valor  $\beta$  de EAS corresponde a 8 mM, ou seja, é necessário que o EAS esteja em solução aquosa na concentração de 8 mM para captar 50 % do  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) gerado. Por similaridade estrutural, pode-se considerar para o AVS (9,10-divinilsulfonatoantraceno) um valor  $\beta$  de 8 mM .

O antraceno é uma molécula insolúvel em solução aquosa. Por isso, algumas modificações estruturais têm sido feitas com o objetivo de aumentar sua solubilidade em água. Além da solubilidade em água, a reatividade dos derivados de antraceno frente ao  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) também tem sido estudada nos últimos anos, indicando que a presença de grupos doadores de elétrons nas posições 9, 10 do anel antracênico facilita a cicloadição [4+2] e estabiliza o endoperóxido. Portanto, algumas características importantes foram consideradas na síntese de captadores químicos hidrossolúveis de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ): (i) adição de substituintes que aumentem a solubilidade da molécula em solução aquosa, como sais quaternários de amônio ou grupos hidrofílicos não iônicos; (ii) os substituintes não devem reagir e nem desativar a molécula de O2  $({}^{1}\Delta_{g})$  e (iii) os substituintes devem ser constituídos de cadeias carbônicas longas, que causam um aumento da densidade eletrônica do anel aromático e, uma diminuição do efeito estérico do substituinte (Pierlot, et al., 2000, Aubry, et al., 2003). Os captadores EAS (McCall, 1984, Di Mascio e Sies, 1989), DHPA (N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-9,10-antracenodipropanamida) (Martinez, et al., 2006) e AVS (Nardello, et al., 2005) são exemplos de captadores químicos derivados de antraceno, que são hidrosolúveis e possuem alta reatividade frente ao  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Figura 1.9).



**Figura 1.9** Captadores químicos de  $O_2(^{1}\Delta_g)$  hidrossolúveis.

# 1.5 Alvos biológicos de oxigênio molecular singlete

## 1.5.1 Reação de oxigênio molecular singlete e DNA

Entre as bases do DNA, a guanina é única base que pode reagir diretamente com o  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), pois possui o menor E° em pH 7 (1,29 V) (Tabela 1.3) (Burrows e Muller, 1998). A ordem crescente de E° das bases do DNA é a seguinte: guanina>>adenina>citosina>timina. Além disto, a constante de velocidade total ( $k_t$ ) da reação de  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e purinas ou pirimidinas é consideravelmente maior na reação com a guanina do que com as demais bases do DNA (Tabela 1.3) (Cadet, *et al.*, 2006). A reação de dGuo e  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) gera como produto principal a 8-oxodGuo.

Uma vez gerada, a 8-oxodGuo também pode ser oxidada pelo  $O_2$  ( $^{1}\Delta_g$ ), devido a seu menor E°' (0,58 V), comparando-se com o E°'da dGuo (1,29 V) (Burrows e Muller, 1998) (Tabela 1.3).

**Tabela 1.3** Potenciais de redução das bases do DNA e constantes de velocidade total ( $k_t$ ) da reação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e derivados de nucleosídeos em 1,1,2-triclorotrifluoretano.

Base	E°' (V)	$k_t (10^6 \mathrm{M}^{-1} \mathrm{s}^{-1})$
Guanina	1,29	$3,0 \pm 0,2$
Adenina	1,42	$0,\!018 \pm 0,\!001$
Citosina	1,60	$0,058 \pm 0,001$
Timina	1,70	$0,0069 \pm 0,0003$

Adaptada de (Cadet, et al., 2006) e (Burrows e Muller, 1998)

Nos últimos 20 anos, inúmeros estudos foram feitos com o objetivo de elucidar os mecanismos de oxidação da guanina em nucleosídeos, nucleotídeos e DNA celular (Martinez, *et al.*, 2003, Ravanat, *et al.*, 2004, Neeley e Essigmann, 2006). O estudo extensivo da reação de dGuo e  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) auxiliou na compreensão dos mecanismos envolvidos na geração dos produtos oxidados de dGuo. Os produtos de oxidação da dGuo foram identificados e a eles foram atribuídas funções mutagênicas.

O mecanismo envolvido na reação de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e dGuo em solução aquosa ocorre através de uma cicloadição [4+2], Diels-Alder aos carbonos C4 e C5 da base, gerando um 4,8endoperóxido (Figura 1.9, Tabela 1.4). A decomposição de 4,8-endoperóxido leva a formação majoritária de uma mistura de diastereoisômeros de espiroiminodihidantoína (dSp) e de forma minoritária, a formação de 8-oxodGuo (Niles, *et al.*, 2001, Ravanat, *et al.*, 2006, Martinez, *et al.*, 2007). A formação majoritária de dSp em relação a 8-oxodGuo parece estar relacionada a possibilidade de formação adicional de dSp a partir da oxidação da 8-oxodGuo. Isto pode ocorrer facilmente, pois é conhecido que a 8-oxodGuo possui um baixo valor de E°', sendo provável sua oxidação por O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ).

Diferentemente da oxidação de dGuo por O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) em solução aquosa, a oxidação da dGuo em DNA celular, em DNA de timo de bezerro ou oligonucleotídeo produz majoritariamente 8-oxodGuo (Ravanat, *et al.*, 2000, Ravanat, *et al.*, 2001) (Figura 1.9, Tabela 1.4). A formação majoritária de 8-oxodGuo foi comprovada por HPLC/MS/MS através da detecção da molécula isotopicamente marcada com <sup>18</sup>O, a <sup>18</sup>O-8-oxodGuo.

Uma vez formada, a 8-oxodGuo também pode ser oxidada. A reação de 8-oxodGuo presente em DNA de fita simples e  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  gera como produto principal ácido oxalúrico (dOxa) (Duarte, *et al.*, 2000). Esta reação ocorre *via* uma cicloadição [2+2] do  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  a ligação C4-C5, levando a formação de um intermediário 4,5-dioxetano. A decomposição de 4,5-dioxetano gera 5-hidroperoxi-8-oxo-2'-desoxiguanosina (5-OOH-8-oxodGuo) que decompõe e produz dOxa (Figura 1.9, Tabela 1.4).

Em nucleosídeo, a reação de 8-oxodGuo e O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produz diversos produtos de oxidação, como 2-amino-5-[(2-desoxi- $\beta$ -D-eritro-pentafuranosil)-amino]-4H-imidazol-4-ona (imidazolona ou dlz), 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi- $\beta$ -D-eritro-pentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (oxazolona ou dOz) e dSp (Martinez, *et al.*, 2002) (Figura 1.9, Tabela 1.4).



**Figura 1.9** Principais produtos formados na reação de dGuo e O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ). Adaptada de (Martinez, *et al.*, 2002, Martinez, *et al.*, 2007).

Substrato	Origem	Produtos principais
dGuo	DNA ou oligonucleotídeo	8-oxodGuo
dGuo	nucleosídeo	dSp
8-oxodGuo	DNA ou oligonucleotídeo	dOxa
8-oxodGuo	nucleosídeo	dlz, dOz, dSp

**Tabela 1.4** Produtos formados na reação de  $O_2 \left( {}^1\Delta_g \right)$  e dGuo ou 8-oxodGuo.

### 1.5.2 Reação de oxigênio molecular singlete e aminoácidos

Entre os aminoácidos, somente o Trp, a His, a metionina (Met), a cisteína (Cys) e a tirosina (Tyr) reagem com O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) em pH fisiológico (Tabela 1.5) (Wilkinson, *et al.*, 1995, Davies e Truscott, 2001, Ronsein, *et al.*, 2006). Os aminoácidos alifáticos por sua vez reagem mais lentamente com O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), possuindo constantes de velocidade reação com duas ordens de grandeza menor. A maioria das reações de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com aminoácidos, peptídeos e proteínas ocorre preferencialmente através de um mecanismo químico (supressão química) e não físico (supressão física), com exceção do Trp que reage com O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) através dos dois mecanismos.

Aminoácido	$k_t \left( \mathbf{M}^{-1} \mathbf{s}^{-1} \right)$	
Trp	3 x 10 <sup>7</sup>	*reação química
	$2-7 \ge 10^7$	<sup>#</sup> supressão física
His	$3,2 \ge 10^7$	pH = 7,1
	1 x 10 <sup>8</sup>	pH > 8
	$0,5 \ge 10^7$	pH < 7
Met	1,6 x 10 <sup>7</sup>	
Cys	$3,7 \ge 10^7$	
Tyr	$0.8 \ge 10^7$	

**Tabela 1.5** Constantes de velocidade total ( $k_t$ ) da reação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e aminoácidos.

Adaptada de (Davies e Truscott, 2001).

A oxidação de Trp por O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) tem sido extensivamente estudada devido ao efeito oxidativo dos produtos formados, como as quinureninas (Davies e Truscott, 2001, Ronsein, *et al.*, 2008, Ronsein, *et al.*, 2009). Sabe-se que pode existir uma relação entre o acúmulo de quinureninas no cristalino do olho humano, o aumento do dano oxidativo induzido por fotossensibilização e o desenvolvimento de catarata, já que as quinureninas são eficientes agentes fotossensibilizantes (Davies, 2003). Além disto, têm-se demonstrado que produtos de oxidação de Trp podem estar envolvidos na formação de agregados protéicos e ligações cruzadas (Davies, 2003).

Atualmente, sabe-se que a reação de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  e Trp gera hidroperóxidos (*cis* e *trans*) no C3 (hidroperoxipirroloindol) (Davies e Truscott, 2001) e/ou dioxetano na dupla ligação entre C2-C3, (Ronsein, *et al.*, 2008) (Figura 1.10). O mecanismo da reação mostra que hidroperoxipirroloindol está em equilíbrio com o hidroperóxido instável 3-hidroperoxiindolenina. Os produtos finais obtidos na reação de Trp e  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  são *cis, trans-*3 $\alpha$ -hidroxipirroloindol, *N*-formilquinurenina (FMK) e quinurenina (kn) (Figura 1.10). Inúmeros trabalhos têm relatado a formação de dioxetano de Trp na reação com  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$ . No entanto, dados conclusivos sobre a geração do dioxetano de Trp durante a decomposição de hidroperóxidos (*cis* e *trans*) de Trp só foram obtidos recentemente por Ronsein e colaboradores (Ronsein, *et al.*, 2008). Os resultados de quimiluminescência confirmaram a presença do dioxetano de Trp, através do espectro de fluorescência de FMK. Como é conhecido que a decomposição de dioxetano produz compostos carbonílicos eletronicamente excitados (Adam e Cilento, 1982), a emissão de luz observada foi relacionada à molécula de FMK, gerada a partir da decomposição do dioxetano de Trp (Figura 1.10). Os autores compararam o espectro de fluorescência de FMK purificada com os espectros obtidos na decomposição térmica de hidroperóxidos de Trp. Eles observaram que os espectros

dos hidroperóxidos de Trp possuíam emissão máxima em 436 nm, igualmente ao espectro de emissão de FMK.



**Figura 1.10** Reação de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) com resíduos de Trp.

A His é outro aminoácido que pode reagir rapidamente com o  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  (Tabela 1.5). Uma crescente atenção tem sido dada a caracterização dos produtos de oxidação da His, devido à presença deste aminoácido nas histonas. Estudos obtidos relacionaram a oxidação de resíduos de His com (i) formação de ligações cruzadas entre proteínas, devido a ligações intermoleculares entre resíduos de His (His-His) e/ou entre resíduos de His e lisina (His-Lys) (Shen, *et al.*, 1996, Shen, *et al.*, 2000) e (ii) inativação de enzimas (Morgan, *et al.*, 2002). A oxidação de resíduos de His leva a formação inicial de dois endoperóxidos instáveis (Figura 1.11). Os endoperóxidos são formados através de uma cicloadição [4+2] de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  aos carbonos 2,4 e/ou 2,5 do anel

imidazólico (Figura 1.11). Evidências da formação de endoperóxidos de derivados imidazólicos foram obtidas em temperaturas extremamente baixas (-100 °C) (Kang e Foote, 2000). A decomposição dos endoperóxidos produz hidroperóxidos de His, que posteriormente decompõem em seus respectivos alcoóis, ureia, asparagina e ácido aspártico (Figura 1.11) (Agon, *et al.*, 2006). Além dos produtos citados anteriormente, a presença de hidroperóxidos de His pode estar relacionada à formação de ligações cruzadas entre resíduos de His (His-His) e Lys (His-Lys) (Shen, *et al.*, 1996, Shen, *et al.*, 2000, Agon, *et al.*, 2006). Estudos mostraram que radicais RO<sup>•</sup> e/ou centrado no átomo de carbono (R<sup>•</sup>) podem ser formados durante a decomposição de hidroperóxidos de His, na presença de metais de transição. Uma vez formados, estes radicais podem reagir com uma His ou Lys e originar os dímeros His-His e His-Lys.



Figura 1.11 Reação de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) com resíduos de histidina.

## 1.5.3 Reação de oxigênio molecular singlete e lipídeos

Os lipídeos são alvos de inúmeras espécies reativas. A oxidação dos lipídeos da membrana celular é um processo conhecido como peroxidação lipídica e pode ser iniciado pela ação de radicais X<sup>•</sup> e de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Halliwell, 2007). Os produtos primários formados na oxidação

dos lipídeos da membrana são os LOOH. Os LOOH podem ser classificados como hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, hidroperóxidos de fosfolipídeos ou hidroperóxidos de colesterol.

Entre os hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, podemos citar os LAOOH. Os LAOOH podem ser formados por radicais X<sup>•</sup> na peroxidação lipídica (Figura 1.12A) ou por O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em reações de fotossensibilização mediada por fotossensibilizadores endógenos, como porfirinas (Figura 1.12B). Na peroxidação lipídica (Figura 1.12A), uma espécie altamente reativa, como X<sup>•</sup> pode abstrair um átomo de hidrogênio bis-alilíco da molécula de LA, gerando um radical centrado no átomo de carbono, que posteriormente reage com o oxigênio molecular e gera dois isômeros de LAOOH nos carbonos C9 (9-LAOOH) e C13 (13-LAOOH). Já na reação de LA com O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzido por fotossensibilização (Figura 1.12B) pode ser produzido quatro isômeros de LAOOH (10-LAOOH, 12-LAOOH, 9-LAOOH e 13-LAOOH) (Terao e Matsushita, 1977, Frankel, *et al.*, 1979). Deve-se ressaltar que a fotossensibilização de LA pode produzir quatro isômeros de LAOOH (9-, 10-,12-, 13-LAOOH), devido a contribuição de dois mecanismos, ou seja, o mecanismo tipo I com participação de radicais e o mecanismo tipo II com participação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ).



**Figura 1.12** Produtos formados na reação de LA e X<sup>•</sup> (A) ou O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzido na reação de fotossensibilização (B).

A oxidação do colesterol por  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) também foi estuda e observou-se a formação de três hidroperóxidos:  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -colestano-6-ene-5-hidroperóxido 3β-(5α-OOH), hidroxicolestano-4-ene-6α-hidroperóxido (6α-OOH) 3β-hidroxicolestano-4-ene-6βe hidroperóxido (6β-OOH) (Figura 1.13A) (Kulig e Smith, 1973). Experimentos de foto-oxidação de membranas mostraram que 5 $\alpha$ -OOH é gerado com maior rendimento que 6 $\alpha$ -OOH e 6 $\beta$ -OOH (Korytowski e Girotti, 1999). De forma diferente, a oxidação de colesterol por radicais X<sup>•</sup> gera  $3\beta$ -hidroxicolestano-5ene- $7\alpha$ -hidroperóxido (7α-OOH) 3β-hidroxicolestano-5ene-7βe hidroperóxido (7 $\beta$ -OOH) (Figura 1.13B) (Girotti, 1992). Os hidroperóxidos 7 $\alpha$ -OOH e 7 $\beta$ -OOH também podem ser formados através de um rearranjo alílico do hidroperóxido 5α-OOH (Figura 1.13C) (Beckwith, et al., 1989).



**Figura 1.13** Produtos formados na reação de colesterol e O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (A) ou radicais X<sup>•</sup> (B). Formação dos hidroperóxidos 7 $\alpha$ -OOH e 7 $\beta$ -OOH, a partir do rearranjo alílico de 5 $\alpha$ -OOH (C).

# 1.6 Efeito mutagênico de oxigênio molecular singlete e sistemas de reparo

A mutagenicidade dos danos oxidativos induzidos por O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foram demonstrados em bactéria (Agnez-Lima, *et al.*, 1999) e células de mamíferos (Costa de Oliveira, *et al.*, 1992, Moriya, 1993). Este efeito mutagênico está relacionado à oxidação da dGuo pelo O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), gerando majoritariamente 8-oxodGuo. A 8-oxodGuo possui um alto potencial mutagênico, pois pode parear com A gerando a transversão G $\rightarrow$ T (G:C $\rightarrow$ T:A), que é considerada a mutação mais frequente. Além disto, 8-oxodGuo pode parear com G, produzindo a transição G $\rightarrow$ C (G:C $\rightarrow$ C:G) (Cadet, *et al.*, 2002). As enzimas mais importantes envolvidas no reparo de 8-oxodGuo no DNA de bactéria são a formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG ou MutM) e a MutY-glicosilase. A FPG remove 8-oxodGuo pareada com C e, reconhece diversas lesões em purinas com anel imidazol aberto (Boiteux, *et al.*, 1992). Já a enzima MutY-glicosilase é capaz de remover a A pareada com 8-oxodGuo (Michaels, *et al.*, 1992). Juntas estas duas enzimas bacterianas reduzem o potencial mutagênico de 8-oxodGuo (Cavalcante, *et al.*, 2002). No entanto, recentemente foi demonstrado que a enzima UvrABC pode auxiliar a FPG na diminuição do efeito mutagênico de 8-oxodGuo (Agnez-Lima, *et al.*, 2001). Foi observada uma alta frequência de mutação em cepas de *E. coli* deficientes em algumas enzimas de reparo do DNA, como FPG, FPG e MutY ou FPG, MutY e UvrABC.

Em mamíferos, também foram encontradas enzimas homólogas as enzimas bacterianas e que são capazes de reparar 8-oxodGuo como OGG1, NEIL1, NEIL2, MUTYH e MTH, que impede a incorporação de dGTP contendo 8-oxodGuo durante a replicação (Bjelland e Seeberg, 2003, Baute e Depicker, 2008).

#### 1.7 Hidroperóxidos de DNA

A ocorrência de reações oxidativas provenientes do metabolismo aeróbico está intimamente relacionada à modificação estrutural da molécula do DNA. Os produtos primários formados na oxidação do DNA são os hidroperóxidos orgânicos (ROOH). A presença de hidroperóxidos de DNA foi primeiramente relatada por Scholes e colaboradores durante a irradiação de DNA de timo com raios–X (Scholes, *et al.*, 1956). Os autores ressaltaram a importância do oxigênio molecular na formação de ROOH e propuseram que a reação entre o oxigênio molecular e radicais R<sup>•</sup> poderia gerar radicais ROO<sup>•</sup>. Os radicais ROO<sup>•</sup> formados

podem então, formar ROOH no DNA após redução. Posteriormente, a irradiação de nucleobases, nucleosídeos e nucleotídeos evidenciou a formação de hidroxi-hidroperóxidos de pirimidinas (Scholes e Weiss, 1960). Somente em 1982, estudos foram feitos com o objetivo de analisar o consumo de oxigênio molecular durante a irradiação de ácidos nucléicos com raios- $\gamma$  (Isildar, *et al.*, 1982). Observou-se que as pirimidinas (timina, citosina e uracila) consumiam três vezes mais oxigênio molecular que as purinas (adenina e guanina). Segundo os autores, as pirimidinas consomem mais oxigênio molecular que as purinas devido à maior participação do oxigênio molecular em reações de formação de radicais ROO<sup>•</sup>. O que não acontece no mecanismo de oxidação das purinas, pois os radicais R<sup>•</sup> formados nos carbonos C4 e C5 da guanina ou adenina são rapidamente reduzidos, regenerando as respectivas bases (Burrows e Muller, 1998).

#### 1.7.1 Formação de hidroperóxidos de timina e timidina

A oxidação de componentes do DNA (nucleobase, nucleotídeo ou nucleosídeo) e DNA isolado (DNA de timo de bezerro) por raios-γ, raios-X e fotossensibilização permitiram a análise detalhada da formação dos hidroperóxidos de timina e timidina. A presença destes hidroperóxidos foi confirmada por diversas técnicas, como espectrometria de massa, HPLC, RMN e cristalografia (Cadet, 2006). A oxidação da timina e do nucleosídeo timidina gera basicamente os mesmos hidroperóxidos: 5(6)-hidroperóxido-6(5)-hidroxi (5(6)-OOH-6(5)-OH) e 5-(hidroperoximetil)uracila (5-HPMU) ou 5-(hidroperoximetil)-2'-desoxiuridina (5-HPMdU). Os hidroperóxidos de timina podem ser gerados biologicamente por dois mecanismos diferentes: reação com radical <sup>•</sup>OH, oxidação por um elétron ou reação com radical peroxila de lipídeo ou proteína.

A principal fonte de radical <sup>•</sup>OH dentro da célula é a reação de Fenton. Nesta reação, o  $H_2O_2$  produzido na reação de dismutação do ânion radical superóxido reage com Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>, gerando o radical <sup>•</sup>OH (Halliwell, 2007). O radical <sup>•</sup>OH pode reagir com o açúcar abstraindo átomos de hidrogênio ( $k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ou com a base através de adição a dupla ligação ( $k \ge 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). O mecanismo de adição a dupla ligação ocorre preferencialmente em relação ao mecanismo de abstração de átomos de hidrogênio do açúcar.

A reação do radical 'OH e timina ou timidina ocorre através da adição à dupla ligação entre C5 e C6 ou abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metila (Figura 1.14). A adição do radical 'OH ocorre preferencialmente no C5 (56 % de rendimento), formando o radical 5hidroxi-5,6-dihidrotimi-6-la (Jovanovic e Simic, 1986). O radical 'OH também pode adicionar ao C6 (35 % de rendimento) ou abstrair um átomo de hidrogênio do grupo metila (9 % de rendimento) e gerar os radicais 6-hidroxi-5,6-dihidrotimi-5-la e 5-(uracila)metila, respectivamente (Jovanovic e Simic, 1986) (Figura 1.14). A explicação para a adição preferencial do radical 'OH ao C5 deve-se ao fato de este ser o sítio com maior densidade eletrônica em decorrência da ressonância produzida pela proximidade a carbonila. Após serem formados, os radicais centrados no átomo de carbono de timina ou timidina reagem rapidamente com o oxigênio molecular ( $k \approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), formando os respectivos radicais peroxila, que em reações subsequentes são reduzidos aos hidroperóxidos: (i) cis, trans-6-hidroperoxi-5-hidroxi-5,6dihidrotimina (6-OOH-5-OH-timina) ou cis, trans-6-hidroperoxi-5-hidroxi-5,6-dihidrotimidina (6-OOH-5-OH-timidina); (ii) cis ,trans-5-hidroperoxi-6-hidroxi-5,6-dihidrotimina (5-OOH-6-OH-timina) ou cis, trans-5-hidroperoxi-6-hidroxi-5,6-dihidrotimidina (5-OOH-6-OH-timidina); (iii) 5-HPMU ou 5-HPMdU (Cadet, 2006).



Figura 1.14 Mecanismo de reação do radical <sup>•</sup>OH e timina ou timidina. Adaptada de (Cadet, 2006).

Outra forma de geração de hidroperóxidos de timina ou timidina é através do mecanismo de oxidação por um elétron (mecanismo tipo I). Neste mecanismo, ocorre a foto-oxidação da timina ou timidina induzida por fotossensibilizadores endógenos e luz UVA (320-400 nm) ou luz visível. A fotossensibilização da timidina na presença de riboflavina, menadiona ou benzofenona gera inicialmente um cátion radical da base, produzido através da transferência de elétron da base para o fotossensibilizador no estado excitado triplete (menadiona, <sup>3</sup>MQ<sup>\*</sup>) (Figura 1.15) (Douki e Cadet, 1999, Ravanat, *et al.*, 2001, Cadet, *et al.*, 2009). Dois mecanismos de degradação do cátion radical da base são possíveis: a hidratação no C6 com formação do radical 6-hidroxi-5,6-dihidrotimi-5-la (rendimento de 60 %) e subsequente geração do hidroperóxido *cis, trans*-5-OOH-6-OH-timina/timidina ou desprotonação seguida da formação do radical 5-(uracila)metila e do hidroperóxido 5-HPMU ou 5-HPMdU (rendimento de 40 %) (Figura 1.15) (Douki e Cadet, 1999, Ravanat, *et al.*, 2001).



**Figura 1.15** Mecanismo de oxidação da timina ou timidina por um elétron na presença de menadiona (MQ). Adaptada de (Cadet, 2006).

Além dos mecanismos descritos anteriormente de geração de hidroperóxidos de timina ou timidina, estudos mostraram que estes hidroperóxidos podem ser gerados também na reação de radical peroxila e timina ou timidina. Martini e Termini foram os primeiros a relatar a geração do hidroperóxido 5-HPMdU na reação de radical peroxila de 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina) (ABAP) e timidina (Martini e Termini, 1997). Os autores identificaram e caracterizaram por GC/MS e RMN (<sup>1</sup>H) o hidroperóxido 5-HPMdU e seus produtos de decomposição, o álcool 5- (hidroximetil)-2'-desoxiuridina (5-HMdU) e o aldeído 5-formil-2'-desoxiruridina (5-FodU).

Além disto, eles propuseram um mecanismo de formação de 5-HPMdU a partir da oxidação de timidina pelo radical peroxila de ABAP. Os autores propuseram que o radical peroxila de ABAP poderia abstrair um átomo de hidrogênio do grupo metila da timidina, gerando um radical centrado no átomo de carbono. Posteriormente, o radical centrado no átomo de carbono poderia reagir com oxigênio molecular, formando radical peroxila de 5-HPMdU (Martini e Termini, 1997). Segundo os autores, o radical peroxila de 5-HPMdU poderia dimerizar formando um intermediário tetraóxido instável, que poderia decompor de duas formas: (i) via radicais alcoxila de 5-HPMdU, gerando 5-HMU e oxigênio molecular no estado fundamental ou (ii) via mecanismo de Russell, gerando O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), 5-HMU e 5-FoU (Martini e Termini, 1997). A grande importância deste estudo está na demonstração pioneira de geração do hidroperóxido 5-HPMdU, a partir da oxidação da timidina por radicais peroxila. Além disto, os autores ressaltaram que a reação de timidina e radical peroxila gera majoritariamente produtos oxidados no grupo metila da timidina, como o hidroperóxido 5-HPMdU e seus produtos de decomposição 5-HMdU e 5-FodU. Os resultados obtidos por Martini e Termini (Martini e Termini, 1997) contribuíram de forma significativa na possível participação radicais peroxila de lipídeos e proteínas na geração biológica de hidroperóxidos de timina, especialmente 5-HPMdU. De fato, estudos recentes demonstraram níveis aumentados de 5-HPMdU na urina de mulheres com alimentação rica em ácidos graxos poli-insaturados, indicando um possível envolvimento de radicais peroxila de ácidos graxos na formação deste hidroperóxido (Djuric, et al., 2001, Djuric, et al., 2001). Além disto, radicais peroxila de proteínas, como de histonas também podem estar envolvidos na formação de hidroperóxidos de pirimidinas (Luxford, et al., 1999, Luxford, et al., 2000, Furukawa, et al., 2005).

### 1.7.2 Decomposição dos hidroperóxidos de timina e timidina

Um aspecto importante dos hidroperóxidos de timina ou timidina está relacionado à sua estabilidade. Estes hidroperóxidos são comprovadamente estáveis em pH neutro, pois possuem altos valores de meia-vida de decomposição (Wagner, et al., 1994). Embora sejam peróxidos estáveis, os hidroperóxidos de timina e timidina podem decompor facilmente na presença de metais de transição (Tofigh e Frenkel, 1989) ou sob aquecimento (Wagner, et al., 1994). Wagner e colaboradores analisaram a cinética de decomposição térmica dos hidroperóxidos de timidina em três diferentes temperaturas (22, 37 e 50 °C) (Figura 1.16) (Wagner, et al., 1994). Foi observado que os 5(6)-hidroperóxido-6(5)-hidroxi de timidina (6-OOH-5-OH-timidina e 5-OOH-6-OH-timidina) são estáveis a 22 °C (meia-vida: 7-542 h) (Figura 1.16), mas podem decompor rapidamente a 37 °C (meia-vida: 1-35 h) e 50 °C (meia-vida: 0,11-1,3 h). De forma completamente diferente, o hidroperóxido 5-HPMdU mostrou-se quarenta vezes mais estável que os demais hidroperóxidos de timidina (meia-vida: 10840 h). A decomposição de 6-OOH-5-OHtimidina e 5-OOH-6-OH-timidina produz como produto final derivados de hidantoína, formamida [N-(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)formamida, (Fo)] e ureia (Figura 1.16). Já a decomposição de 5-HPMdU gera majoritariamente o álcool 5-HMdU e de forma minoritária o aldeído 5-FodU (Figura 1.16) (Wagner, et al., 1994). De forma análoga, a decomposição do hidroperóxido da nucleobase, 5-HPMU, pode gerar os mesmos produtos: 5-(hidroximetil)uracila (5-HMU) e 5-formiluracila (5-FoU).



Figura 1.16 Produtos formados na decomposição térmica dos hidroperóxidos de timina e timidina

Embora sejam compostos relativamente estáveis, os hidroperóxidos de timina ou timidina podem decompor na presença de metais de transição. A reação de hidroperóxidos de timina ou timidina e metais ( $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ ) pode produzir espécies altamente reativas, como radicais alcoxila e peroxila que podem oxidar outras bases do DNA (Halliwell, 2007). Diante disto, Tofigh e

Frenkel estudaram os efeitos dos metais livres e quelados na degradação do hidroperóxido 5-HPMdU (Tofigh e Frenkel, 1989). A degradação de 5-HPMdU na presença de metais livres e quelados foi analisada através da detecção de 5-HMdU e 5-FodU por HPLC. Observou-se que o Fe<sup>2+</sup> catalisa a degradação instantânea de 5-HPMdU em quantidades similares de 5-HMdU e 5-FodU. O Cu<sup>2+</sup> ocasionou a decomposição de 5-HPMU dependente do tempo de incubação, gerando predominantemente 5-FodU. Já na presença de Fe<sup>2+</sup>, EDTA e DTPA causaram uma rápida decomposição de 5-HPMdU a 5-FodU, e a decomposição de 5-HPMdU mediada por Cu<sup>2+</sup> foi bloqueada somente por desferral e DTPA.

## 1.8 Consequências biológicas da formação de hidroperóxidos de timina e timidina

A formação de 5-HPMdU ou 5-HPMU representa um grande risco para a molécula do DNA, principalmente porque estes hidroperóxidos podem decompor e gerar agentes oxidantes, como O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), radicais alcoxila e peroxila. A geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais alcoxila e peroxila pode ocasionar a oxidação de bases adjacentes ao hidroperóxido (lesões de DNA em *tandem*). Além disto, a decomposição térmica ou catalisada por metais de transição de 5-HPMdU ou 5-HPMU pode levar a formação de compostos altamente mutagênicos, como 5-HMdU e 5-FodU ou 5-HMU e 5-FoU.

## 1.8.1 Formação de lesões de DNA em tandem

Estudos utilizando oligonucleosídeos (dinucleosídeos monofosfato) têm sido feitos com objetivo de analisar os mecanismos de oxidação da molécula do DNA. Estes esforços em analisar a oxidação de sistemas mais complexos de ácidos nucléicos possibilitaram a detecção de danos oxidativos envolvendo duas bases adjacentes (lesões de DNA em *tandem*), além dos já

conhecidos danos a nucleotídeos, nucleosídeos e bases isoladas. As lesões de DNA em *tandem* são formadas em decorrência da presença de hidroperóxidos de timidina (6-OOH-5-OH-timidina, 5-OOH-6-OH-timidina e 5-HPMdU) e envolvem a oxidação de uma guanina adjacente ao peróxido. A oxidação da guanina adjacente a um hidroperóxidos de timidina resulta na formação majoritária de lesões em *tandem*, constituídas de *N*-(2-desoxi- $\beta$ -D-eritropentafuranosil)formamida e 8-oxodGuo (Fo/8-oxodGuo) ou 8-oxodGuo/Fo.

Box e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a formação das lesões em *tandem*, Fo/8-oxodGuo e 8-oxodGuo/Fo, em oligomêros de DNA [d(GpT) e d(CpGpTpA)] expostos a raios-X (Box, *et al.*, 1993, Box, *et al.*, 1997, Bourdat, *et al.*, 2000). Os autores propuseram que a formação das lesões em *tandem* estava relacionada à adição do radical <sup>•</sup>OH ao C6 da timina, seguida da formação do hidroperóxido 5-OOH-6-OH-timina como produto final. Como a guanina possui o menor potencial de redução, o hidroperóxido 5-OOH-6-OH-timina poderia oxidar a guanina adjacente e formar 8-oxodGuo. A presença de Fo reforçou a hipótese de formação do hidroperóxido 5-OOH-6-OH-timina, pois este derivado de formamida é um dos produtos de decomposição deste hidoperóxido.

Posteriormente, experimentos de hidrólise enzimática de DNA isolado exposto a radiação-γ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe(II)EDTA (reação de Fenton) possibilitaram a excisão e detecção por HPLC/MS/MS das lesões Fo/8-oxodGuo e 8-oxodGuo/Fo (Bourdat, *et al.*, 2000). Diante dos resultados obtidos, foi proposto um mecanismo de formação de lesões em *tandem* iniciado pela adição do radical <sup>•</sup>OH a dupla ligação entre C5 e C6, seguida da geração de um cátion radical de guanina, proveniente da transferência intramolecular de elétron da guanina para o radical peroxila de timina formado.

No entanto, um novo mecanismo de formação de lesões em *tandem* foi proposto, no qual se utilizou experimentos de marcação isotópica (com <sup>18</sup>O<sub>2</sub>) e espectrometria de massa (Douki, *et al.*, 2002). A exposição de dGpdT e dTpdG à radiação-γ na presença de <sup>18</sup>O<sub>2</sub> possibilitou a análise da formação de uma série de lesões em *tandem*, como lesões contendo resíduos de formamida, glicol de timina, 8-oxodGuo, e oxazolona. Dentre estas possíveis lesões em *tandem*, foi possível detectar com rendimento apreciável somente as lesões Fo/8-oxodGuo e 8-oxodGuo/Fo (Douki, *et al.*, 2002). A geração das lesões Fo/8-oxodGuo e 8-oxodGuo/Fo pode ser iniciada pela adição do radical <sup>•</sup>OH ao C5 ou C6 da timina, levando a formação de um radical centrado no átomo de carbono (Figura 1.17). A reação entre <sup>18</sup>O<sub>2</sub> e o radical centrado no átomo de carbono produz um radical peroxila de timina marcado isotopicamente (Figura 1.17). O radical peroxila de timina contendo <sup>18</sup>O<sub>2</sub> pode adicionar diretamente ao C8 da guanina, levando a formação das lesões Fo/8-oxodGuo/Fo (Douki at *andem*) ou dois átomos de <sup>18</sup>O<sub>2</sub> (8-<sup>18</sup>oxodGuo/F<sup>18</sup>o) (Figura 1.17).



**Figura 1.17** Mecanismo proposto para a formação da lesão de DNA em *tandem* 8-oxodGuo/Fo. Adaptada de (Douki, *et al.*, 2002).

Além dos hidroxi-hidroperóxidos de timidina, o hidroperóxido 5-HPMdU também pode estar envolvido na formação de lesões em *tandem*. Estas lesões em *tandem* podem conter 8oxodGuo e os produtos de decomposição de 5-HPMdU (5-HMdU e 5-FodU). No entanto, nenhum estudo foi realizado com o objetivo de se investigar esta hipótese. Resultados obtidos durante a exposição de dGuo e DNA de timo ao radical peroxila de 5-HPMdU (5-<sup>•</sup>OOPMdU) demonstraram a formação de 8-oxodGuo (Goto, *et al.*, 2008). Além disto, também foi possível detectar por HPLC a geração dos conhecidos produtos de decomposição de 5-HPMdU, o álcool 5-HMdU e o aldeído 5-FodU (Goto, *et al.*, 2008). Segundo os autores, a formação de 8-oxodGuo pode estar relacionada a dois mecanismos diferentes: reação direta entre a dGuo e o radical 5-<sup>•</sup>OOPMdU ou reação de dGuo e radical alcoxila de 5-HPMdU (5-<sup>•</sup>OPMdU), formado na reação de 5-HPMdU e íons Fe<sup>2+</sup>. Provavelmente, a reação entre a dGuo e o radical 5-<sup>•</sup>OOPMdU ocorre através da adição direta do radical peroxila ao C8 da guanina, levando a formação de 8-oxodGuo. Este mecanismo de formação de 8-oxodGuo, através da adição direta de radical 5-<sup>•</sup>OOPMdU a guanina, é possível (Goto, *et al.*, 2008), pois já foi demonstrado que radicais peroxila de hidroxihidroperóxidos de timidina são capazes de adicionar ao C8 da guanina (Figura 1.17) (Douki, *et al.*, 2002). Outro possível mecanismo é a geração de 8-oxodGuo induzida pelo radical 5-<sup>•</sup>OPMdU formado na reação de 5-HPMdU e Fe<sup>2+</sup>. A formação dos produtos 5-HPMdU e 5-FodU também parece estar relacionada a formação do radical alcoxila gerado na reação de 5-HPMdU e Fe<sup>2+</sup>, sendo que estes produtos foram detectados anteriormente (Tofigh e Frenkel, 1989). Entretanto, a hipótese mecanística de formação de 8-oxodGuo através da adição direta de radicais peroxila de 5-HPMdU ao C8 da guanina ainda não foi comprovada. Diante disto, é necessário uma investigação mais detalhada do mecanismo envolvido na formação das lesões em *tandem* de DNA, provenientes da ação dos radicais peroxila e alcoxila de 5-HPMdU.

# 1.8.2 Formação de produtos mutagênicos na decomposição de 5-(hidroperoximetil)-2'desoxiuridina e 5-(hidroperoximetil)uracila

O dano oxidativo no DNA tem sido relacionado à morte celular, ao aparecimento de mutações, ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e ao envelhecimento. Felizmente, um eficiente sistema de reparo é responsável por corrigir os eventuais danos oxidativos formados na molécula de DNA. Este sistema de reparo é constituído de enzimas (glicosilases, peroxidases e transferases) e moléculas redutoras, como glutationa reduzida, ascorbato (vitamina C) e  $\alpha$ -

tocoferol (vitamina E) (Halliwell, 2007). Os hidroperóxidos orgânicos, que são exemplos de dano oxidativo do DNA, podem ser reparados biologicamente pela ação de enzimas reparo, como as peroxidases. Estas enzimas catalisam a redução do hidroperóxido orgânico a seu álcool correspondente, que posteriormente é reparado por glicosilases específicas através de um mecanismo de excisão de base (Halliwell, 2007). O reparo dos hidroperóxidos 5-HPMU e 5-HPMdU pode ocorrer da mesma forma dos hidroperóxidos orgânicos. Estudos demonstraram que 5-HPMU pode ser reduzido ao álcool 5-HMU em uma reação catalisada por glutationa peroxidase dependente de selênio ou por glutationa transferase (Tan, *et al.*, 1986, Tan, *et al.*, 1988) ou por glutationa peroxidase de fosfolipideo (Bao, *et al.*, 1997).

Como foi dito anteriormente, a decomposição espontânea de 5-HPMdU ou mediada por metais de transição ou a redução catalisada por enzimas de reparo pode gerar o álcool 5-HMdU e o aldeído 5-FodU. A análise detalhada do efeito da formação destes produtos de decomposição em sistemas biológicos mostrou que ambos são altamente mutagênicos (Bjelland e Seeberg, 2003). Além disto, muitos trabalhos têm considerado 5-HMdU e 5-FodU como biomarcadores de dano oxidativo no DNA. Portanto, a presença e detecção de 5-HMdU e 5-FodU em sistemas biológicos pode fornecer fortes evidências do nível de dano oxidativo gerado e da eficiência do sistema de reparo.

No caso de 5-HMdU, foi possível detectar a formação deste composto com alto rendimento no sangue de mulheres portadoras de câncer de mama (Djuric, *et al.*, 2001), na urina de fumantes (Bianchini, *et al.*, 1998) e na urina de pacientes portadores de carcinoma e medicados com adriamicina (Faure, *et al.*, 1998). Estudos *in vitro* também demonstraram a formação de 5-HMdU na fotossensibilização de timina (Delatour, *et al.*, 1998), timidina ou DNA isolado na presença de menadiona e luz UVA (Douki e Cadet, 1999). A presença de 5-HMdU
eletroquímica (HPLC/EC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), após exposição de DNA isolado a raios- $\gamma$  (Douki, *et al.*, 1996). O efeito mutagênico de 5-HMdU está relacionado a indução da transição T $\rightarrow$ C, proveniente do pareamento de 5-HMdU com adenina (A) ou guanina (G) (Figura 1.18A) (Boorstein e Teebor, 1988, Bjelland e Seeberg, 2003). Além da mutagenicidade, 5-HMdU pode ocasionar grande toxicidade as células, devido ao extenso reparo que leva a formação de quebras de fita do DNA (Mi, *et al.*, 1997). Os efeitos mutagênicos de 5-HMdU podem ser minimizados através de sua excisão, prevenindo o pareamento errôneo com A ou G. A primeira DNA glicosilase com atividade de excisão de 5-HMU foi detectada em células de ratos (Hollstein, *et al.*, 1984) e posteriormente, purificada de DNA de timo de bezerro (Cannon-Carlson, *et al.*, 1989). Esta enzima foi recentemente identificada em mamíferos e denominada de Smug1 (Boorstein, *et al.*, 2001). Também se observou em *E. coli*, que as enzimas NTH, Nei, FPG, Mug e AlkA possuem atividade de 5-HMU glicosilase (Bjelland e Seeberg, 2003). Além disto, observou-se que a enzima humana Mbd4 e a enzima presente em ratos Tdg possuem atividade de reparo em relação a 5-HMU (Liu, *et al.*, 2003).



Figura 1.18 Possíveis vias mutagênicas induzidas por 5-HMdU (A) e 5-FodU (B).

Outro produto formado na decomposição de 5-HPMdU é o aldeído 5-FodU, que foi primeiramente identificado por Kawai e colaboradores (Kasai, *et al.*, 1990). Neste estudo, 5-FodU foi detectado juntamente com 5-HMdU e 8-oxodGuo, sendo considerados os três mais abundantes produtos formados na irradiação de DNA com raios- $\gamma$  ou na exposição de DNA a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Fe<sup>2+</sup> (reação de Fenton). Posteriormente, foi demonstrado a formação de 5-FodU durante a fotossensibilização de DNA fita simples na presença de menadiona e luz UVA (Bjelland, *et al.*, 1995, Douki e Cadet, 1999). Experimentos mais quantitativos utilizando GC/MS mostraram que 5-FodU é o produto de oxidação de pirimidinas mais abundante gerado na irradiação do DNA com raios- $\gamma$  (Douki, *et al.*, 1996). Os efeitos maléficos da formação de 5-FodU incluem citoxicidade (inibição da timidilato sintetase e atraso na replicação) (Klungland, *et al.*, 2001) e mutagenicidade. A mutagenicidade de 5-FodU está relacionada ao pareamento com A, C, T e G, gerando as transversões T $\rightarrow$ G, T $\rightarrow$ A e a transição T $\rightarrow$ C (Figura 1.8.2) (Bjelland e Seeberg, 2003). Uma vez gerado, o aldeído 5-FodU pode ser reparado por glicosilases presentes em *E. coli* (NTH, Nei, FPG, Mug e AlkA) ou mamíferos (Smug1, Mbd4 e Tdg).

Portanto, a formação dos produtos mutagênicos 5-HMdU e 5-FodU, provenientes da decomposição do hidroperóxido de timidina 5-HPMdU, pode estar relacionada ao desenvolvimento de mutações e algumas doenças, como demência com corpos de Lewis (cérebro), carcinoma de células escamosas (pulmão), câncer de colon, câncer de mama, câncer de reto, diabetes mellitus e lupus (Cooke, *et al.*, 2003). Nestas patologias foi possível detectar os produtos mutagênicos 5-HMdU e 5-FodU, além de outra conhecida lesão oxidativa do DNA, a 8-oxodGuo.

**OBJETIVO** 

## 2 Objetivo

O objetivo geral do trabalho é demonstrar a geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), a partir do hidroperóxido de timina, 5-HPMU.

## 2.1 Estratégias

As estratégias utilizadas neste projeto foram sintetizar e purificar o hidroperóxido de timina, 5-HPMU; caracterizar 5-HPMU por HPLC/MS e RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC); detectar e quantificar o O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ou HOCl, através do monitoramento da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) e bimolecular na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm); detectar o O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou HOCl, através de captação química utilizando um derivado de antraceno (AVS); avaliar a estabilidade térmica de 5-HPMU em água; detectar por HPLC/MS os produtos formados na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou HOCl e analisar os danos oxidativos gerados durante a exposição de DNA plasmidial a 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> na ausência e presença de enzimas de reparo (FPG ou NTH).

MATERIAIS E MÉTODOS

## 3 Materiais e Métodos

### **3.1 Materiais**

Nitrato de cério(IV) amoniacal, cloreto de cobre(II) dihidratado, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, borohidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), formiato de amônio, paraformaldeído, iodeto de potássio, azida de sódio (NaN<sub>3</sub>), azul de metileno, resina Dowex<sup>®</sup> 50W, resina Chelex<sup>®</sup>, uracila, timina, hidroperóxido de cumeno (CuOOH), LB broth base e ágar foram adquiridos da Sigma (Missouri, Estados Unidos). Sulfato de ferro(II) heptahidratado, hidróxido de potássio, acetato de cádmio dihidratado, ácido sulfúrico, ácido fórmico, acetonitrila (grau HPLC) e metanol (grau HPLC) foram obtidos da Merck (Hunterdorn, Estados Unidos). Alaranjado de xilenol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % foram adquiridos junto a Synth (Diadema, Brasil) e Peróxidos do Brasil (Paraná, Brasil), respectivamente.

Os solventes deuterados, acetonitrila (ACN- $d_3$ ), dimetilsulfóxido (DMSO- $d_6$ ) e água (D<sub>2</sub>O) foram obtidos junto a Cambridge Isotope Laboratories (Massachusetts, Estados Unidos). A água ultrapura utilizada foi tratada pelo sistema de purificação da Water System Nanopure<sup>®</sup> da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos).

As colunas para HPLC, C-18 Gemini (250 de comprimento x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 μm de tamanho de partícula) e C-18(2) Luna (250 de comprimento x 5 mm de diâmetro interno, 5 μm de tamanho de partícula) foram obtidas da Phenomenex<sup>®</sup> (Califórnia, Estados Unidos).

Os filtros de seringa com membrana PTFE e 0,2  $\mu$ m de diâmetro interno foram obtidos junto a Millipore (Milles<sup>TM</sup>, LCR).

O Kit de extração de DNA plasmidial (NucleoBond<sup>®</sup>, modelo Maxi) foi adquirido da BD Biosciences (Nova Jersey, Estados Unidos). As enzimas de reparo FPG e NTH foram adquiridas da empresa New England Biolabs (Massachusetts, Estados Unidos).

O endoperóxido de DHPNO<sub>2</sub> foi sintetizado pela Dra. Graziella Eliza Ronsein, segundo o método descrito por Martinez e colaboradores (Martinez, *et al.*, 2000). O captador hidrossolúvel de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), AVS, foi sintetizado pelo Dr. Maurício César Bof de Oliveira, segundo o método descrito por Nardello e colaboradores (Nardello, *et al.*, 2005).

## **3.2 Equipamentos**

- Agitador Thermomixer<sup>®</sup> Confort da Eppendorf, modelo 5355 (Hamburgo, Alemanha).

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

- Centrífuga da Hitachi, modelo SCR 20B (Tóquio, Japão).

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

- Injetor manual da Reodyne<sup>®</sup> (Califórnia, Estados Unidos).

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

- pHmetro da Corning, modelo 320 (Nova Iorque, Estados Unidos).

- Sistema de HPLC da Shimadzu (Tóquio, Japão): 2 bombas LC-10ADVP, injetor automático SIL-10ADVP, detector de absorbância UV SPD-10AVVP, detector de fotodiodos SPDM-M10AVVP, controlador de sistema SCL-10AVP conectado a um computador e software CLASS-VP, versão 5.03.

- Sistema de espectrometria de massa (Micromass-Waters, Manchester, Reino Unido): espectrômetro de massa Quattro II com fonte API *Z-spray* e software MassLynx, versão 3.2.

Espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) modelos DRX500 e AC200 da
Bruker – Biopsin (Alemanha).

- Sistema de detecção de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do visível: o sistema é um contador de fótons, composto por um amplificador-discriminador e um tubo fotomultiplicador sensível na região do vermelho (9203 BM Thor EMI Electron Tubes), refrigerado termoeletricamente a -20 °C (FACT 50 MKII). O tubo fotomultiplicador foi submetido a um potencial de -1500 V e conectado a um amplificador (modelo 1121, Princeton Instruments), que transmite o sinal para o computador. Utilizou-se um filtro de corte (*cut-off filter*) (03FS006, Melles Griot Filters) entre a cubeta e o tubo fotomultiplicador, que permite a passagem de luz com comprimento de onda maior que 570 nm.

- Sistema de detecção de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo: o sistema consiste de uma fotomultiplicadora contendo um tubo fotomultiplicador sensível a região do IR-próximo (R5509, Hamamatsu Photoniks, Shizuoka, Japão). A fotomultiplicadora foi refrigerada a -80 °C utilizando nitrogênio líquido (S600 Photocool<sup>TM</sup>, PC176TSCE005 Cooler, Products for Research Inc., USA, Massachusetts, USA) e conectada a uma fonte de alta tensão a 160 V (High Voltage DC Power Supply Model C3360, Hamamatsu Photoniks, Shizuoka, Japão) e a um monocromador capaz de varrer as regiões do UV, visível e infravermelho-próximo (M300, Edinburgh Analytical Instruments, Reino Unido). Para o monitoramento da luz na região do IR-próximo foi utilizada uma grade de difração capaz de varrer entre 800 e 2700 nm. O sinal do detector foi registrado utilizando o software F-900, versão 6.22 (Edinburgh Analytical Instruments, Livingston, Reino Unido).

## 3.3 Síntese de 5-(hidroximetil)uracila

Uracila (1 g) e paraformaldeído (0,3 g) foram solubilizados em 23 ml de hidróxido de potássio 0,4 M. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo a 55 °C por 73 h. Após diluição com água (64 ml) e adição da resina Dowex<sup>®</sup>-50W, o pH da mistura foi mantido em 5 e a mistura reacional foi filtrada. A reação foi concentrada sob pressão reduzida, refrigerada por 2 dias, filtrada e obteve-se um precipitado branco. O produto 5-HMU foi obtido com 80 % de rendimento após recristalização com acetona:água (1:1, v/v).

## 3.4 Síntese de 5-(hidroperoximetil)uracila

5-(Hidroximetil)uracila foi solubilizado em 16,4 ml de  $H_2O_2$  35 % e lentamente foi adicionado 8,2 ml da solução  $H_2O_2$  35 %/HCl 37% (99:1, v/v). A reação foi mantida sob agitação e refluxo a 50 °C por 78 h. A mistura foi liofilizada e o produto recristalizado com uma solução aquosa de metanol 10 %. O rendimento de 5-HPMU foi de 60 %. Após a síntese, o produto 5-HPMU foi purificado por HPLC.

## 3.5 Purificação de 5-(hidroperoximetil)uracila por HPLC

O produto 5-HPMU foi purificado por HPLC utilizando uma coluna semi-preparativa C-18(2) Luna, Phenomenex<sup>®</sup> (250 de comprimento x 5 mm de diâmetro interno, 5 µm de tamanho de partícula). A purificação de 5-HPMU foi feita utilizando água (A) e metanol (B) como eluentes, a um fluxo de 1,5 ml/min. O produto foi monitorado em 260 nm. O gradiente utilizado foi de 10 % B até 17 min, 10 a 80 % B em 2 min, 80 % B até 25 min, retornando a 10 % em 2 min e mantendo em 10 % B até 35 min. 5-(Hidroperoximetil)uracila (tempo de eluição: 13 min) foi coletado em tubos de plástico, congelado com gelo seco, liofilizado e posteriormente

armazenado a -80 °C. Antes de cada experimento, 5-HPMU purificado foi solubilizado em  $D_2O$  e sua concentração foi medida pelo método de alaranjado de xilenol e iodometria, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.8.

## 3.6 Caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila por RMN

5-(Hidroperoximetil)uracila foi analisado por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY (Correlation Spectroscopy) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) em um espectrômetro de 500 MHz. Os espectros de RMN de 5-HPMU (Figuras A-1 a A-4) estão na seção Anexos.

#### 3.7 Quantificação de 5-(hidroperoximetil)uracila pelo método alaranjado de xilenol

A concentração de 5-HPMU foi medida pelo método alaranjado de xilenol utilizando, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % como padrão (Gay, *et al.*, 1999). A concentração da solução padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % foi medida através da absorção em 240 nm ( $\varepsilon$  = 43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> em água). As reações (volume final: 1 ml) foram realizadas adicionando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1-1 mM) ou 5-HPMU às soluções 5 mM de sulfato de ferro(II) heptahidratado (concentração final: 0,25 mM, preparada em ácido sulfúrico 0,25 M) e 2 mM de alaranjado de xilenol (concentração final: 0,10 mM, preparada em ácido sulfúrico 0,25 M). As reações foram mantidas à temperatura ambiente, protegidas da luz por 30 min e posteriormente analisadas em 560 nm.

## 3.8 Quantificação de 5-(hidroperoximetil)uracila pelo método iodometria

A concentração de 5-HPMU também foi medida pelo método de iodometria utilizando como padrão o hidroperóxido CuOOH, em diferentes concentrações (0,5-1,3 mM) (Buege, *et al.*, 1978). Utilizamos a solução de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v) (deaerada com nitrogênio gasoso por 15 min, mantida em gelo e retirada do gelo poucos minutos antes do uso), acetato de

cádmio 0,5 % e iodeto de potássio (1,2 g/ml). A concentração da solução padrão de CuOOH foi calculada utilizando o grau de pureza de 88 %, obtido por RMN (item 3.9). A solução de CuOOH ou 5-HPMU (100 μl) foi adicionada a tubos âmbar contendo 1 ml de ácido acético:clorofórmio (3:2, v/v) e 100 μl de iodeto de potássio 1,2 g/ml. A reação foi deaerada por alguns segundos com nitrogênio gasoso, agitada, protegida da luz e mantida à temperatura ambiente durante 5 min. Após 5 min, foi adicionado 3 ml de acetato de cádmio 0,5 % e a fase aquosa (superior) analisada em 353 nm.

## 3.9 Análise da pureza de hidroperóxido de cumeno

A análise da pureza de CuOOH foi feita por RMN de <sup>1</sup>H em um espectrômetro AC 200 da Bruker, utilizando ACN como padrão interno. Solubilizamos CuOOH em ACN (4,9 mg/3,3 mg de ACN; 2,1 mg/3 mg de ACN e 3,9 mg/2,3 mg de ACN).

## 3.10 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e Ce<sup>4+</sup> ou ácido hipocloroso

A análise de 5-HPMU e dos produtos formados nas reações com Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ce<sup>4+</sup> e HOCl foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa, no modo de ionização *electrospray* positivo (HPLC/MS). O sistema HPLC/MS consiste de um HPLC Shimadzu (Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa Quattro II com fonte de ionização a pressão atmosférica *Z-spray* (Micromass-Waters, Altricham, Reino Unido). As análises por HPLC/MS foram feitas utilizando temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem do cone de amostragem e extrator de 20 V e 5 V, respectivamente. Os dados foram adquiridos no modo *full scan*, no qual se monitorou a faixa de 100-300 *m/z*. Nos experimentos de monitoramento de íons fragmento foram utilizadas as seguintes voltagens de cone de amostragem e energia de colisão, respectivamente: 10 V, 10 eV para 5-HPMU, 20 V, 10 eV para 5-HMU e 20 V, 20 eV para 5-FoU. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna C-18 Gemini, Phenomenex<sup>®</sup> (250 de comprimento x 4.6 mm de diâmetro interno, 5  $\mu$ m de tamanho de partícula). Utilizou-se como eluentes ácido fórmico 0,1% (A) e metanol (B), a um fluxo de 0,6 ml/min. O solvente B foi mantido em 3 % até 17 min, variando de 3 a 10 % em 3 min, de 10 a 50 % em 5 min e retornando a 3 % em 2 min. O fluxo direcionado para o espectrômetro de massa foi de 0,13 ml/min. O detector foi mantido em 260 nm. As reações de 5-HPMU (concentração final: 1 mM) e Ce<sup>4+</sup> (0,5; 1; 2 e 5 mM) foram mantidas sob agitação durante 10 min a 37°C. Já as reações de 5-HPMU (concentração final: 1 mM) e HOCl (0,5; 1; 2 e 5 mM) foram feitas em pH 7,4 (tampão fosfato de sódio 15 mM) e mantidas sob agitação durante 10 min a 37°C.

## 3.11 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>

Os produtos formados na reação de 5-HPMU e  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  foram analisados por HPLC/MS. As reações de 5-HPMU (concentração final: 1 mM) e  $Fe^{2+}$  (0,3; 0,5 e 1 mM) ou  $Cu^{2+}$ (10; 20 e 30 mM) foram feitas em pH 7,4 (tampão fosfato de sódio 15 mM) e mantidas durante 10 min a 37°C sob agitação. As análises por HPLC/MS foram feitas utilizando temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem do cone de amostragem e extrator de 20 V e 5 V, respectivamente. Ácido fórmico 0,1 % (A) e metanol (B) foram utilizados como fase móvel, a um fluxo de 0,6 ml/min. O solvente B foi mantido em 3 % até 17 min, variando de 3 a 10 % em 3 min, de 10 a 50 % em 5 min e retornando a 3 % em 2 min. O fluxo direcionado para o espectrômetro de massa foi de 0,12 ml/min.

## 3.12 Decomposição de 5-(hidroperoximetil)uracila na presença de borohidreto de sódio

A reação de 1 mM de 5-HPMU e 1 mM de NaBH<sub>4</sub> foi mantida por 1 h em gelo e com agitação a cada 15 min. O controle 5-HPMU (1 mM) também foi mantido no gelo por 1 h. Após o término da incubação, 900 µl de água foram adicionados a 100 µL da reação 5-HPMU/NaBH<sub>4</sub> (concentração final de 5-HPMU: 0,1 mM). A mesma diluição foi feita para a solução de 5-HPMU. Alíquotas de 30 µL da solução diluída de 5-HPMU e da reação 5-HPMU/NaBH<sub>4</sub> foram analisadas por HPLC/MS. As condições de ionização foram citadas no item 3.10. Ácido fórmico 0,1 % (A) e metanol (B) foram utilizados como fase móvel, a um fluxo de 0,6 ml/min. O gradiente usado foi de 10 % B até 10 min, 10 a 50 % B em 1 min, 50 % B até 15 min, 50 a 10 % B em 1 min e 10 % até 20 min. O fluxo direcionado para o espectrômetro de massa foi de 0,12 ml/min.

## 3.13 Decomposição térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila

Com a finalidade de avaliar a estabilidade térmica de 5-HPMU, a solução 3 mM de 5-HPMU foi incubada em solução aquosa durante 292 h em diferentes temperaturas (4, 25, 37 e 50 °C). A concentração de 5-HPMU nas incubações foi medida pelo método alaranjado de xilenol e o valor corrigido por 1,7. Alíquotas das incubações foram analisadas por HPLC/MS. As análises foram feitas utilizando temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, voltagem do capilar de 3,5 kV, voltagem do cone de amostragem e extrator de 20 V e 5 V, respectivamente. Ácido fórmico 0,1 % (A) e metanol (B) foram utilizados como fase móvel, a um fluxo de 0,6 ml/min. O gradiente usado foi de 10 % B até 10 min, 10 a 50 % B em 1 min, 50 % B até 15 min, 50 a 10 % B em 1 min e 10 % até 20 min. O fluxo direcionado para o espectrômetro de massa foi de 0,12 ml/min. Os resultados representam a média  $\pm$  SEM de três determinações diferentes.

## 3.14 Medidas de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo

A emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) foi monitorada por meio de uma fotomultiplicadora contendo um tubo fotomultiplicador sensível a região do IR-próximo (R5509, Hamamatsu Photoniks, Shizuoka, Japão). Antes de iniciar os experimentos, o detector foi resfriado a -80 °C com nitrogênio líquido durante 2 h. As reações foram feitas em uma cubeta de quartzo (1 x 1 cm). Os experimentos foram feitos injetando continuamente Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou HOCl a um fluxo de 0,50 ml/min, em uma cubeta contendo os demais reagentes. Para a injeção da solução de Ce<sup>4+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> ou HOCl foi utilizada uma bomba de injeção para seringas (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, Massachusetts, Estados Unidos). As reações foram mantidas sob constante agitação por meio de uma microbarra magnética, inserida dentro da cubeta.

A luz emitida foi monitorada durante a reação de 1,8 mM de 5-HPMU e concentrações crescentes de Ce<sup>4+</sup> ou HOCl (concentração final: 0,1-10 mM). Na reação com Ce<sup>4+</sup>, 1,3 ml de uma solução 2 mM de 5-HPMU preparada em D<sub>2</sub>O foram colocados na cubeta e injetados 200  $\mu$ l da solução de Ce<sup>4+</sup> em D<sub>2</sub>O (concentração final: 0,1; 0,5; 1; 2; 5; e 10 mM).

Para a reação com HOCl, 1,3 ml de uma solução 2 mM de 5-HPMU em tampão fosfato de sódio (15 mM, pH 7,4, preparado em  $D_2O$ ) foram adicionados na cubeta e 200 µl de cada solução

de HOCl em NaOH (10 mM, preparada em D<sub>2</sub>O) (concentração final: 0,1; 0,5; 1; 2; 5; e 10 mM) foram injetados. A solução de HOCl utilizada foi destilada (item 3.20) e a concentração medida através da absorbância em 292 nm ( $\epsilon$  = 350 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> em NaOH 10 mM). As reações de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCl foram feitas em triplicata.

A reação de 10 mM de 5-HPMU (em ACN- $d_3$ ) e Fe<sup>2+</sup> (concentração final: 10 e 20 mM em D<sub>2</sub>O) foi feita em uma mistura de D<sub>2</sub>O e ACN- $d_3$  (1:1, v/v). A solução de Fe<sup>2+</sup> foi injetada manualmente na cubeta.

O monitoramento da luz emitida na reação de 1,8 mM de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  ou HOCl (concentração final: 5 mM) foi realizado na presença de NaN<sub>3</sub> (1 e 10 mM) ou substituindo D<sub>2</sub>O pela mistura D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (35:65, v/v).

A reação de 2 mM de  $Ce^{4+}$  ou HOCl com 2 mM de 5-HMU, timina, uracila ou  $H_2O_2$  foram realizadas em  $D_2O$ .

## 3.15 Medidas de emissão de luz bimolecular de oxigênio molecular singlete na região do visível

A emissão de luz bimolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm) foi monitorada através de um contador de fótons constituído de um tubo fotomultiplicador sensível na região do vermelho e um amplificador-discriminador. Utilizamos um filtro de corte ( $\lambda > 570$ nm), que foi colocado entre a cubeta e o tubo fotomultiplicador. O tubo fotomultiplicador foi refrigerado termoeletricamente a -20 °C. Os experimentos foram realizados injetando manualmente as soluções de Ce<sup>4+</sup> ou HOC1.

A emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) foi gerada na injeção de 100 µl de uma solução 50 mM de Ce<sup>4+</sup> (preparado em D<sub>2</sub>O) em uma cubeta contendo 900 µl de uma solução 2 mM de 5 -HPMU (em D<sub>2</sub>O). Na reação com HOCl, foram injetados 125  $\mu$ l de 40 mM de HOCl (em 10 mM de NaOH, preparado em D<sub>2</sub>O) em 875  $\mu$ l de uma solução 2,1 mM de 5-HPMU em tampão fosfato de sódio 15 mM (pH 7,4 preparado em D<sub>2</sub>O).

A detecção da emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) gerada nas reações de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  ou HOCl também foi feita na presença de NaN<sub>3</sub> (1 ou 10 mM) ou substituindo D<sub>2</sub>O pela mistura D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (35:65, v/v). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e com agitação.

O monitoramento da emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzida na reação de 2 mM de Ce<sup>4+</sup> ou HOCl e 2 mM de 5-HMU, timina, uracila ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada em D<sub>2</sub>O.

## 3.16 Espectro de emissão de luz monomolecular de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo

O espectro de emissão de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  na região do IR-próximo foi medido por meio de uma fotomultiplicadora contendo um tubo fotomultiplicador sensível a região do IR-próximo (R5509, Hamamatsu Photoniks, Shizuoka, Japão). Para a obtenção do espectro de emissão de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$ foram feitas quinze varreduras (*scans*) de 1200 a 1350 nm. As reações foram feitas através da injeção de uma solução 2 mM de Ce<sup>4+</sup> ou HOC1 em uma cubeta contendo 5-HPMU (concentração final: 3,5 mM). As reações foram mantidas sob agitação e as soluções de Ce<sup>4+</sup> e HOC1 foram injetadas continuamente, a um fluxo de 0,50 ml/min. Como padrão para geração de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$ , utilizamos (i) a reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração final: 2 mM) e HOC1 (concentração final: 4 mM) durante 4000 s (Figura A-5, Anexos). Para a decomposição de DHPNO<sub>2</sub>, utilizamos um sistema de aquecimento, constituído de um banho de água termostatizado conectado a uma cubeta. As concentrações de  $H_2O_2$  e HOCl foram determinadas, respectivamente, através da medida da absorbância em 240 nm ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em  $H_2O$ ) e 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  em NaOH 10 mM).

## 3.17 Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete

O rendimento de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foi calculado utilizando como padrão o endoperóxido hidrossolúvel DHPNO<sub>2</sub> (Figura A-5, Anexos). A termodecomposição de DHPNO<sub>2</sub> a 37 °C gera O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com rendimento de 59 %, ( $k = 5,02 \times 10^{4} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) (Pierlot, *et al.*, 2000). A emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo foi monitorada por 4000 s durante a decomposição de DHPNO<sub>2</sub> (concentração final: 21 mM, em D<sub>2</sub>O). O cálculo do rendimento de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foi feito comparando-se o valor da integração da luz produzida na reação de 1 mM de 5-HPMU e 10 mM de Ce<sup>4+</sup> ou HOCl com o valor da integração da luz gerada na decomposição de DHPNO<sub>2</sub>. O rendimento foi calculado considerando que são necessárias duas moléculas de 5-HPMU para gerar uma molécula de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ).

## 3.18 Captação química de oxigênio molecular singlete utilizando 9,10divinilsulfonatoantraceno

A geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) nas reações de 5-HPMU e HOCl, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> foi monitorada através da captação química de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) utilizando AVS (Nardello, et al., 2005). A reação de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) e AVS gera o endoperóxido AVSO<sub>2</sub>, que pode ser detectado por HPLC/MS/MS, no modo de ionização *electrospray* negativo.

A reação de 8,8 mM de 5-HPMU (em  $D_2O$ ), 5 mM de HOCl (em NaOH 10 mM preparado em  $D_2O$ ) e 8 mM de AVS (em  $D_2O$ ) foi mantida sob agitação, aquecimento (37 °C) e

protegida da luz durante 1 h. 5-(Hidroperoximetil)uracila também foi incubado com Fe<sup>2+</sup> (1 mM) ou Cu<sup>2+</sup> (1 mM) na presença de AVS (8 mM). As reações de 5-HPMU e metais foram feitas em D<sub>2</sub>O, mantidas sob agitação a 37 °C e protegidas da luz durante 24 h. Todos os experimentos foram feitos em tampão fosfafo de sódio 15 mM (pH 7,4) preparado em D<sub>2</sub>O. Após o fim de cada incubação, alíquotas de 25 µl foram analisadas por HPLC/MS/MS. A detecção do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi feita utilizando o método de detecção MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), no qual se pode monitorar a perda de uma molécula de oxigênio do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> (*m*/*z* 210  $\rightarrow$  194). No modo de detecção MRM, foi selecionado no primeiro analisador de massa (Q1) o íon com *m*/*z* 210, que corresponde à molécula de AVSO<sub>2</sub>. Posteriormente, o íon com *m*/*z* 210 foi direcionado para a câmara de colisão (Q2), fragmentado e os íons fragmento analisados no segundo analisador de massa (Q3).

A análise cromatográfica das amostras foi feita utilizando uma coluna C-18 Gemini, Phenomenex<sup>®</sup>, (250 de comprimento x 4.6 mm de diâmetro interno, 5 μm de tamanho de partícula). A fase móvel foi formiato de amônio 25 mM (A) e ACN/MeOH (7:3, v/v) (B). Utilizamos um fluxo de 0,8 ml/min e 0,14 ml/min foi direcionado para o espectrômetro de massa. Os compostos foram eluídos mantendo 18 % B por 30 min, aumentando de 18 a 65 % B por 2 min, mantendo 65 % B até 37 min, retornando a 18 % B em 2 min e mantendo em 65 % B até 45 min. As condições de ionização foram voltagem do capilar de 4,5 kV, voltagem do cone de amostragem de 10 V, voltagem do cone extrator de 4 V, energia de colisão de 10 eV, temperatura da fonte e de dessolvatação de 100 e 200 °C, respectivamente.

## 3.19 Síntese do endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno

A síntese do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi realizada por meio da fotossensibilização do captador químico de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), AVS. Em um balão volumétrico de 10 ml, adicionamos 25,5 mg de AVS e 8µl de uma solução 0,1 M de azul de metileno (em etanol) em 4 ml de D<sub>2</sub>O. O balão volumétrico foi mantido parcialmente imerso em um banho de gelo/água (4 °C) e irradiado por 2,5 h (150 min) utilizando duas lâmpadas de tungstênio (500 W). Durante a fotossensibilização, alíquotas da reação foram retiradas em diferentes tempos (0, 45, 90 e 150 min), diluídas (10 µl em 500 µl de água) e analisadas por HPLC/MS/MS (30 µl injetados). As condições de ionização e fragmentação do AVSO<sub>2</sub> foram descritas no item 3.19.

A formação de AVSO<sub>2</sub> foi monitoranda em 215 nm. Após 2,5 h, adicionamos aproximadamente 3 g de resina Chelex<sup>®</sup> para retirar o azul de metileno, agitamos manualmente e deixamos a reação em repouso por 10 min. Posteriormente, a reação foi filtrada utilizando filtro de seringa com membrana PTFE e 0,2  $\mu$ m de diâmetro interno. O endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi purificado por HPLC utilizando um fluxo de 2 ml/min e os eluentes: formiato de amônio 25 mM (A) e ACN/MeOH (7:3, v/v) (B). O gradiente utilizado foi de 18 % B até 30 min, 65 % B em 1 min, 65 % B até 41 min, 18 % B em 1 min e 18 % B até 50 min. AVSO<sub>2</sub> purificado foi solubilizado em água e utilizado como padrão.

#### 3.20 Destilação de ácido hipocloroso

A solução de HOCl utilizada nos experimentos foi preparada a partir de uma solução comercial de HOCl (Candura). Como a Candura possui água em sua composição, decidimos fazer uma destilação a vácuo para obtermos uma solução concentrada de HOCl. Aproximadamente 250 ml de Candura foram acidificados com 5 ml de ácido fosfórico 85 % até

pH 6 e destilados com temperatura entre 35 e 40 °C. A solução de HOCl destilada, com coloração amarelada, foi coletada e resfriada rapidamente (banho de gelo seco e etanol) para evitar a decomposição. A concentração de HOCl foi determinada por espectrofotometria em 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) diluindo-se em NaOH 10 mM (Morris, 1966). A solução de HOCl destilada foi estocada a -80 °C.

## 3.21 Experimentos envolvendo DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu<sup>2+</sup>

## 3.21.1 Competência bacteriana

Meios:

Meio LB sólido: peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5 %, ágar 1,5 %, pH 7,5 Meio LB líquido: peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 0,5 %, pH 7,5 Meio GYT: extrato de levedura 0,125 %, triptona 0,25 %, glicerol 10 % Meio SOC: bactotriptona 2 %, extrato de levedura 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6,8

Bactérias *E. coli* (cepa DH10B, estocadas em glicerol a -80 °C) foram estriadas em placa de Petri com meio LB sólido contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e incubadas a 37 °C por 20 h.

Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 20 ml de meio LB líquido e mantida a 37 °C por 16 h sob agitação a 200 rpm. Após o crescimento, 5 ml da cultura foram adicionados em 500 ml de meio LB líquido e mantidos novamente a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) até atingir a densidade ótica entre 0,6 e 0,8 em 600 nm (aproximadamente 3 h). A cultura bacteriana foi centrifugada por 15 min a 5000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso cuidadosamente em 125 ml de glicerol 10 % estéril e gelado. Este procedimento foi

repetido mais duas vezes. O precipitado final foi ressuspenso em 1 ml de meio GYT e distribuído em criotubos resfriados rapidamente com nitrogênio líquido e estocados a -80 °C.

Todos os experimentos com bactérias foram feitos utilizando materiais autoclavados (tubos, frascos, ponteiras, placas de Petri, meios de cultura) e estéreis (capela de fluxo laminar).

### 3.21.2 Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes foram descongeladas no gelo e distribuídas em alíquotas de 50 µl. A cada alíquota de bactéria competente foram adicionados 5 ng de DNA plasmidial pBluescript (pBR322) 1 ng/µl e incubado por 30 min a 4 °C. Posteriormente, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 37 °C por exatamente 2 min e transferidas imediatamente para o gelo. Após 5 min, foram adicionados 450 µl de meio SOC a cada alíquota e incubou-se por 1 h a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) (Hanahan, 1983). As bactérias (200 µl) foram plaqueadas com uma alça de platina estéril em placas de Petri com meio LB, contendo 15 g/l de ágar e 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C por 20 h.

## 3.21.3 Extração de DNA plasmidial

Meios:

Meio LB líquido: 10 g de LB Broth Base em 500 ml de água

Meio LB sólido: 1 g de LB Broth Base, 0,75 g ágar em 50 ml de água

Uma colônia de bactérias transformadas foi descongelada em gelo e aplicada em uma placa de Petri com 25 ml de meio LB sólido e 25 µl de ampicilina 60 mg/ml. A placa de Petri foi mantida com a base voltada para baixo em uma estufa a 37 °C por uma noite. Utilizando um alça de platina, raspamos uma colônia de bactéria transformada e mergulhamos em um frasco de 100

ml, contendo 5 ml de meio LB líquido e 5 µl de ampicilina 60 mg/ml. A incubação foi mantida a 37 °C sob agitação (200 rpm) até adquirir uma coloração turva (aproximadamente 12 h). A seguir, 500 µl da incubação foram transferidos para um frasco de 1 l contendo 250 ml de meio LB líquido e 250 µl de ampicilina (60 mg/ml) e mantida de 12-16 h sob agitação (200 rpm) a 37 °C.

Para extrair o DNA plasmidial, utilizamos o cartucho AX500 (Maxi) e o protocolo de extração do kit NucleoBond<sup>®</sup> (Nova Jersey, Estados Unidos), mas preparamos os tampões extração (S1, S2, S3, N2, N3 e N5), conforme o kit.

Após a extração, o DNA plasmidial foi gentilmente ressuspenso em 400 µl de água estéril e verificou-se a pureza e a concentração da solução. A concentração da solução de DNA foi medida utilizando a equação abaixo:

$$C = A_{260} \times 50 \times diluição$$

Onde C é a concentração de DNA fita dupla em  $\mu$ g/ml e A<sub>260</sub> é a absorbância em 260 nm (Maxam e Gilbert, 1980). A pureza da solução de DNA plasmidial foi conferida através da técnica de eletroforese em gel de agarose e do valor da relação A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (até 1,8). Após medirmos a concentração da solução de DNA plasmidial, diluímos a solução (concentração final: 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l), aliquotamos em microtubos e armazemos a -20 °C.

#### 3.21.4 Eletroforese em gel de agarose

Tampões:

Tampão de amostra: 20% de Ficoll tipo 400 e 0,25 % de azul de bromofenol

Tampão TBE: Tris 90 mM (108 g), ácido bórico 90 mM (55 g), EDTA 2 mM (7,4 g), pH 8

A técnica eletroforese em gel de agarose possibilita a separação das três diferentes formas do DNA plasmidial: forma nativa ou superenovelada (SC), forma circular aberta (OC) resultante de quebra de fita simples e forma linear (L) resultante de quebra de fita dupla. As diferentes formas do DNA plasmidial são submetidas a uma diferença de potencial. Como a molécula do DNA possui carga líquida negativa, a molécula irá migrar do pólo negativo para o positivo. Todas as reações (50 µl) foram feitas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (concentração final: 30 mM) e mantidas a 37 °C por 1 h sob agitação (1000 rpm). Ao término de cada reação, foi adicionado 5 µl de 1,6 mM de batocuproína (concentração final: 0,14 mM). Posteriormente, 10 µl de cada incubação foram gentilmente misturados a 5 µl de tampão de amostra. A separação das três formas do DNA plasmidial foi feita aplicando-se 12 µl da mistura DNA e tampão de amostra em um gel de agarose 1 %, preparado em 50 ml de tampão TBE diluído (tris 4,5 mM, ácido bórico 4,5 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8) contendo 15 µl de brometo de etídeo 1 mg/ml. A eletroforese foi feita utilizando 70 V de diferença de potencial.

Após a eletroforese, as bandas correspondentes as diferentes formas do DNA plasmidial foram visualizadas por meio da fluorescência do brometo de etídeo na região do UV ( $\lambda = 320$  nm). O gel foi fotografado e digitalizado para posterior análise. Os cálculos das porcentagens de SC, OC e L foram feitos através das intensidades relativas de fluorescência de cada forma. O fator de correção de 1,4 foi aplicado ao valor de intensidade relativa da forma SC, com o objetivo de corrigir a menor emissão de fluorescência da forma SC (Lloyd, *et al.*, 1978).

# 3.21.5 Incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu<sup>2+</sup> na presença e ausência de metais contaminantes

Para avaliar o efeito dos metais contaminantes ( $Fe^{2+} e Cu^{2+}$ ) na geração das formas de OC e L, fizemos a incubação de pBR322, 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> utilizando solventes não tratados (sem Chelex<sup>®</sup>) e tratados por 24 h com resina Chelex<sup>®</sup> (com Chelex<sup>®</sup>). Utilizamos como solventes água e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 (concentração final: 30 mM). A incubação de pBR322 (3 µl de pBR322 0,2 µg/µl), 5-HPMU (concentração final: 0,5 e 1 mM) e Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10 µM) foi mantida a 37 °C sob agitação (1000 rpm) por 1 h. Os controles DNA (3 µl de pBR322 0,2 µg/µl), DNA e Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10 µM), DNA e 5-HPMU (concentração final: 0,5 e 1 mM) também foram incubados por 1 h a 37 °C com agitação. Em seguida, adicionou-se batocuproína 1,6 mM (concentração final: 0,14 mM) para interromper a reação. Posteriormente, misturou-se 10 µl da incubação com 5 µl de tampão de amostra e aplicou-se 12 µl no gel de agarose. A eletroforese de gel de agarose foi submetida a 70 V de diferença de potencial durante 1,5 h.

# 3.21.6 Incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu<sup>2+</sup> em diferentes concentrações

Todas as reações e controles foram feitos utilizando água e tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 tratados por 24 h com resina Chelex<sup>®</sup>. A incubação de pBR322 (3 µl de pBR322 0,2  $\mu g/\mu l$ ), 5-HPMU (concentração final: 10  $\mu$ M) e Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10 e 100  $\mu$ M) foi mantida a 37 °C sob agitação (1000 rpm) por 1 h. Os controles DNA (3 µl de pBR322 0,2  $\mu g/\mu l$ ), DNA e 5-HPMU (concentração final: 10  $\mu$ M), DNA e Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10 e 100  $\mu$ M) foram submetidos as mesmas condições da reação completa (DNA, Cu<sup>2</sup> e 5-HPMU). Após adição

de batocuproína (concentração final: 0,14 mM), 12 µl da mistura incubação e tampão de amostra foi aplicado no gel de agarose 1 % e o mesmo submetido a 70 V por 1,5 h. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA.

# 3.21.7 Incubação de DNA plasmidial, Cu<sup>2+</sup> e 5-(hidroperoximetil)uracila em diferentes concentrações

Como descrito anteriormente, utilizamos água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 tratados por 24 h com resina Chelex<sup>®</sup>. Três microlitros de DNA plasmidial (0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) foram adicionados a uma solução de Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10  $\mu$ M) e 5-HPMU (concentração final: 1, 10 e 25  $\mu$ M). A reação foi mantida sob agitação por 1 h a 37 °C. Os controles (DNA, DNA e Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M, DNA e 5-HPMU 1, 10 e 25  $\mu$ M) foram mantidos sob as mesmas condições da reação completa (DNA, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU). A reação foi interrompida com batocuproína (concentração final: 0,14 mM) e aplicado 12  $\mu$ l no gel de agarose 1 %. As formas do DNA plasmidial foram separadas durante 1,5 h utilizando 70 V de diferença de potencial. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA.

# 3.21.8 Incubação de DNA plasmidial, Cu<sup>2+</sup> e 5-(hidroperoximetil)uracila na presença das enzimas de reparo formamidopirimidina-DNA-glicosilase e endonuclease III

Nas reações com pBR322 utilizamos água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 (concentração final: 30 mM) tratados com resina Chelex<sup>®</sup> (24 h). As enzimas de reparo FPG e NTH foram preparadas utilizando os respectivos tampões de cada enzima, que vieram em seus kits. Poucos minutos antes do uso, 1  $\mu$ l de FPG (8.000 U/ml) foi diluído em 49  $\mu$ l de tampão FPG e FPG:glicerol (1:1, v/v) e 1  $\mu$ l de NTH (10.000 U/ml) foi diluído em 49  $\mu$ l de tampão FPG ou

NTH:glicerol (1:1, v/v). Em seguida, 2  $\mu$ l de FPG ou NTH diluída em tampão e glicerol foram adicionados a 40  $\mu$ l de tampão FPG ou NTH, 4  $\mu$ l de BSA 100  $\mu$ g/ml e 154  $\mu$ l de água. A mistura final foi mantida em gelo para ser usada após o final da incubação DNA+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU.

A incubação (150 µ1) de pBR322 (9 µ1 de pBR322 0,2 µg/µ1), Cu<sup>2+</sup> (concentração final: 10 µM) e 5-HPMU (concentração final: 10, 25 µM) foi mantida a 37 °C sob agitação (1000 rpm) por 1 h. Ao final da incubação, adicionamos 10 µ1 de batocuproína 1,6 mM. Em seguida, adicionamos 10 µ1 da reação DNA, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU (10 ou 25 µM) a 10 µ1 da mistura final 1 µ1 de FPG ou NTH. A reação DNA, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU (10 ou 25 µM) na presença de FPG ou NTH foi mantida a 37 °C sob agitação (1000 rpm) por 0,5 h. Em seguida, colocamos a incubação em gelo para diminuir a atividade de reparo das enzimas FPG e NTH. Os controles DNA, DNA e Cu<sup>2+</sup>, DNA e 5-HPMU 10 e 25 µM na ausência e na presença de FPG ou NTH também foram feitos como a reação completa. A reação DNA, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU (10 ou 25 µM) na ausência de FPG ou NTH foi realizada e analisada como a reação na presença de FPG ou NTH. Após a incubação com FPG ou NTH, 15 µ1 de cada reação foram misturados a 5 µ1 de tampão de amostra e aplicados no gel de agarose (15 µ1). Preparamos um gel de agarose 1% (200 m1) contendo 60 µ1 de brometo de etídeo 1 mg/m1 em tampão TBE diluído. A eletroforese foi realizada aplicando-se 140 V durante aproximadamente 2 h. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA.

RESULTADOS

## **4 Resultados**

## 4.1 Síntese e detecção por HPLC/MS de 5-(hidroximetil)uracila

A síntese do álcool 5-HMU foi realizada partir de uracila e paraformaldeído em meio básico com algumas modificações, segundo procedimento descrito por Cline e colaboradores (Cline, *et al.*, 1959). Decidimos sintetizar 5-HMU a partir de uracila e paraformaldeído devido à baixa complexidade e alto rendimento da síntese. O produto 5-HMU foi obtido com rendimento de 80 %, após recristalização com acetona:água (1:1, v/v). A síntese de 5-HMU foi confirmada por HPLC/MS (Figura 4.1). A figura abaixo mostra o cromatograma de UV em 260 nm (Figura 4.1A) e o espectro de massa de uma solução 0,1 mM de 5-HMU (Figura 4.1B). O espectro de massa obtido em 9,75 min possui um íon majoritário com *m/z* 143, que corresponde ao íon molecular ([5-HMU+H]<sup>+</sup>) e um íon minoritário com *m/z* 125, que representa a molécula desidratada de 5-HMU ([(5-HMU-H<sub>2</sub>O)+H]<sup>+</sup>) (Figura 4.1B).



**Figura 4.1** Análise de 5-HMU por HPLC/MS. Cromatograma de UV em 260 nm (A) e espectro de massa obtido em 9,75 min (B).

## 4.2 Síntese e detecção por HPLC/MS de 5-(hidroperoximetil)uracila

A síntese do peróxido de timina, 5-HPMU, foi feita a partir do álcool 5-HMU na presença de  $H_2O_2$  15% e HCl 37 %, segundo Hahn e Wang (Hahn e Wang, 1976). Após a síntese, 5-HPMU foi purificado por HPLC, solubilizado em  $D_2O$  e sua concentração medida pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria. A geração de 5-HPMU foi confirmada por análises de HPLC/MS (Figura 4.2) e RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC) (Figuras A-1 a A-4, Anexos). A análise de 5-HPMU por HPLC/MS mostra um cromatograma de UV em 260 nm (Figura 4.2A) com um intenso pico de produto em 10,88 min e outros dois picos minoritários em 9,13 e 11,77 min. 5-(Hidroperoximetil)uracila (10,88 min) foi identificado através do íon molecular com m/z 159 ([5-HPMU+H]<sup>+</sup>) e do íon fragmento com m/z 125 correspondente à perda de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([(5-HPMU-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)+H]<sup>+</sup>) (Figura 4.2C). Os produtos de decomposição de 5-HPMU, 5-HMU (Figura 4.2B) e 5-FoU (Figura 4.2D) também foram detectados, embora em quantidade minoritária. 5-(Hidroximetil)uracila (9,13 min) foi detectado por meio do íon molecular com m/z 143 ([5-HMU+H]<sup>+</sup>) e do íon correspondente à perda de uma molécula de água com m/z 125 {[(5-HMU-H<sub>2</sub>O)+H]<sup>+</sup>} (Figura 4.2B). O aldeído 5-FoU (11,7 min) foi identificado através do íon molecular com m/z 141 ([5-FoU+H]<sup>+</sup>) (Figura 4.2D).



**Figura 4.2** Análise de 5-HPMU por HPLC/MS. Cromatograma de UV em 260 nm de 5-HPMU (A), espectro de massa de 5-HMU obtido em 9,13 min (B), de 5-HPMU em 10,88 min (C) e de 5-FoU em 11,77 min (D).

## 4.3 Caracterização estrutural de 5-(hidroperoximetil)uracila por RMN

Os espectros de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC do produto 5-HPMU estão descritos detalhadamente na seção Anexos (Figuras A-1 a A-4).

## 4.4 Análise do produto de decomposição de 5-(hidroperoximetil)uracila na presença de borohidreto de sódio

Sendo NaBH<sub>4</sub> um forte agente redutor, a reação desta molécula com o peróxido 5-HPMU pode gerar como produto o álcool 5-HMU. A formação de 5-HMU, gerado na reação de 5-HPMU e NaBH<sub>4</sub>, foi confirmada por HPLC/MS (Figura 4.3). A molécula de 5-HMU foi detectada através do íon-aduto com sódio (m/z 165, [5-HMU+Na]<sup>+</sup>) e com acetonitrila (m/z 206, [5-HMU+ACN+Na]<sup>+</sup>) (Figura 4.3C). O cromatograma de UV em 260 nm da solução controle de 5-HPMU (Figura 4.3A) possui exclusivamente um pico de absorção em 7,54 min, que corresponde ao peróxido 5-HPMU. Já na análise da reação de 5-HPMU e NaBH<sub>4</sub> (Figura 4.3B) é possível observar a redução de 5-HPMU a 5-HMU, através do desaparecimento do pico de absorção em 7,54 min (5-HPMU) e do aparecimento de um pico de absorção em 6,28 min (5-HMU).



**Figura 4.3** Análise por HPLC/MS do produto de decomposição de 5-HPMU na presença de NaBH<sub>4</sub>. Cromatograma de UV em 260 nm da solução 5-HPMU (A), da reação de 5-HMPU e NaBH<sub>4</sub> (B) e espectro de massa obtido em 6,28 min (C).

Nesta análise utilizamos um gradiente de eluição diferente (item 3.12, Materiais e Métodos) do utilizado na detecção de 5-HPMU (item 3.10, Materiais e Métodos). Por isto, os tempos de retenção de 5-HMU e 5-HPMU foram inferiores aos obtidos na análise de 5-HMU (Figura 4.1) e 5-HPMU (Figura 4.2).

## 4.5 Avaliação da estabilidade térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila

Tendo em vista que hidroperóxidos orgânicos podem decompor em seus respectivos alcoóis, decidimos avaliar a estabilidade térmica de 5-HPMU (concentração inicial: 3 mM), durante 292 h (12 dias) em água e diferentes temperaturas (4, 25, 37 e 50 °C), (Figura 4.4). A concentração de 5-HPMU foi medida pelo método alaranjado de xilenol e corrigida pelo valor numérico de 1,7. Até 8 h de incubação (Figura 4.4B), observa-se que 5-HPMU é estável nas diferentes temperaturas (4, 25, 37 e 50 °C). Após 8 h de incubação (Figuras 4.4A e 4.4B), ocorre a decomposição expressiva de 5-HPMU a 37 e 50 °C e em 4 e 25 °C , a decomposição de 5-HPMU é mais lenta. A figura abaixo representa o perfil de decomposição de 5-HPMU em 4, 25, 37 e 50 °C até 292 h (Figura 4.4A) e 24 h (Figura 4.4B).



**Figura 4.4** Decomposição de 5-HPMU (3 mM) em diferentes temperaturas no decorrer do tempo. Concentração de 5-HPMU remanescente após incubação em 4°C, 25 °C, 37 °C e 50 °C até 292 h (A) e até 24 h (B).

Após 292 h de incubação, a análise por HPLC/MS do produto de decomposição de 5-HPMU em 37 °C (Figura 4.5D) e 50 °C (Figura 4.5E) indicou a formação majoritária do álcool 5-HMU (6,47 min). Em 4 e 25 °C (Figuras 4.5B e 4.5C, respectivamente) é possível observar a
predominância do peróxido 5-HPMU (7,48 min), indicando que nestas temperaturas o hidroperóxido é estável.



**Figura 4.5** Análise por HPLC/MS do produto de decomposição térmica de 5-HPMU em diferentes temperaturas após 292 h. Cromatograma de 5-HPMU controle (A), da incubação de 5-HPMU a 4 °C (B), da incubação de 5-HPMU a 25 °C (C), da incubação de 5-HPMU a 37 °C (D) e da incubação de 5-HPMU a 50 °C (E).

O espectro de massa de 5-HPMU (Figura 4.6) após 292 h de decomposição a 37 °C mostra claramente a formação do álcool 5-HMU (Figura 4.6B), através do íon molecular com m/z 143 ([M+H]<sup>+</sup>), do íon-aduto com m/z 165 ([M+Na]<sup>+</sup>) e do íon fragmento com m/z 125 ([(M-H<sub>2</sub>O)+H]<sup>+</sup>). O hidroperóxido 5-HPMU remanescente (7,49 min) (Figura 4.6A) também foi detectado na incubação após 292 h a 37 °C.



**Figura 4.6** Análise por HPLC/MS do produto de decomposição térmica de 5-HPMU após 292 h a 37 °C. Espectro de massa de 5-HPMU remanescente em 7,49 min (A) e espectro de massa de 5-HMU em 6,47 min (B).

O gradiente de eluição utilizado nestas análises iniciou com 10 % de metanol (item 3.13, Materiais e Métodos), por isto, os tempos de retenção de 5-HMU e 5-HPMU foram inferiores aos obtidos na análise de 5-HMU (Figura 4.1) e 5-HPMU (Figura 4.2).

# 4.6 Análise comparativa da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila obtida pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria

Os métodos alaranjado de xilenol e iodometria são largamente utilizados na quantificação de hidroperóxidos de lipídeos (Jessup, *et al.*, 1994, Nielsen, *et al.*, 2003) e proteínas (Gay e Gebicki, 2003, Morgan, *et al.*, 2008). O método de iodometria se baseia na capacidade dos íons iodeto ( $\Gamma$ ) de reduzir ROOH e gerar iodo ( $I_2$ ) (equação 10). Nesta reação, 1 mol de ROOH reage com excesso de íons  $\Gamma$ , formando 1 mol de  $I_2$  (Buege, *et al.*, 1978, Jessup, *et al.*, 1994). A geração

de  $I_2$  é estimada pela formação de íon triiodeto ( $I_3^-$ ), que possui absorção máxima em 353 nm e é produzido na reação de  $I_2$  e excesso de íons I<sup>-</sup> (equação 11).

$$ROOH + 2H^{+} + 2I^{-} \rightarrow ROH + H_2O + I_2 \quad (equação 10)$$

$$I^{-} + I_2 \rightleftharpoons I_3^{-}$$
 (equação 11)

A grande vantagem do método de iodometria em relação ao método alaranjado de xilenol é a estequiometria 1:1, que corresponde a 1 mol de I<sub>2</sub> formado para cada mol de ROOH. As desvantagens deste método são a grande complexidade devido à necessidade de retirar o oxigênio molecular dissolvido no meio e o pequeno número de amostras que podem ser quantificadas. A presença de interferentes como oxigênio molecular e luz podem comprometer a confiabilidade do método, devido à possível reação com I<sup>-</sup>, I<sub>2</sub> ou I<sub>3</sub><sup>-</sup> (Jessup, *et al.*, 1994).

Já o método alaranjado de xilenol baseia-se na oxidação de íons Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> na reação com ROOH (equação 12). A reação de alaranjado de xilenol com íons Fe<sup>3+</sup> gera o complexo Fealaranjado de xilenol, que absorve na região do visível ( $\lambda = 560$  nm) (equação 13) (Gay, *et al.*, 1999, Bou, *et al.*, 2008). Este método possui as vantagens de não ser sensível ao oxigênio molecular dissolvido no meio reacional, ser rápido e ser possível analisar um grande número de amostras.

$$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + RO^{\bullet} + OH^{-}$$
 (equação 12)

 $Fe^{3+}$  + alaranjado de xilenol  $\rightarrow$  complexo Fe-alaranjado de xilenol (equação 13)

Foi realizada uma análise comparativa da concentração de 5-HPMU obtida pelo método alaranjado de xilenol e iodometria. O objetivo principal desta análise foi identificar possíveis diferenças na concentração de 5-HPMU obtida pelos dois métodos. A quantificação de 5-HPMU pelo método alaranjado de xilenol e iodometria foi feita utilizando como solução padrão H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35 % e CuOOH, respectivamente. Exemplos das curvas padrões obtidas pelo método alaranjado de xilenol (Figura 4.7A) e iodometria (Figura 4.7B) estão relacionados abaixo.



Figura 4.7 Curva padrão obtida pelo método alaranjado de xilenol (A) e iodometria (B).

Os resultados mostraram que a concentração de 5-HPMU obtida pelo método alaranjado de xilenol ( $5,7 \pm 0,1 \text{ mM}$ ) foi 1,7 vezes inferior à concentração obtida por iodometria ( $10 \pm 0,8 \text{ mM}$ ). Devido à grande complexidade do método iodometria, optamos por quantificar 5-HPMU pelo método alaranjado de xilenol e multiplicar a concentração de 5-HPMU pelo valor numérico 1,7. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

#### 4.7 Análise da pureza de hidroperóxido de cumeno

O método de iodometria utiliza como padrão diversos peróxidos, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *terc*butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) ou CuOOH. Entre os peróxidos citados, CuOOH foi escolhido como padrão, pois é um peróxido orgânico e não possui H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como contaminante. A análise da pureza de CuOOH foi feita por RMN de <sup>1</sup>H, utilizando ACN como padrão interno. Após a aquisição do espectro, calculamos a pureza da solução de CuOOH considerando a integração da área dos prótons de CuOOH (6 prótons) em relação a área dos prótons de ACN (3 prótons). Os experimentos foram realizados em triplicata, obtendo-se um valor de pureza de CuOOH igual a 88 %.

## 4.8 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Ce<sup>4+</sup>

Com o objetivo de verificar se 5-HPMU poderia ser uma fonte de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na presença de íons Ce<sup>4+</sup>, monitoramos a emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda$  =1270 nm) (Figuras 4.8-4.10) e bimolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do visível ( $\lambda$  = 634 e 703 nm) (Figuras 4.12 e 4.13). A emissão de luz monomolecular é resultante do decaimento de uma molécula de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) para o estado fundamental (equação 8) (Browne e Ogryzlo, 1964). Já o decaimento de duas moléculas de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) para o estado fundamental resulta na emissão de luz bimolecular (equação 9) (Khan e Kasha, 1963).

# 4.8.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo

A injeção de uma solução 5 mM de Ce<sup>4+</sup> em uma cubeta contendo 1,8 mM de 5-HPMU em D<sub>2</sub>O produziu uma emissão de luz com alta intensidade na região do IR-próximo (Figura 4.8, traço a). Com o objetivo de confirmar se a luz emitida era proveniente do decaimento monomolecular de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ), o experimento foi repetido na presença da mistura D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) ou NaN<sub>3</sub>. A adição de NaN<sub>3</sub> (Figura 4.8, traços b e c), um conhecido supressor físico de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ), ocasionou a diminuição da luz produzida na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>. A substituição de D<sub>2</sub>O pela mistura D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) (Figura 4.8, traço d) também produziu uma significante diminuição na intensidade da luz emitida, devido ao menor valor de meia-vida de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) em solventes não deuterados.



**Figura 4.8** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>. (a) Reação de 1,8 mM de 5-HPMU e 5 mM de Ce<sup>4+</sup>; (b) reação feita na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub>; (c) 10 mM de NaN<sub>3</sub>; (d) da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v).

A emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) também foi monitorada na reação de íons  $Ce^{4+}$  e 5-HMU (Figura 4.9, traço a), timina (Figura 4.9, traço b), uracila (Figura 4.9, traço c) ou  $H_2O_2$  (Figura 4.9, traço d). Os resultados mostraram que não há formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) nestas reações, confirmando que a luz emitida é produzida exclusivamente na reação de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  (Figura 4.8, traço a).



**Figura 4.9** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 2 mM de Ce<sup>4+</sup> e 2 mM de 5-HMU (a), timina (b), uracila (c) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d).

Com o objetivo de verificar a relação entre a intensidade da luz emitida e a quantidade de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  produzido com o aumento da concentração de  $Ce^{4+}$ , foi feita a reação de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  em diferentes concentrações (0,1-10 mM) (Figura 4.10). A reação de 5-HPMU (1,8 mM) e  $Ce^{4+}$  (0,1-10 mM) produziu uma emissão de luz monomolecular de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  dependente da concentração de íons  $Ce^{4+}$  (Figura 4.10). A intensidade máxima de luz foi obtida após injeção de uma solução 10 mM de  $Ce^{4+}$ . A concentração de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  foi estimada pela integração da luz

emitida em 1270 nm durante a decomposição térmica do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, uma conhecida fonte geradora de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Figura A-5, Anexos). Comparando-se com o padrão DHPNO<sub>2</sub>, a reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> gerou 156 ± 3 µM de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), que corresponde a um rendimento de 17,7 ± 0,4 %.



**Figura 4.10** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) dependente da concentração de Ce<sup>4+</sup>. Monitoramento da luz gerada na reação de 5-HPMU (1,8 mM) e Ce<sup>4+</sup> (concentração final: 0,1; 0,5; 1, 2, 5 e 10 mM). *Inset*: Concentração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) (mM) estimada pela integração da luz emitida em diferentes concentrações de Ce<sup>4+</sup>, comparando-se com o padrão DHPNO<sub>2</sub> (Figura A-5, Anexos). Os resultados representam a média aritmética e o desvio padrão de três experimentos.

A formação de  $O_2({}^1\Delta_g)$ , na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, foi inequivocamente confirmada através da aquisição do espectro de emissão de  $O_2({}^1\Delta_g)$  na região do IR-próximo (Figura 4.11A). Com o objetivo de comparação, os espectros de emissão de  $O_2({}^1\Delta_g)$  produzidos na reação de  $H_2O_2$  e HOCl (Figura 4.11C) e na decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub> (Figura 4.11D), conhecidas fontes de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$ , também foram adquiridos. Tanto o espectro de emissão de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  gerado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.11A), quanto os espectros produzidos pelas conhecidas fontes de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  (Figuras 4.11C e 4.11D), possuem absorção máxima em 1270 nm, que é característico do decaimento monomolecular de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$ .



**Figura 4.11** Espectros de emissão de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  na região do IR-próximo. Espectro gerado na injeção de uma solução de Ce<sup>4+</sup> (concentração final: 2 mM) em uma solução de 5-HPMU (concentração final: 3,5 mM) (A). Espectro gerado na injeção de uma solução 2 mM de HOCl em uma solução 3,5 mM de 5-HPMU (B) e 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C). Espectro gerado durante a decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub> (concentração final: 4 mM) (D). Todos os experimentos foram feitos em D<sub>2</sub>O.

#### 4.8.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do visível

O monitoramento da emissão de luz bimolecular de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$ , produzida na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, foi feito utilizando uma fotomultiplicadora sensível à região do visível e um filtro de corte que deixa passar apenas luz com comprimento de onda superior a 570 nm. A reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> produziu emissão de luz bimolecular na região do visível (Figura 4.12, traço a), confirmando a formação de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  nesta reação. No entanto, na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub> (Figura 4.12, traço b), 10 mM de NaN<sub>3</sub> (Figura 4.12, traço c) e da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) (Figura 4.12, traço d) ocorreu a supressão da luz emitida, reforçando a formação de O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>.



**Figura 4.12** Emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_g$ ) produzida na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>. (a) Reação de 1,8 mM de 5-HPMU e 5 mM de Ce<sup>4+</sup>; (b) reação feita na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub>; (c) 10 mM de NaN<sub>3</sub>; (d) da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v).

Como foi observado no monitoramento da emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação dos controles (5-HMU, timina, uracila ou  $H_2O_2$ ) e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.9), também não ocorreu

emissão de luz bimolecular na reação de Ce<sup>4+</sup> e 5-HMU (Figura 4.13, traço a), timina (Figura 4.13, traço b), uracila (Figura 4.13, traço c) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.13, traço d). Portanto, este resultado reforça novamente que o O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) é produzido exclusivamente na presença do peróxido 5-HPMU e íons Ce<sup>4+</sup>.



**Figura 4.13** Emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzida na reação de 2 mM de Ce<sup>4+</sup> e 2 mM de 5-HMU (a), timina (b), uracila (c) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d).

## 4.9 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e compostos presentes em sistemas biológicos

Como foi mostrado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) também foi estudada na reação de 5-HPMU e compostos presentes em sistemas biológicos, como HOCl, Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>. A geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) foi monitorada através da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) e bimolecular na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm).

4.9.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ácido hipocloroso

4.9.1.1 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do infravermelho próximo

A formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl foi caracterizada por meio do monitoramento da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) (Figura 4.14). A figura abaixo mostra a emissão de luz de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e HOCl (Figura 4.14, traço a) e a supressão da luz emitida quando está presente o supressor físico de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), NaN<sub>3</sub>, (Figura 4.14, traços b e c) ou a mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) (Figura 4.14, traço d).



**Figura 4.14** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 5-HPMU e HOCl. (a) Reação de 1,8 mM de 5-HPMU e 5 mM de HOCl; (b) reação feita na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub>; (c) 10 mM de NaN<sub>3</sub>; (d) da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v).

A emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) também foi monitorada nas reações de HOCl e 5-HMU (Figura 4.15, traço a), timina (Figura 4.15, traço b), uracila (Figura 4.15, traço c) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.15, traço d). Dentre as reações, somente a reação de HOCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4.15, traço d) produziu O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ). A reação de HOCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma conhecida fonte de O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ) e gera quantidades estequiométricas desta espécie reativa, portanto o monitoramento de uma intensa emissão de luz era esperado. Como foi utilizado 5-HPMU purificado, a emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl é resultante exclusivamente da reação entre o peróxido e HOCl, e não da reação de contaminantes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e HOCl.



**Figura 4.15** Emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzida na reação de 2 mM de HOCl e 2 mM de 5-HMU (a), timina (b), uracila (c) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d).

Analisamos também o efeito do aumento da concentração de HOCl (0,1-10 mM) na emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) (Figura 4.16).

Igualmente como na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.10), o aumento da concentração de HOCl produziu um aumento de intensidade da luz emitida (Figura 4.16) e atingiu um patamar acima de 1 mM de HOCl. A concentração máxima de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) foi obtida durante a injeção de 10 mM de HOCl, que corresponde a 159 ± 5 µM e um rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) de 18,1 ± 0,5 %. O rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) obtido na reação de 5-HPMU e HOCl (18,1 ± 0,5 %) é próximo ao rendimento obtido na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (17,7 ± 0,4 %).

Para confirmar que emissão de luz era proveniente do decaimento monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), produzido na reação de 5-HPMU e HOCl, foi adquirido um espectro de emissão de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo (Figura 4.11B). Novamente, obtivemos um espectro de emissão de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) similar aos espectros de emissão obtidos nas reações de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.11A), de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl (Figura 4.11C) e na decomposição térmica do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> (Figura 4.11D).



**Figura 4.16** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) dependente da concentração de HOCl. Monitoramento da luz gerada na reação de 5-HPMU (1,8 mM) e HOCl (concentração final: 0,1; 0,5; 1, 2,

5 e 10 mM). *Inset*: Concentração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) (mM) estimada pela integração da luz emitida em diferentes concentrações de HOCl, comparando-se com o padrão DHPNO<sub>2</sub> (Figura A-5, Anexos). Os resultados representam a média aritmética e o desvio padrão de três experimentos.

#### 4.9.1.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete na região do visível

Evidências adicionais da geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl foram obtidas por meio do monitoramento da emissão de luz bimolecular na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm) (Figura 4.17). A formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl ficou evidente através da intensa luz produzida (Figura 4.17, traço a). A diminuição da intensidade da luz na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub> (Figura 4.17, traço b), 10 mM de NaN<sub>3</sub> (Figura 4.17, traço c) ou da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) (Figura 4.17, traço d) confirmou a geração de O<sub>2</sub> ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl.



**Figura 4.17** Emissão de luz bimolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 5-HPMU e HOCl. (a) Reação de 1,8 mM de 5-HPMU e 5 mM de HOCl; (b) reação feita na presença de 1 mM de NaN<sub>3</sub>; (c) 10 mM de NaN<sub>3</sub>; (d) da mistura D<sub>2</sub>O: H<sub>2</sub>O (35:65, v/v).

Similar ao resultado obtido na reação de HOCl e 5-HMU, timina, uracila ou  $H_2O_2$  (Figura 4.15), observamos também a emissão de luz bimolecular somente na reação de HOCl e  $H_2O_2$  (Figura 4.18, traço d).



**Figura 4.18** Emissão de luz bimolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzido na reação de 2 mM de HOCl e 2 mM de 5-HMU (a), timina (b), uracila (c) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 4.9.2 Medidas de emissão de luz de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons $Fe^{2+}$ ou $Cu^{2+}$

O monitoramento da emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) também foi feito nas reações de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.19 e 4.20). Em ambas, foi utilizado primeiramente D<sub>2</sub>O como solvente e posteriormente, ACN-*d*<sub>3</sub>. Nas reações feitas em D<sub>2</sub>O, não foi possível observar emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ) (dados não mostrados). Utilizando ACN-*d*<sub>3</sub>, foi possível detectar O<sub>2</sub> ( ${}^1\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e

Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.19), mas não foi possível detectar, nestas condições, O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzido na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.20).

Como foi mostrado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCl, a injeção de 20 mM (Figura 4.19, traço a) e 10 mM de Fe<sup>2+</sup> (4.19, traço b) levou a um aumento da intensidade da luz emitida. Na figura abaixo, podemos observar que a intensidade da emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) aumenta com o aumento da concentração de íons Fe<sup>2+</sup>. Na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> 20 mM (Figura 4.19, traço a) e 10 mM (Figura 4.19, traço b) a intensidade da luz emitida é, respectivamente, seis e três vezes superior à intensidade da linha de base do equipamento (Figura 4.19, traço c). Entretanto, na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> 20 mM (Figura 4.20, traço a) e 10 mM (Figura 4.20, traço b) não foi possível detectar O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) nestas condições, possivelmente devido ao limite de detecção do equipamento.



**Figura 4.19** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup>. (a) Reação de 5-HPMU (10 mM) e 20 mM de Fe<sup>2+</sup>; (b) reação de 5-HPMU (10 mM) e 10 mM de Fe<sup>2+</sup>; (c) aquisição da linha de base do equipamento.



**Figura 4.20** Emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup>. (a) Reação de 5-HPMU (10 mM) e 20 mM de Cu<sup>2+</sup>; (b) reação de 5-HPMU (10 mM) e 10 mM de Cu<sup>2+</sup>; (c) aquisição da linha de base do equipamento.

#### 4.10 Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete

O cálculo do rendimento de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) produzido nas reações de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCI foi realizado baseando-se nas medidas de emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) (Figura A-5, Anexos). Utilizamos como padrão o endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, que gera O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com rendimento de 59 % (Pierlot, *et al.*, 2000). A termodecomposição de DHPNO<sub>2</sub> (concentração final: 21 mM, em D<sub>2</sub>O) a 37 °C foi monitorada durante 4000 s. No início da termodecomposição de DHPNO<sub>2</sub>, observamos uma intensa emissão de luz e após 500 s uma diminuição lenta da intensidade da luz emitida (Figura A-5, Anexos). A área sob a curva de emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foi integrada e comparada com curva de emissão integrada das reações de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCl (Figuras 4.10 e 4.16). O rendimento foi calculado considerando o mecanismo de Russell, no qual são necessárias duas moléculas de 5-HPMU para gerar uma molécula de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ).

### 4.11 Síntese e detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido de 9,10divinilsulfonatoantraceno

A síntese do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi realizada através da fotossensibilização de AVS, na presença de azul de metileno (0,1 M em etanol) durante 2,5 h (150 min). Na reação de fotossensibilização, a molécula de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida foi captada por AVS, gerando o endoperóxido correspondente (AVSO<sub>2</sub>) (Esquema 1, equação 14).



**Esquema 1** Captação química de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ).

Durante a fotossensibilização, alíquotas foram retiradas em diferentes tempos (0, 45, 90 e 150 min) e analisadas por HPLC/MS/MS. Após 45 min de fotossensensibilização, a análise por HPLC/MS/MS indicou o aparecimento de um novo pico de produto com tempo de retenção de 21,38 min, além do pico de AVS em 29,65 min (Figura 4.21A). A identidade do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi confirmada por meio da detecção do íon com m/z 210 ([AVSO<sub>2</sub>]<sup>2-</sup>) (Figura 4.21C) e do íon fragmento com m/z 194 (Figura 4.21D), referente à perda de uma molécula de oxigênio

durante a fragmentação de AVSO<sub>2</sub> na câmara de colisão do espectrômetro de massa. O produto de partida AVS pôde ser diferenciado facilmente do endoperóxido AVSO<sub>2</sub>, pois elui da coluna cromatográfica com tempo de retenção diferente (29,65 min) de AVSO<sub>2</sub> (21,38 min). Além disto, o espectro de massa de AVS (Figura 4.21B) contém exclusivamente o íon com m/z 194, que corresponde ao íon negativo da molécula de AVS



**Figura 4.21** Detecção do endoperóxido  $AVSO_2$  por HPLC/MS/MS. Cromatograma de UV em 215 nm após 45 min de fotossensibilização (A), espectro de massa de AVS obtido em 29,65 min (B), espectro de massa de AVSO<sub>2</sub> obtido em 21,38 min (C) e espectro massa dos íons fragmentos de *m/z* 210 (D).

A detecção do íon fragmento de AVSO<sub>2</sub> com m/z 194 (Figura 4.21D), possibilitou a detecção do endoperóxido através do método de MRM (Figura 4.22), no qual o íon precursor  $(m/z \ 210)$  foi selecionado no Q1, fragmentado no Q2 e o íon fragmento com m/z 194 foi detectado no Q3. O método de detecção por MRM possibilitou a detecção de AVSO<sub>2</sub>, através do monitoramento da fragmentação ou transição de massa do endoperóxido  $(m/z \ 210 \rightarrow 194)$ .



Figura 4.22 Detecção de AVSO<sub>2</sub> por HPLC/MS/MS no modo MRM.

## 4.12 Captação química de oxigênio molecular singlete gerado na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila, ácido hipocloroso, $Fe^{2+}$ ou $Cu^{2+}$

Concomitante ao monitoramento da emissão de luz monomolecular ( $\lambda = 1270$  nm) e bimolecular ( $\lambda = 634$  e 703 nm) de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), a captação química acoplada à análise por HPLC/MS/MS representa um método específico e sensível para a detecção de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ). O endoperóxido AVSO<sub>2</sub> formado na reação de AVS e O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), produzido na reação de 5-HPMU e HOCl, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>, foi detectado por HPLC/MS/MS no modo MRM. A detecção de AVSO<sub>2</sub> demonstrou a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) nas reações de 8,8 mM de 5-HPMU e 5 mM de HOCl (Figura 4.23), 1m M de Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.24) ou 1 mM de Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.25).

Após análise da emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e crescentes concentrações de HOCl (Figura 4.16), concluímos que acima de 1 mM de HOCl o

rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) atinge um valor máximo e constante. Então, decidimos utilizar a concentração de 5 mM de HOCl como uma concentração ideal para obtermos o rendimento máximo de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) nestas condições. Experimentos utilizando concentrações mais altas de HOCl (> 5 mM) também foram feitos para avaliar o efeito de HOCl na decomposição de AVSO<sub>2</sub>, visto que o HOCl é considerado um forte agente oxidante (Figura 4.26).

A reação de 5-HPMU e HOCl gera  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), que foi eficientemente captado pelo AVS, como pode ser visto pela presença do pico de produto com tempo de retenção de 21,41 min (Figura 4.23D). Este pico de produto (21,41 min) foi identificado como AVSO<sub>2</sub> e possui o mesmo tempo de retenção e padrão de fragmentação do endoperóxido AVSO<sub>2</sub>, gerado por fotossensibilização (Figuras 4.21 e 4.22). Diferentemente da reação AVS/5-HPMU/HOCl, os cromatogramas de MRM dos controles AVS (Figura 4.23A), AVS/5-HPMU (Figura 4.23B) e AVS/HOCl (Figura 4.23C) mostraram que não ocorreu formação de O<sub>2</sub> ( $^1\Delta_g$ ), confirmando que esta espécie reativa é produzida somente na reação de 5-HPMU e HOCl.



**Figura 4.23** Detecção de AVSO<sub>2</sub> por HPLC/MS/MS no modo MRM. Cromatograma de MRM de AVS (8 mM) (A), AVS e 5-HPMU (8,8 mM) (B), AVS e HOCl (5 mM) (C), AVS com 5-HPMU (8,8 mM) e HOCl (5 mM) (D). Reação de AVS, 5-HPMU e HOCl foi mantida protegida da luz por 1 h a 37 °C.

Após a captação química de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) gerado na reação de AVS, 5-HPMU e HOCl e detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> (Figura 4.23), decidimos estudar se esta espécie reativa poderia ser gerada na reação de AVS, 5-HPMU e íons Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. Da mesma forma como na reação de 5-HPMU e HOCl (Figura 4.23), a reação de 8,8 mM de 5-HPMU e 1 mM de Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.24) ou Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.25) também produziu O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ). A formação de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) foi confirmada através da detecção do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> por MRM (*m*/*z* 210→194). Os cromatogramas de MRM (*m*/*z* 210→194) das reações com Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.24D) ou Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.25D) possuem o mesmo pico em 21 min, que foi anteriormente observado na geração de AVSO<sub>2</sub> por fotossensibilização (Figuras 4.21 e 4.22) e na reação de AVS/5-HPMU/HOCl (Figura 4.23). Como era esperado, nos controles AVS (Figuras 4.24A e 4.25A), AVS/5-HPMU (Figuras

4.24B e 4.25B), AVS/Fe<sup>2+</sup> (Figuras 4.24C) e AVS/Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.25C) não foi detectado a presença do endoperóxido AVSO<sub>2</sub>. Experimentos de captação química e detecção de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) foram feitos utilizando concentrações superiores a 1 mM de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. No entanto, não foi possível detectar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) nestas condições, pois ocorreu a precipitação do captador AVS, devido ao excesso de íons metálicos.



**Figura 4.24** Detecção de AVSO<sub>2</sub> por HPLC/MS/MS no modo MRM. Cromatograma de MRM de AVS (8 mM) (A), AVS e 5-HPMU (8,8 mM) (B), AVS e Fe<sup>2+</sup> (1 mM) (C), AVS com 5-HPMU (8,8 mM) e Fe<sup>2+</sup> (1 mM) (D). Reação de AVS, 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> foi mantida protegida da luz por 24 h a 37 °C.



**Figura 4.25** Detecção de AVSO<sub>2</sub> por HPLC/MS/MS no modo MRM. Cromatograma de MRM de AVS (8 mM) (A), AVS e 5-HPMU (8,8 mM) (B), AVS e Cu<sup>2+</sup> (1 mM) (C), AVS com 5-HPMU (8,8 mM) e Cu<sup>2+</sup> (1 mM) (D). Reação de AVS, 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> foi mantida protegida da luz por 24 h a 37 °C.

# 4.13 Efeito da concentração de ácido hipocloroso na geração e decomposição do endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno: Detecção por HPLC/MS/MS

Após detectarmos por HPLC/MS/MS o endoperóxido AVSO<sub>2</sub> produzido na reação de 5-HPMU (8,8 mM), HOCl (5 mM) e AVS (8 mM) (Figura 4.23), decidimos avaliar o efeito da concentração de HOCl na geração e decomposição de AVSO<sub>2</sub>. A reação de AVS, 5-HPMU e HOCl (5-50 mM) foi mantida por 1 h a 37 °C protegida da luz (Figura 4.26). Foram testadas crescentes concentrações de HOCl a partir de 5 mM (5, 10, 25 e 50 mM), pois os resultados de emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) produzida na reação de 5-HPMU e HOCl (Figura 4.16) indicaram que acima de 1 mM de HOCl a quantidade máxima de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) gerado permanece constante. A análise do efeito da concentração de HOCl na geração e decomposição de AVSO<sub>2</sub> foi realizada através da detecção do endoperóxido por HPLC/MS/MS no modo MRM (Figura 4.26). O resultado da geração de AVSO<sub>2</sub> em diferentes concentrações de HOCl (Figura 4.26) mostrou que o aumento da concentração de HOCl resulta em uma diminuição da quantidade de endoperóxido. A diminuição no rendimento de AVSO<sub>2</sub> pode estar relacionada à decomposição do endoperóxido, devido a reação de HOCl com os carbonos insaturados C9 e C10 da molécula de AVSO<sub>2</sub> (Esquema 1, equação 14). A reação de HOCl e AVSO<sub>2</sub> pode gerar compostos oxidados, que teriam *m/z* superior a 210 e consequentemente não seriam detectados por HPLC/MS/MS, pois teriam uma transição de massa diferente de *m/z* 210  $\rightarrow$  194.



**Figura 4.26** Efeito da concentração de HOCl na geração de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e AVSO<sub>2</sub>. O produto da reação de AVS (8 mM), 5-HPMU (8,8 mM) e HOCl (5-50 mM) foi analisado por HPLC/MS/MS no modo MRM. Reação de AVS, 5-HPMU e HOCl foi mantida por 1 h a 37 °C e protegida da luz. Os dados representam a média aritmética de duas repetições.

## 4.14 Efeito do tempo de incubação na geração do endoperóxido de 9,10divinilsulfonatoantraceno: Detecção por HPLC/MS/MS

Após observarmos que ocorreu uma diminuição no rendimento de AVSO<sub>2</sub> utilizando concentrações superiores a 5 mM de HOCl (Figura 4.26), decidimos estudar o efeito do tempo de incubação (0; 0,5; 1; 2; 4 e 24 h) na formação do endoperóxido, gerado na reação de AVS, 5-HPMU e HOCl (Figura 4.27). Os resultados de HPLC/MS/MS mostraram que em 1 h pode-se obter rendimento máximo de AVSO<sub>2</sub> e que a partir de 1 h há pequenas variações no rendimento (Figura 4.27). A variação no rendimento de AVSO<sub>2</sub>, principalmente em 4 h, deve-se a possíveis erros experimentais de manipulação. Como não houve considerável variação no rendimento de AVSO<sub>2</sub> durante os diferentes tempos de incubação, concluímos que o rendimento máximo de endoperóxido é obtido em 1 h de reação (Figura 4.27). Além disto, podemos inferir que o endoperóxido AVSO<sub>2</sub> não decompõe facilmente quando submetido a prolongados períodos de aquecimento e excesso de HOCI. A estabilidade de AVSO<sub>2</sub> também foi analisada através do experimento em que se incubou AVSO<sub>2</sub>, gerado por fotossensibilização de AVS, com 5 mM de HOCI durante 24 h (Figura 4.28).



**Figura 4.27** Efeito do tempo de incubação na captação química de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ). O produto da reação de AVS (8 mM), 5-HPMU (8,8 mM) e HOCl (5 mM) foi analisado por HPLC/MS/MS no modo MRM. Reação de AVS, 5-HPMU e HOCl foi mantida por 24 h a 37 °C e protegida da luz. Os dados representam a média aritmética de duas repetições.

### 4.15 Efeito do tempo de exposição a ácido hipocloroso na decomposição do endoperóxido de 9,10-divinilsulfonatoantraceno

O efeito do tempo de exposição (0,5; 1; 2; 4 e 24 h, a 37 °C) a HOCl na decomposição de  $AVSO_2$  foi analisado através da detecção do endoperóxido por HPLC/MS/MS no modo MRM (Figura 4.28). O objetivo do experimento era verificar se durante um longo período de incubação, na presença HOCl (5 mM) e aquecimento (37 °C), o endoperóxido  $AVSO_2$  poderia decompor. O resultado mostrou que nos sucessivos tempos de incubação a área obtida da transição de massa de  $AVSO_2$  (m/z 210 $\rightarrow$ 194) se mantém constante (Figura 4.28). Portanto, o endoperóxido  $AVSO_2$  é estável a longos períodos de incubação na presença de 5 mM de HOCl e aquecimento. Não testamos a estabilidade de  $AVSO_2$  na presença de concentrações superiores a 5 mM de HOCl, pois nosso interesse era avaliar a estabilidade do endoperóxido nas condições experimentais em

que obtivemos um rendimento máximo de geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) e de AVSO<sub>2</sub> na reação de 5-HPMU e HOCl (Figuras 4.16 e 4.26).



**Figura 4.28** Efeito do tempo de exposição a HOCl na decomposição de AVSO<sub>2</sub>. O endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi analisado por HPLC/MS/MS no modo MRM. O endoperóxido AVSO<sub>2</sub> foi incubado com 5 mM de HOCl durante 24 h a 37 °C. Os dados representam a média aritmética de duas repetições.

### 4.16 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Ce<sup>4+</sup>

O monitoramento da emissão de luz monomolecular (Figuras 4.8 e 4.10) e bimolecular de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Figura 4.12) produzido na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, forneceu fortes evidências da geração desta espécie reativa através do mecanismo de Russell. Neste mecanismo, a reação entre dois radicais peroxila de 5-HPMU pode formar um intermediário tetraóxido linear, que pode decompor através de um mecanismo cíclico e gerar  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ), um álcool (5-HMU) e um aldeído (5-FoU) (Figura 5.2). A detecção por HPLC/MS (Figura 4.29) dos produtos 5-HMU e 5-FoU, produzidos na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, reforçou a hipótese de geração de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ )

*via* mecanismo de Russell (Figura 5.2). Nos cromatogramas de UV em 260 nm (Figura 4.29) da reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,5 mM (B), 1 mM (C), 2 mM (D) e 5 mM de Ce<sup>4+</sup> (E) observou-se que o aumento da concentração de Ce<sup>4+</sup> produziu uma diminuição da intensidade do pico de 5-HPMU em 10 min e o aumento da intensidade dos picos de 5-HMU (9 min) e 5-FoU (11 min). O decréscimo da intensidade do pico de 5-HPMU indicou o consumo do peróxido na reação com íons Ce<sup>4+</sup> e consequentemente a crescente formação dos produtos 5-HMU e 5-FoU, o que ficou evidente pelo aumento da intensidade dos picos em 8,96 e 11,44 min.



**Figura 4.29** Análise por HPLC/MS da reação 5-HPMU e íons Ce<sup>4+</sup>. Cromatograma de UV em 260 nm da solução de 1 mM de 5-HPMU (A), da reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,5 mM (B), 1 mM (C), 2 mM (D) e 5 mM de Ce<sup>4+</sup> (E). A reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.

A análise dos espectros de massa da reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> permitiu a identificação de 5-HPMU reman escente e dos produtos 5-HMU e 5-FoU (Figura 4.30). Os espectros de massa de 5-HPMU (Figura 4.30A), 5-HMU (Figura 4.30B) e 5-FoU (Figura 4.30C) possuem os respectivos íons molecular ( $[M+H]^+$ ) e íons-aduto ( $[M+Na]^+$ ) de cada composto. Foi possível também identificar os íons fragmento com *m/z* 125 relativos à perda do grupo peróxido de 5-HPMU (Figura 4.30A) e à perda de água de 5-HMU (Figura 4.30B).



**Figura 4.30** Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 1 mM de 5-HPMU e 1 mM de Ce<sup>4+</sup>. (A) Espectro de massa de 5-HPMU que elui em 10,61 min. (B) Espectro de massa do pico de 5-HMU que elui em 8,94 min. (C) Espectro de massa do pico de 5-FoU que elui em 11,43 min. A reação entre 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.

A detecção por HPLC/MS de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU (Figuras 4.29 e 4.30) auxiliou na identificação dos compostos. No entanto, a comprovação da identidade química de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU foi feita através da análise de HPLC/MS/MS (Figura 4.31). Nesta análise, é selecionado no Q1 o íon molecular de cada composto (m/z 159 para 5-HPMU, Figura 4.31A; m/z 143 para 5-HMU, Figura 4.31B e m/z 141 para 5-FoU, Figura 4.31C). Posteriormente, o íon molecular é fragmentado no Q2 e os íons fragmento gerados são detectados no Q3. Observamos a formação de íons fragmento característicos de peróxido (5-HPMU) e álcool (5-HMU). O íon fragmento com m/z 125 representa à perda de um grupo peróxido (34 u.m.a) no espectro de 5-HPMU (Figura 4.31A) e a perda de uma molécula de água (18 u.m.a) no espectro de 5-HPMU (Figura 4.31B). A fragmentação da molécula de 5-FoU gerou os íons fragmento com m/z 98 e 70 (Figura 4.31C). A identificação dos fragmentos de cada composto possibilitou a confirmação da identidade química de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU. A análise detalhada do mecanismo de fragmentação dos compostos será discutida posteriormente (Figura 5.4).



**Figura 4.31** Análise por HPLC/MS/MS dos produtos formados na reação de 1 mM de 5-HPMU e 1 mM de Ce<sup>4+</sup>. (A) Espectro de massa dos íons fragmento de 5-HPMU que elui em 10,61 min. (B) Espectro de massa dos íons fragmento de 5-HMU que elui em 8,94 min. (C) Espectro de massa dos íons fragmento de 5-FoU que elui em 11,43 min. A reação entre 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.

4.17 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e compostos presentes em sistemas biológicos

4.17.1 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ácido hipocloroso

A geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl foi confirmada através do monitoramento da emissão de luz monomolecular (Figuras 4.14 e 4.16), bimolecular (Figura

4.17) e também da detecção do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> (Figura 4.23). Concomitante a detecção de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), detectamos por HPLC/MS (Figuras 4.32 e 4.33) os produtos de decomposição de 5-HPMU na presença de HOCl, o álcool 5-HMU e o aldeído 5-FoU. A análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-HPMU e HOCl (Figuras 4.32 e 4.33) foi semelhante a análise dos produtos formados na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figuras 4.29 e 4.30). Os produtos formados tanto na presença de Ce<sup>4+</sup>, quanto na presença de HOCl, foram 5-HMU e 5-FoU. O mecanismo de geração de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl provavelmente ocorre através da transferência de um átomo de cloro de HOCl para o peróxido, levando a formação de um intermediário clorado instável. O intermediário clorado pode decompor e gerar O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), 5-HMU e 5-FoU.

Nos cromatogramas de UV (Figura 4.32) da reação de 5-HPMU (1 mM) e HOCl (0,5-5 mM) fica evidente que o aumento da concentração de HOCl produziu um aumento do rendimento de 5-HMU (9 min) e 5-FoU (11 min). Na reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,5 mM de HOCl (Figura 4.32B) pode-se perceber a formação de um produto em 17 min, que não é detectado em concentrações superiores a 0,5 mM de HOCl. A análise dos espectros de massa da reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,5 mM de HOCl (Figura 4.33A) confirmou a presença de 5-HPMU remanescente e dos produtos 5-HMU (Figura 4.33B) e 5-FoU (Figura 4.33C), através do fon molecular ( $[M+H]^+$ ) de cada composto. Identificamos que o produto formado em 17 min é uma molécula clorada, pois os fons detectados com *m*/*z* 163 (com <sup>35</sup>Cl) e 165 (com <sup>37</sup>Cl: 75,77 % e <sup>37</sup>Cl: 24,23%). Além disto, os fons com *m*/*z* 163 e 165 possuem padrão isotópico característico de uma molécula que contém um átomo de cloro, ou seja, há uma diferença de 2 u.m.a entre os fons moleculares com *m*/*z* 163 (com <sup>35</sup>Cl) e 165 (com <sup>37</sup>Cl) (Figura 4.33D). A análise do espectro de

massa obtido em 17 min indicou que o produto pode ser uma timina clorada. A timina clorada pode ser um produto de decomposição de 5-HPMU, que em concentrações altas de HOCl pode ser novamente decomposto. Esta pode ser a explicação para não termos detectado esta molécula em concentrações superiores a 1 mM de HOCl.



**Figura 4.32** Análise por HPLC/MS da reação 5-HPMU e HOCI. Cromatograma de UV em 260 nm de 1 mM de 5-HPMU (A), da reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,5 mM (B), 1 mM (C), 2 mM (D) e 5 mM de HOCI (E). A reação entre 5-HPMU e HOCI foi feita em pH 7,4 e mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.



90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 m/z

**Figura 4.33** Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-HPMU (1 mM) e HOCI (0,5 mM). (A) Espectro de massa de 5-HPMU que elui em 10,60 min. (B) Espectro de massa do pico de 5-HMU que elui em 8,94 min. (C) Espectro de massa do pico de 5-FoU que elui em 11,44 min. (D) Espectro de massa do produto que elui 17,73 min. A reação entre 5-HPMU e HOCI foi feita em pH 7,4 e mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.

## 4.17.2 Análise por HPLC/MS dos produtos formados na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons $Fe^{2+}$ ou $Cu^{2+}$

A reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> produz O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), como foi demonstrado através da emissão de luz monomolecular (Figura 4.19 para Fe<sup>2+</sup>) e da captação química de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) (Figuras 4.24 e 4.25 para Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, respectivamente). Além disto, como na reação de 5-HPMU
e Ce<sup>4+</sup> (Figuras 4.29, 4.30) ou HOCl (Figuras 4.32, 4.33) também foi detectado por HPLC/MS os produtos formados na reação de 5-HPMU e  $Fe^{2+}$  (Figura 4.34) ou  $Cu^{2+}$  (Figura 4.35). Os cromatogramas dos produtos 5-HMU e 5-FoU são similares aos obtidos nas reacões com Ce<sup>4+</sup> e HOCl (Figuras 4.30 e 4.33, respectivamente). É possível notar que para reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> utilizou-se concentrações mais baixas de metal (0,3-1 mM, Figura 4.34), comparando-se com a reação de Cu<sup>2+</sup> (10-30 mM, Figura 4.35). Na reação de 5-HPMU (1 mM) e Fe<sup>2+</sup> (1 mM) (Figura 4.34D) observou-se a degradação completa de 5-HPMU e a geração de 5-HMU e 5-FoU na proporção 1:1. Entretanto, na reação de 1 mM de 5-HPMU e 30 mM de Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.35D) foi usada uma concentração superior de metal (30 mM), levando a uma degradação inferior de 5-HMPU e formação superior de 5-FoU em relação a 5-HMU. Esta diferença na reatividade de Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> em relação a 5-HPMU está relacionada ao potencial de redução dos metais. Na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.34), a presença de 5-HMU e 5-FoU na proporção 1:1 utilizando concentração mais baixa de metal, deve-se ao fato do íon Fe<sup>2+</sup> ser um forte agente redutor e a reação ser termodinamicamente favorável (Halliwell, 2007). Na reação de 5-HPMU e Cu2+ (Figura 4.35), observou-se a degradação de 5-HPMU em concentrações mais altas de metal, pois o íon Cu<sup>2+</sup> não é um bom agente oxidante. Além disto, provavelmente o mecanismo de decomposição de 5-HPMU na reação com  $Cu^{2+}$  (Figura 5.3, equações 20 e 21) é diferente do mecanismo de decomposição na presença de  $Fe^{2+}$  (Figura 5.3, equações 22 e 24).



**Figura 4.34** Análise por HPLC/MS da reação 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup>. Cromatograma de UV em 260 nm de 1 mM de 5-HPMU (A), da reação de 1 mM de 5-HPMU e 0,3 mM (B), 0,5 mM (C) e 1 mM de Fe<sup>2+</sup> (D). A reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> foi mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.



**Figura 4.35** Análise por HPLC/MS da reação 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup>. Cromatograma de UV em 260 nm de 1 mM de 5-HPMU (A), da reação de 1 mM de 5-HPMU e 10 mM (B), 20 mM (C) e 30 mM de Cu<sup>2+</sup> (D). A reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> foi mantida sob agitação a 37 °C durante 10 min.

#### 4.18 Experimentos envolvendo DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu<sup>2+</sup>

## 4.18.1 Efeito da presença e ausência de metais contaminantes na incubação DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Cu<sup>2+</sup>

Para avaliar o efeito da presença de metais contaminantes ( $Fe^{2+} e Cu^{2+}$ ) na geração das formas OC e L, a incubação de pBR322 com 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> foi feita em água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 tratados por 24 h com resina Chelex<sup>®</sup>. Comparativamente, incubamos pBR322, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU em água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 não tratados com Chelex<sup>®</sup> (Figura 4.36).

A figura 4.36A traz um exemplo de um gel de agarose 1 % contendo amostras incubadas em água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 não tratados (sem Chelex<sup>®</sup>) e tratados com Chelex<sup>®</sup> (com Chelex<sup>®</sup>). A diminuição da forma SC em relação ao tipo de incubação foi exemplificada na figura 4.36B. Os experimentos de pBR322, Cu<sup>2+</sup> (10 μM) e 5-HPMU (0,5 e 1 mM) feitos em água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 não tratados com Chelex<sup>®</sup> (Figura 4.36A sem Chelex<sup>®</sup>), mostraram os desaparecimento completo da forma SC do DNA plasmidial (linhas 5 e 6) e a formação exclusiva da forma OC (100 %). Na incubação de DNA na ausência de Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU (93,3 %, linha 1, Figura 4.36A sem Chelex<sup>®</sup>) e na presença de Cu<sup>2+</sup> (94,4 %, linha 2, Figura 4.36A sem Chelex<sup>®</sup>) observou-se majoritariamente a presença da forma SC. Já nos controles sem Chelex<sup>®</sup>, DNA+5-HPMU (0,5 e 1 mM) (linhas 3 e 4, Figura 4.36A) ficou evidente o aumento da forma OC (32,6 % para 0,5 mM e 36,4 % para 1 mM de 5-HPMU) e a diminuição da forma SC (67,4 % para 0,5 mM e 63,6 % para 1 mM de 5-HPMU). A geração da forma OC nos controles DNA e 5-HPMU em solventes não tratados com Chelex<sup>®</sup> indicou que a presença de metais contaminantes, como Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, pode estar envolvida no processo de quebra de fita simples do DNA.

De forma diferente da incubação feita em solventes não tratados com Chelex<sup>®</sup> (Figura 4.36A sem Chelex<sup>®</sup>), a incubação feita em solventes tratados por 24 h com Chelex<sup>®</sup> (Figura 4.36A com Chelex<sup>®</sup>) apresentou porcentagem constante e alta da forma SC nos controles: DNA (93,5 %, linha 1), DNA+Cu<sup>2+</sup> (91,5 %, linha 2) e DNA+5-HPMU (0,5 e 1 mM) (90,4 %, linha 3 e 86,8 %, linha 4, respectivamente). Percebe-se também que nas reações DNA, Cu<sup>2+</sup>, 5-HPMU 0,5 e 1 mM com Chelex<sup>®</sup> ainda há uma pequena porcentagem da forma SC (7,5 %, linha 5 e 3,6 %, linha 6, respectivamente), diferentemente das reações sem Chelex<sup>®</sup>. Isto indica que o tratamento

dos solventes com Chelex<sup>®</sup> preveniu o aumento da forma OC, devido à presença de metais contaminates.

Na figura 4.36B podemos ver claramente uma grande diferença na porcentagem da forma SC tratando e não tratando os solventes com Chelex<sup>®</sup>, tanto para os controles DNA+5-HPMU (0,5 e 1 mM) (amostra 3 e 4) quanto para as reações DNA+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 0,5 e 1 mM (amostra 5 e 6). Como foi explicado no resultado do gel de agarose (Figura 4.36A), a porcentagem da forma SC nos controles tratados com Chelex<sup>®</sup> (amostra 1, 2, 3 e 4) se mantém praticamente constante (aproximadamente 90 %) e diminui drasticamente nas reações tratadas com Chelex<sup>®</sup> (amostra 5 e 6), mas ainda resta uma pequena quantidade da forma SC.



**Figura 4.36** Incubação de pBR322 com 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> em água e tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 não tratados (sem Chelex<sup>®</sup>) e tratados com resina Chelex<sup>®</sup> (com Chelex<sup>®</sup>). Gel de agarose 1 % (A) e porcentagem da forma SC de pBR322 (B).

#### 4.18.2 Efeito do aumento da concentração de íons Cu<sup>2+</sup> na incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu<sup>2+</sup>

O efeito do aumento da concentração de íons  $Cu^{2+}$  (10 e 100 µM) na geração de quebras de fita simples no DNA plasmidial foi estudado através da incubação de pBR322, 5-HPMU (10 µM) e  $Cu^{2+}$  durante 1 h a 37 °C em tampão fosfato de sódio pH 7,4 (Figura 4.37). A exposição de pBR322 a 10 µM de 5-HPMU e crescentes concentrações de  $Cu^{2+}$  (10 e 100 µM) induziu a formação de quebra de fita simples no DNA plasmidial e consequentemente o aumento da forma OC, juntamente com a diminuição da forma SC (linhas 5 e 6, Figura 4.37). O aumento da forma OC indica que possivelmente radicais 5-°OOPMU e 5-°OPMU estão envolvidos na fragmentação do DNA plasmidial.

Na figura 4.37A e B, podemos visualizar que a porcentagem da forma SC nos controles DNA (93,  $4 \pm 0.8$  %, linha 1), DNA+Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M (90,7 ± 3,6 %, linha 2), DNA+Cu<sup>2+</sup> 100  $\mu$ M (86,6 ± 4 %, linha 3), DNA+5-HPMU 10  $\mu$ M (92 ± 1 %, linha 4) foi mantida constante, indicando que não ocorreu formação de quebra de fita simples devido à presença de metal contaminante. No entanto, nas incubações DNA+5-HPMU+Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M (linha 5) e DNA+5-HPMU+Cu<sup>2+</sup> 100  $\mu$ M (linha 6) observou-se uma relevante diminuição na porcentagem da forma SC (68,3 ± 6,5 %, linha 5 e 52,6 ± 5,2 %, linha 6) (Figura 4.37). A diminuição da forma SC e o aumento da forma OC indicam que as espécies reativas formadas na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> podem estar envolvidas no rompimento da ligação fosfodiéster, originando quebra de fita simples da molécula do DNA. A análise dos resultados (Figura 4.37B) mostrou que a diminuição da porcentagem de SC nas reações DNA+5-HPMU+Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M ou 100  $\mu$ M (linhas 5 e 6) é estatisticamente relevante, comparando-se com os controles DNA+Cu<sup>2+</sup> 10 ou 100  $\mu$ M (linhas 2 e 3) (p < 0,001). Além disto, a porcentagem de SC nas reações pBR322+5-

HPMU+Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M (SC: 68,3 ± 6,5 %) ou 100  $\mu$ M (SC: 52,6 ± 5,2 %) é estatisticamente diferente entre si (p < 0,01). Comprovando que o aumento da concentração de Cu<sup>2+</sup> gera um aumento da forma OC e diminuição da forma SC.



**Figura 4.37** Incubação de pBR322 com 5-HPMU (10  $\mu$ M) e Cu<sup>2+</sup> (10, 100  $\mu$ M). Gel de agarose 1 % (A) e porcentagem da forma SC de pBR322 (B). Todas as incubações foram feitas em triplicata e os valores expressos como média ± SEM. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA. \*\*\* estaticamente significativo quando comparado ao grupo controle DNA+ Cu<sup>2+</sup> 10 ou 100  $\mu$ M (p < 0,001). \*\* estaticamente significativo entre si (p < 0,01).

## 4.18.3 Efeito do aumento da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila na incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu<sup>2+</sup>

As conseqüências do aumento da concentração de 5-HPMU na integridade da molécula do DNA plasmidial foram avaliadas através da reação de pBR322,  $Cu^{2+}$  (10 µM) e crescentes concentrações de 5-HPMU (1, 10 e 25 µM) durante 1 h a 37 °C (Figura 4.38). Quando pBR322 foi incubado na ausência de  $Cu^{2+}$  e 5-HPMU (linha 1, Figura 4.38A), na presença de  $Cu^{2+}$  exclusivamente (linha 2, Figura 4.38A) ou na presença de 5-HPMU 1, 10 e 25 µM (linhas 3, 4 e 5, respectivamente) não foi observado aumento da forma OC. No entanto, quando as reações DNA+ $Cu^{2+}$ +5-HPMU foram feitas com 10 µM (linha 7, Figura 4.38A) e 25 µM (linha 8, Figura 4.38A) de 5-HPMU ocorreram aumentos significativos da forma OC em relação aos controles (linhas 3, 4 e 5) eem relação a reação DNA+ $Cu^{2+}$ +5-HPMU 1 µM (linha 6). Além disto, também foi possível observar a forma L na incubação com 25 µM de 5-HPMU (linha 8, Figura 4.38A), indicando que ocorreu formação de quebra de fita dupla do DNA plasmidial. O resultado também deixa evidente que utilizando 5-HPMU em concentrações menores que 10 µM (1 µM, linha 6, Figura 4.38A), não ocorre diminuição significativa da porcentagem de DNA SC. Os resultados destas reações foram mostrados na forma de um gráfico referente a porcentagem da forma SC *versus* a concentração de 5-HPMU (Figura 4.38B).

A análise da figura 4.38B mostra que o aumento da concentração de 5-HPMU (10 e 25  $\mu$ M) na reação DNA, Cu<sup>2+</sup> e 5-HPMU, provocou diminuição significativa da forma SC, comparando-se com os controles (linhas 3, 4 e 5) e também com a reação DNA+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 1  $\mu$ M (linha 6). No entanto, não há diferença significativa na porcentagem da forma SC entre as reações DNA+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10 e 25  $\mu$ M (linhas 7 e 8, respectivamente). Como foi observado nos experimentos variando a concentração de Cu<sup>2+</sup> (Figura 4.37), possivelmente o aumento da

concentração de 5-HPMU produz radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU, que podem ocasionar a fragmentação da molécula do DNA e aumento da forma OC.



**Figura 4.38** Incubação de pBR322 com Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M) e 5-HPMU (1, 10, 25  $\mu$ M). Gel de agarose 1 % (A) e porcentagem da forma SC de pBR322 (B). Todas as incubações foram feitas em triplicata e os valores expressos como média ± SEM. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA. \*\*\* estaticamente significativo quando comparado ao grupo controle DNA e 5-HPMU 1, 10 ou 25  $\mu$ M e quando comparado a reação DNA, 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> 1  $\mu$ M (p < 0,001).

4.18.4 Efeito da atividade enzimática de formamidopirimidina-DNA-glicosilase e endonuclease III no reconhecimento e excisão de bases modificadas, produzidas na incubação de DNA plasmidial, 5-(hidroperoximetil)uracila e Cu<sup>2+</sup>

Com o intuito de descobrir se as espécies reativas, geradas na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> como O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), radicais 5-°OOPMU e 5-°OPMU podem gerar modificação de base da molécula DNA, utilizamos as enzimas FPG e NTH, duas conhecidas enzimas de reparo de purinas e pirimidinas, respectivamente. As enzimas FPG e NTH reparam o DNA por meio de um mecanismo de excisão de base, sendo que ambas possuem atividade glicosilase e AP endonuclease. A atividade glicosilase faz com que a enzima reconheça a base modificada e clive a ligação *N*-glicosídica, gerando sítios apurínicos ou apirimídinicos (AP). A enzima com atividade AP endonuclease reconhece os sítios AP e cliva a ligação fosfodiéster, levando a formação de quebra de fita simples ou dupla do DNA, ou seja, o aparecimento das formas OC e L.

Primeiramente, incubamos por 1 h a 37 °C, pBR322+5-HPMU (10 e 25  $\mu$ M)+Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M). Em seguida, adicionamos as enzimas FPG ou NTH à incubação e mantivemos por mais 0,5 h a 37 °C. A incubação pBR322, 5-HPMU (10 e 25  $\mu$ M) e Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M) sem FPG e NTH também foi feita substituindo as enzimas por água, a qual será denominada no texto e na figura como reação com H<sub>2</sub>O.

Analisando o gel de agarose 1 % (Figura 4.39A) e o gráfico de porcentagem de SC (Figura 4.39B) pode-se ver que nos controles (linhas 1, 2, 3, 4) com H<sub>2</sub>O, com FPG ou com NTH não há diminuição significativa da forma SC. Como foi observado no experimento onde se variou a concentração de 5-HPMU (Figura 4.38), nas reações pBR322, Cu<sup>2+</sup> 10  $\mu$ M e 5-HPMU 10 e 25  $\mu$ M com H<sub>2</sub>O (linhas 5 e 6, Figura 4.39A e B) há uma diminuição significativa na porcentagem da forma SC, comparando com grupos controles (linhas 3 e 4). No entanto, comparando as reações com H<sub>2</sub>O entre si (pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10  $\mu$ M, linha 5 e pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 25  $\mu$ M, linha 6) não observou-se diferença significativa na porcentagem da forma SC, com o aumento da concentração de 5-HPMU. O fato de não existir diferença entre as reações pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10  $\mu$ M e pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 25  $\mu$ M em H<sub>2</sub>O se aplica também as reações realizadas com FPG ou com NTH (linhas 5 e 6, Figura 4.39A e B).

Após a adição da enzima FPG ou NTH, esperávamos observar uma diminuição da forma SC e um aumento da forma OC, devido à presença de purinas ou pirimidinas oxidadas, respectivamente. Comparando-se a reação pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10 µM com H<sub>2</sub>O e com FPG (linha 5, Figura 4.39A e B) é possível observar que houve uma diminuição significativa da forma SC, além do aumento da forma OC e o aparecimento da forma L. No entanto, após comparar a reação pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10 µM com H<sub>2</sub>O e com NTH (linha 5, Figura 4.39A e B) não observamos uma diferença significativa na porcentagem da forma SC e nem na porcentagem da forma OC. Os resultados indicam que ocorreu a oxidação preferencial de purinas em relação a pirimidinas, pois é possível observar uma diminuição significativa na porcentagem da forma SC obtida na incubação com FPG. A presença de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU formados na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> podem ter levado a oxidação da dGuo com formação de 8-oxodGuo e outros produtos secundários da oxidação da 8-oxodGuo (dOz, dOxa e dSp). A presença de 8-oxodGuo foi reconhecida pela enzima FPG, que promoveu a excisão desta lesão, gerando quebra de fita simples e dupla do DNA (Cadet, et al., 2002). A análise das porcentagens da forma SC nas reações pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 25 µM com H<sub>2</sub>O, com FPG ou NTH (linha 6, Figura 4.39A e B) não apresentou diferença considerável, comparando com a incubação pBR322+Cu<sup>2+</sup>+5-HPMU 10 µM com H<sub>2</sub>O, com FPG ou NTH (linha 5, Figura 4.39A e B).

Portanto, os resultados apresentados indicam que a reação de 5-HPMU e  $Cu^{2+}$  pode gerar espécies altamente reativas, como O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU. Estas espécies reativas são conhecidos agentes oxidantes, que podem reagir com DNA e produzir modificação de base e/ou quebra de fita simples ou dupla da molécula do DNA. Portanto, os experimentos utilizando a enzima de reparo FPG demonstram que pode estar ocorrendo a oxidação de dGuo, com a possível geração de 8-oxodGuo.



**Figura 4.39** Incubação de pBR322 com Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M) e 5-HPMU (10, 25  $\mu$ M). Gel de agarose 1 % (A) e porcentagem da forma SC de pBR322 (B). Todas as incubações foram feitas em triplicata e os valores expressos como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados pelo teste Tukey-Kramer e pelo método ANOVA. \*\*\* estaticamente significativo quando comparado ao grupo controle DNA+5-HPMU 10 ou 25  $\mu$ M (p < 0,001). \*\* estaticamente significativo quando comparado entre si (p < 0,01).

DISCUSSÃO

#### 5 Discussão

## 5.1 Síntese e caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila por alaranjado de xilenol, iodometria, HPLC/MS e RMN

Os primeiros trabalhos relatando a formação de peróxidos orgânicos em DNA após exposição à radiação foram publicados por Scholes e Weiss há mais de 50 anos (Scholes e Weiss, 1954). Estudos indicaram que entre as bases do DNA, as pirimidinas são os alvos preferenciais do radical °OH. A exposição de DNA isolado ou componentes do DNA (nucleosídeo ou base nitrogenada) à radiação pode levar a formação de hidroperóxidos estáveis, especialmente de timidina (Scholes, *et al.*, 1956, Scholes e Weiss, 1960, Isildar, *et al.*, 1982). Os hidroperóxidos de timidina correspondem a 5(6)-OOH-6(5)-OH e 5-HPMdU. Estes hidroperóxidos são relativamente estáveis, mas na presença de metais de transição (Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>) e HOCl podem decompor em espécies altamente reativas, como O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais ROO<sup>•</sup> e/ou RO<sup>•</sup> de timina (Tofigh e Frenkel, 1989, Wagner, *et al.*, 1994, Prado, *et al.*, 2009). A formação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais ROO<sup>•</sup> e/ou RO<sup>•</sup> de timina pode ocasionar a propagação do dano oxidativo no DNA e possivelmente, o desenvolvimento de mutações. Diante disto, decidiu-se investigar neste trabalho se o hidroperóxido de timina, 5-HPMU, poderia ser uma fonte de ROS, como O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais 5-°OPMU.

A síntese de 5-HPMU foi realizada em meio ácido a partir do álcool 5-HMU e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Primeiramente, sintetizamos 5-HMU a partir de uracila e paraformaldeído em meio básico e com aquecimento (Cline, *et al.*, 1959). A grande vantagem desta síntese é a baixa complexidade, o elevado valor de rendimento (80 %) e o pequeno número de subprodutos formados. O mecanismo da síntese ocorre *via* formação de um carbânion de uracila, após abstração de um átomo de hidrogênio do carbono  $\alpha$  (C5) adjacente a carbonila. O carbânion pode atuar como um nucleófilo e se adicionar ao carbono da carbonila do paraformaldeído. A análise de 5-HMU por HPLC/MS (Figura 4.1) confirmou que o álcool foi sintetizado com alto grau de pureza.

Posteriormente, 5-HPMU foi sintetizado a partir do álcool 5-HMU na presença de  $H_2O_2$  e HCl (Hahn e Wang, 1976). Segundo o mecanismo proposto por Hahn e Wang, a formação de 5-HPMU ocorre por meio da protonação do grupo –OH do ácool 5-HMU, que posteriormente leva a desidratação da molécula de 5-HMU e formação de um carbocátion. O carbocátion sofre ataque nucleofílico de  $H_2O_2$ , seguido da formação de 5-HPMU (Hahn e Wang, 1976). A síntese de 5-HPMU, a partir da oxidação de 5-HMU na presença de  $H_2O_2$  e HCl, foi realizada com alto valor de rendimento (60 %) e posteriormente, o hidroperóxido 5-HPMU foi purificado por HPLC.

Os testes de detecção de 5-HPMU pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria (item 4.6, Resultados) e as análises por HPLC/MS (Figura 4.2) e RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC) (Figuras A-1 a A-4, Anexos) confirmaram a estrutura de 5-HPMU. A análise de 5-HPMU por HPLC/MS (Figura 4.2) mostrou a presença minoritária dos produtos 5-HMU e 5-FoU, que são considerados produtos de decomposição de 5-HPMU (Wagner, et al., 1994). Além disto, a presença de 5-HPMU também foi confirmada através de sua redução a seu álcool correspondente (5-HMU), na presença de NaBH<sub>4</sub>. A análise por HPLC/MS (Figura 4.3) do produto da reação de 5-HPMU e NaBH<sub>4</sub> mostrou claramente a formação do álcool 5-HMU com tempo de retenção diferente (6,28 min) de 5-HPMU (7,54 min). Portanto, a redução de 5-HPMU a 5-HMU na presença de 5-HPMU foi obtida através da análise de 5-HPMU por RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC) (Figuras A-1 a A-4, Anexos). Os deslocamentos químicos (ppm) obtidos estão em concordância com os deslocamentos químicos relatados na literatura (Wagner, et al., 1994).

# 5.2 Análise da diferença da concentração de 5-(hidroperoximetil)uracila obtida pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria

A concentração de 5-HPMU foi medida pelos métodos alaranjado de xilenol e iodometria. Os resultados mostraram que a concentração obtida por alaranjado de xilenol (5,7  $\pm$  0,1 mM) é 1,7 vezes inferior a concentração obtida por iodometria (10  $\pm$  0,8 mM). O método da iodometria se baseia no princípio de que para cada mol de ROOH reduzido por íons  $\Gamma$ , gera-se um mol de I<sub>2</sub> (equações 10 e 11). A estequiometria 1:1, ou seja, um mol de ROOH gera um mol de I<sub>2</sub>, confere a iodometria grande vantagem em relação ao método alaranjado de xilenol. O método alaranjado de xilenol baseia-se no princípio de oxidação de íons Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>, e formação do complexo Fealaranjado de xilenol (equações 12 e 13). Estudos têm demonstrado que o número de íons Fe<sup>3+</sup> gerado para cada grupo –OOH difere para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos de proteína, hidroperóxidos de lipídeo , *t*-BuOOH e CuOOH (Gay, *et al.*, 1999). A análise dos resultados indicou que para cada mol de hidroperóxido de proteína ou hidroperóxido de lipídeo é formado de 1,8 a 2,1 mols de Fe<sup>3+</sup> (Gay, et al., 1999). Esta proporção de ROOH para íons Fe<sup>3+</sup> gerados deve-se a um mecanismo tipo Fenton, em que a reação de ROOH e íons Fe<sup>2+</sup> pode gerar radicais RO<sup>•</sup> e íons Fe<sup>3+</sup> (equação 15). Os radicais RO<sup>•</sup> produzidos podem reagir com o excesso de íons Fe<sup>2+</sup> e gerar mais íons Fe<sup>3+</sup> e o álcool ROH (equação 16).

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-} + RO^{\bullet}$$
 (equação 15)  
$$Fe^{2+} + RO^{\bullet} + H^{+} \rightarrow Fe^{3+} + ROH$$
 (equação 16)

Portanto, a diferença nas concentrações obtidas pelos dois métodos deve-se aos diferentes mecanismos de reação de 5-HPMU e íons  $\Gamma$  ou Fe<sup>2+</sup>. Provavelmente, o mecanismo de reação de 5-HPMU e íons Fe<sup>2+</sup> têm a participação de radicais RO<sup>•</sup>. Diante disto, optamos por quantificar 5-

HPMU pelo método alaranjado de xilenol, devido a sua baixa complexidade e posteriormente, multiplicamos a concentração de 5-HPMU obtida pelo valor numérico 1,7.

#### 5.3 Avaliação da estabilidade térmica de 5-(hidroperoximetil)uracila

Estudos demonstraram que os hidroperóxidos de timidina, 5(6)-OOH-6(5)-OH e 5-HPMdU são compostos estáveis em água (Wagner, et al., 1994). Diante disto, analisamos a estabilidade do hidroperóxido de timina, 5-HPMU, em água e em diferentes temperaturas (4, 25, 37 e 50 °C) durante 292 h (12 dias). A concentração de 5-HPMU inicial e após sucessivos períodos de incubação foi medida pelo método alaranjado de xilenol (Figura 4.4), O produto de decomposição formado em 4, 25, 37 e 50 °C foi analisado posteriormente por HPLC/MS (Figuras 4.5 e 4.6).

A análise dos resultados mostrou que 5-HPMU não apresentou decomposição significativa quando mantido a 4 e 25 °C durante 292 h (Figura 4.4A e 4.4B). A grande estabilidade térmica de 5-HPMU pôde ser confirmada através do valor da concentração de 5-HPMU obtido após 292 h de incubação a 4 °C (2,2 mM) e a 25 °C (2,13 mM). Nestas duas temperaturas, a concentração de 5-HPMU não diminuiu de forma significativa, comparando-se com o valor da concentração inicial (3 mM para 4 °C e 2,91 mM para 25 °C). Já em 37 e 50 °C, observou-se uma cinética de decomposição de 5-HPMU mais rápida (Figura 4.4A e 4.4B). Após 8 h, a decomposição de 5-HPMU a 50 °C foi significantemente mais expressiva que em 37 °C. Após 292 h de incubação a 37 e 50 °C, a concentração de 5-HPMU obtida foi consideravelmente inferior (0,78 mM para 37 °C e 0,71 mM para 50 °C) a concentração inicial (3,1 mM para 37 °C e 2,9 mM para 50 °C). Portanto, podemos concluir que 5-HPMU pode ser considerado um peróxido estável quando armazenado a 4 °C ou mantido a temperatura ambiente (25 °C). No

entanto, quando submetido a aquecimento (37 e 50 °C), 5-HPMU mostrou-se pouco estável, podendo decompor rapidamente. Esta decomposição térmica também foi observada em outros hidroperóxidos biológicos, como hidroperóxidos de timidina (Wagner, *et al.*, 1994) e hidroperóxidos de triptofano (Ronsein, *et al.*, 2008, Ronsein, *et al.*, 2009). Os possíveis produtos de decomposição térmica de hidroperóxidos orgânicos são os alcoóis correspondentes, além de outros produtos formados de maneira minoritária (Wagner, *et al.*, 1994, Ronsein, *et al.*, 2008, Ronsein, *et al.*, 2009).

O produto de decomposição de 5-HPMU em água nas diferentes temperaturas (4, 25, 37 e 50 °C) foi analisado por HPLC/MS (Figuras 4.5 e 4.6). O resultado obtido por HPLC/MS, após 292 h de decomposição de 5-HPMU a 4 e 25 °C (292 h) (Figuras 4.5B e 4.5C, respectivamente), mostra que há um intenso pico em 7,5 min, que corresponde ao peróxido 5-HPMU. Este resultado (Figuras 4.5B e 4.5C) é coerente com o resultado obtido pelo método alaranjado de xilenol (Figuras 4.4A e 4.4B), que demonstrou uma decomposição de 5-HPMU pouco expressiva após 292 h de incubação a 4 e 25 °C. No entanto, quando submetido a aquecimento (37 °C e 50 °C) (Figuras 4.5D e 4.5E, respectivamente), 5-HPMU decompõe rapidamente ao álcool correspondente (5-HMU). A formação de 5-HMU ficou evidente através do aumento da intensidade de absorção do pico em 6,47 min e da diminuição da intensidade do pico de 5-HPMU em 7,5 min (Figuras 4.5D e 4.5E). O espectro de massa (Figura 4.6B) após 292 h de incubação a 37 °C mostra os íons característicos do álcool 5-HMU.

Analisando os resultados, podemos concluir que 5-HPMU pode ser considerado um hidroperóxido estável. O resultado obtido é similar ao obtido por Wagner e colaboradores (Wagner, et al., 1994), que estudaram a decomposição térmica dos hidroperóxidos de timidina em água. Eles concluíram que o hidroperóxido 5-HPMdU é mais estável que os demais hidroperóxidos de timidina, pois sua meia-vida de decomposição é 40 vezes superior. Portanto, devido à grande estabilidade de 5-HPMU, este hidroperóxido pode representar uma provável fonte de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e/ou radicais 5-°OOPMU e 5-°OPMU na molécula do DNA. Consequentemente, aumentando a probabilidade de desenvolvimento de danos oxidativos no DNA.

#### 5.4 Geração de oxigênio molecular singlete na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons Ce<sup>4+</sup>: Confirmação do mecanismo de Russell

Em 1957, Russell e colaboradores (Russell, 1957) foram os primeiros a propor que a reação de dois radicais peroxila primários ou secundários (ROO<sup>•</sup>), provenientes da oxidação de alquilhidroperóxido com hidrogênio alfa (H $\alpha$ ), poderia gerar um intermediário tetraóxido linear (ROOOOR) (Figura 5.1). A decomposição do intermediário ROOOOR ocorreria de forma lenta e irreversível através de um mecanismo cíclico, gerando oxigênio molecular, um álcool (ROH) e um composto carbonílico (RO) (Figura 5.1). Após alguns anos, Howard e Ingold (Howard e Ingold, 1968) demonstraram a geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ), na reação de terminação de dois radicais *sec*-alquilperoxila, através de um mecanismo de decomposição cíclico de ROOOOR, proposto anteriormente por Russell (Figura 5.1).



Figura 5.1 Mecanismo de Russell proposto para reação de terminação de radicais sec-alquilperoxila.

Recentemente, foi demonstrado que a reação de LAOOH contendo H $\alpha$  e Ce<sup>4+</sup>, peroxinitrito ou HOCl pode gerar O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>), através do mecanismo de Russell (Miyamoto, *et al.*, 2003, Miyamoto, *et al.*, 2003, Miyamoto, *et al.*, 2006). A geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) a partir de LAOOH é extremamente importante, pois mostra que hidroperóxidos de lipídeos podem ser fontes biológicas de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Entretanto, conhece-se pouco sobre a geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) próximo a molécula de DNA, ou seja, sobre uma possível fonte biológica de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>). Diante disto, o hidroperóxido de timina, 5-HPMU, foi testado como possível fonte de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) na presença de íons Ce<sup>4+</sup>. Além da geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) a partir de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, decidimos estudar se esta espécie reativa poderia ser gerada através do mecanismo de Russell. Como há estudos recentes confirmando a geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) a partir de Ce<sup>4+</sup> e LAOOH *via* mecanismo de Russell, investigamos a possibilidade de formação de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> através deste mecanismo. É importante ressaltar que não há estudos demonstrando a geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) a partir de hidroperóxidos de DNA, nem tão pouco sobre o mecanismo experimental envolvido na formação desta espécie reativa.

A geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi confirmada através do (i) monitoramento da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm); (ii) monitoramento da emissão de luz bimolecular na região do visível ( $\lambda = 634$  e 703 nm); (iii) aquisição do espectro de emissão de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na região do IR-próximo e (iv) detecção por HPLC/MS dos produtos de decomposição de 5-HPMU, o álcool 5-HMU e o aldeído 5-FoU.

Os experimentos de monitoramento de emissão de luz monomolecular de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na região do IR-próximo (Figura 4.8, traço a) e na região do visível (Figura 4.12, traço a) foram realizados utilizando solvente deuterado (D<sub>2</sub>O), no qual o valor de meia-vida de O<sub>2</sub> ( $^1\Delta_g$ ) é superior (68,1 ± 2,5 µs) ao de H<sub>2</sub>O (4 µs) (Ogilby e Foote, 1983). Alternativamente, monitoramos a emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na presença da mistura D<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O (35:65, v/v) (Figuras 4.8 e 4.12, traço d) e observamos uma diminuição na intensidade da luz emitida. O decréscimo da intensidade da luz emitida é resultante do menor valor de meia-vida de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em H<sub>2</sub>O e confirma a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figuras 4.8 e 4.12). Uma comprovação adicional da geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi obtida ao utilizar o conhecido supressor físico de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), NaN<sub>3</sub> (Li, *et al.*, 2001) (Figuras 4.8 e 4.12, traços b e c). A diminuição na emissão de luz monomolecular ( $\lambda = 1270$  nm) e bimolecular ( $\lambda = 634$  e 703 nm) deve-se a desativação do O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) ao estado fundamental, induzida por NaN<sub>3</sub> através de um mecanismo de transferência de carga. A evidência inequívoca da geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> foi obtida por meio da aquisição do espectro de emissão na região do IRpróximo (Figura 4.11A). O espectro adquirido possui uma banda de emissão com intensidade máxima em 1270 nm, característica do decaimento monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ). Este espectro é igual ao espectro obtido na reação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl (Figura 4.11C) e na decomposição térmica do endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> (Figura 4.11D), conhecidas fontes de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ).

O rendimento de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) obtido na reação de radicais peroxila pode auxiliar na elucidação do mecanismo de geração desta espécie reativa. A decomposição do intermediário tetraóxido linear através de um mecanismo cíclico, pode originar oxigênio molecular, um álcool e um composto carbonílico, conforme foi proposto por Russell (Russell, 1957). Neste mecanismo, pode ser produzido oxigênio molecular no estado excitado singlete ou cetona no estado excitado triplete (Figura 1.4) (Howard e Ingold, 1968, Mendenhall, *et al.*, 1991). Se for produzida cetona no estado excitado triplete, pode ocorrer transferência de energia para uma molécula de  $O_2$  ( ${}^3\Sigma_g$ ), gerando  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) e cetona no estado fundamental (Figura 1.4). Niu e Mendehall (Niu e Mendehall, 1992) propuseram que a geração indireta de  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) através de transferência de

energia de uma cetona excitada para  $O_2({}^{3}\Sigma_{g})$  pode ocorrer com rendimento de pelo menos 30 %, dependendo da cetona. Entretanto, o rendimento de geração de cetona excitada triplete na decomposição do intermediário tetraóxido linear é baixo (< 0,1 %), tornando pouco provável a geração indireta de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) a partir de cetona excitada triplete (Mendenhall, *et al.*, 1991). Já o rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) gerado a partir da decomposição do intermediário tetraóxido linear via mecanismo de Russell, pode variar de 3,4 a 14 % (Niu e Mendenhall, 1990, Niu e Mendenhall, 1992). Diante disto, foi estudado o rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) gerado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.10), com o objetivo de se obter evidências adicionais da geração desta espécie reativa através do mecanismo de Russell. O rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) foi calculado comparando-se a emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) ( $\lambda = 1270$  nm) produzida na reação de 5-HPMU e Ce4+ com a emissão de luz gerada na decomposição térmica do endoperóxido DHPNO2 (Figura A-5, Anexos). Os resultados de cinética de emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) utilizando crescente concentração de Ce<sup>4+</sup> mostraram que a intensidade da luz emitida atinge um valor máximo em 10 mM de Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.10). Nesta concentração de Ce<sup>4+</sup>, foi obtido  $156 \pm 3 \mu$ M de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ), que corresponde a um rendimento de 17,7 ± 0,4 %. Considerando que o rendimento de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) obtido (17,7 ± 0,4 %) está próximo do rendimento proposto por Niu e Mendehall (3,4 a 14 %), podemos concluir que a formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Ce $^{4+}$  ocorre diretamente através do mecanismo de Russell, ou seja, sem a participação expressiva de uma cetona no estado excitado triplete. Uma prova adicional da formação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), *via* mecanismo de Russell foi obtida através da detecção por HPLC/MS dos produtos de decomposição 5-HMU e 5- FoU (Figuras 4.29-4.31).

Os resultados obtidos forneceram provas inequívocas da formação de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, através do mecanismo de Russell. Neste mecanismo, a decomposição de 5-

HPMU catalisada por Ce<sup>4+</sup> pode gerar radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU, que podem reagir entre si e produzir um intermediário tetraóxido linear. A decomposição do intermediário tetraóxido linear *via* um mecanismo cíclico produz O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ), o álcool 5-HMU e o aldeído 5-FoU (Figura 5.2).



**Figura 5.2** Mecanismo proposto para geração de  $O_2({}^{1}\Delta_g)$  na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>. A reação produz radicais 5-<sup>o</sup>OOPMU, que podem reagir entre si e gerar  $O_2({}^{1}\Delta_g)$ , o álcool (5-HMU) e o aldeído (5-FoU).

## 5.5 Geração de oxigênio molecular singlete na reação de 5-(hidroperoximetil)uracila e ácido hipocloroso, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>

Após ser demonstrada a geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, o objetivo do trabalho foi focalizado em investigar se o  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) poderia ser formado na reação de 5-HPMU e compostos presentes no meio biológico, como HOCl, Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.

Primeiramente, foi testado HOCl que é produzido por neutrófilos ativados durante infecção crônica e inflamação (Lau e Baldus, 2006). Estudos têm mostrado que HOCl pode gerar um grande número de modificações nas bases do DNA, especialmente nas pirimidinas (Prutz, 1998, Winterbourn e Kettle, 2000). Devido a grande importância de HOCl no meio biológico,

investigamos a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl. Como na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figuras 4.8 e 4.12, traço a), observamos uma intensa emissão de luz monomolecular ( $\lambda =$ 1270 nm) (Figura 4.14, traço a) e bimolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) ( $\lambda = 634$  e 703 nm) (Figura 4.17, traço a) na reação de 5-HPMU e HOCl. Além disto, também foi observado a supressão de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na presença de NaN<sub>3</sub> (Figuras 4.14 e 4.17, traços b e c) ou da mistura H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (65:35, v/v) (Figuras 4.14 e 4.17, traço d). O rendimento de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) obtido na reação de 5-HPMU e HOCl (10 mM) foi de 18,1  $\pm$  0,5 %, que corresponde a 159  $\pm$  5  $\mu$ M (Figura 4.16). Este rendimento (18,1  $\pm$  0,5 %) é muito próximo do rendimento obtido na reação de 5-HPMU e  $Ce^{4+}$  (17,7 ± 0,4 %) e comparável ao rendimento obtido na reação de LAOOH e HOCl (Miyamoto, et al., 2006). O espectro de emissão de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) gerado na reação de 5-HPMU e HOCl possui absorção máxima em 1270 nm (Figura 4.11B), igualmente como os espectros produzidos pelas conhecidas fontes de  $O_2$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl (Figura 4.11C) e decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub> (Figura 4.11D). A aquisição do espectro de emissão de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) confirmou a geração desta espécie reativa na reação de 5-HPMU e HOCl. A detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> (Figura 4.23) e dos produtos 5-HMU e 5-FoU (Figuras 4.32 e 4.33) mostraram a formação de  $O_2$  (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl. Os resultados obtidos forneceram provas conclusivas da geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl.

Recentemente, Miyamoto e colaboradores (Miyamoto, et al., 2006) demonstraram que a geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de LAOOH e HOCl possui participação de radicais ROO<sup>•</sup>. A formação de radicais ROO<sup>•</sup> através da oxidação de hidroperóxidos por um elétron não é termodinamicamente favorárel, pois HOCl possui um baixo potencial de redução em pH 7 (0,17-0,25 V) (Koppenol, 1994). No entanto, a formação de radicais peroxila de LAOOH pode ocorrer *via* transferência de um átomo de cloro de HOCl para LAOOH, formando um intermediário

clorado instável (LAOOCl). Esta transferência de um átomo de cloro também foi observada na reação de HOCl e tióis (Davies e Hawkins, 2000) ou aminas (Hawkins e Davies, 1998, Hawkins e Davies, 1998). O intermediário clorado pode decompor homoliticamente em radical alcoxila de LAOOH (LAO<sup>•</sup>) e radical hipoclorito (<sup>•</sup>OCl) ou em radical peroxila (LAOO<sup>•</sup>) e radical de cloro (Cl<sup>•</sup>). Os radicais Cl<sup>•</sup> (Wardman, 1989) e LAO<sup>•</sup> (Koppenol, 1990) são fortes agentes oxidantes e podem oxidar LAOO<sup>+</sup>. Os radicais LAOO<sup>+</sup> formados podem reagir entre si, gerar um intermediário tetraóxido e consequentemente formar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) via mecanismo de Russell. De forma análoga, a geração de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl pode ocorrer via um mecanismo de transferência de átomo de cloro de HOCl para 5-HPMU, formando um intermediário clorado de 5-HPMU (equação 17), que após decomposição pode gerar os radicais 5-OPMU e OCl (equação 18) e/ou o radical 5-OOPMU e o radical Cl (equação 19). Como foi proposto que radicais alcoxila podem abstrair átomos de hidrogênio de alquihidroperóxidos ( $\Delta G^{\circ'}$ = - 14 kcal/mol) (Koppenol, 1990), o radical 5-<sup>•</sup>OPMU pode abstrair um átomo de hidrogênio de uma molécula intacta de 5-HPMU e gerar mais radicais 5-OOPMU. Além disto, os radicais 'OCl e 'Cl formados também podem abstrair um átomo de hidrogênio de uma molécula de 5-HPMU e gerar o radical 5-°OOPMU. Os radicais 5-°OOPMU formados, seja pela decomposição direta do intermediário clorado ou pela a ação dos radicais 5-OPMU, OCl e Cl, podem reagir entre si e finalmente produzir  $O_2({}^{1}\Delta_g)$  através do mecanismo de Russell. Portanto, a decomposição de 5-HPMU na presença de HOCl pode formar espécies altamente reativas como O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) e radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU. Estas espécies reativas podem reagir com a molécula de DNA e levar a uma propagação do dano oxidativo, através da formação de bases oxidadas.

$\text{5-HPMU} + \text{HOCI} \rightarrow \text{5-CIPMU} + \text{H}_2\text{O}$	(equação 17)
$5\text{-CIPMU} \rightarrow 5\text{-}^{\circ}\text{OPMU} + ^{\circ}\text{OCI}$	(equação 18)
5-CIPMU $\rightarrow$ 5-°OOPMU + °CI	(equação 19)

Muitos processos oxidativos, como peroxidação lipídica e oxidação de proteínas podem produzir radical ROO<sup>•</sup>. Segundo a literatura (Pryor, 1986), o radical ROO<sup>•</sup> formado pode difundir e atacar uma molécula de DNA "distante" da fonte geradora do radical ROO<sup>•</sup>. Esta capacidade dos radicais ROO<sup>•</sup> de oxidar alvos biológicos "distantes" deve-se ao alto valor de meia-vida (7 s) desta espécie reativa (Pryor, 1986). A presença de radicais peroxila de lipídeos têm sido relacionada a níveis aumentados de 8-oxodGuo em DNA nuclear e mitocondrial (Remmen e Richardson, 2001). Além disto, a timina também pode ser alvo de radicais peroxila de lipídeos. Mulheres com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados e com alto risco de desenvolvimento de câncer de mama apresentaram altos níveis de 5-HMdU, um produto de decomposição do hidroperóxido de timidina, 5-HPMdU (Djuric, *et al.*, 2001, Djuric, *et al.*, 2001). Além disto, também foi possível detectar 5-HMdU na urina de fumantes (Bianchini, *et al.*, 1998) e na urina de pacientes portadores de carcinoma (Faure, *et al.*, 1998).

Além da peroxidação lipídica, a oxidação de proteína também pode induzir a formação de danos oxidativos no DNA. Os hidroperóxidos de proteína podem decompor em radicais ROO<sup>•</sup> e RO<sup>•</sup> na presença de íons metálicos (Furukawa, *et al.*, 2005). Luxford e colaboradores (Luxford, *et al.*, 1999, Luxford, *et al.*, 2000) demonstraram que hidroperóxidos de histonas e outros hidroperóxidos de proteínas decompõem na presença de íons metálicos gerando radicais de proteínas. Estes radicais de histonas e proteínas reagem com pirimidinas e nucleosídeos formando adutos. Estudos têm mostrado que hidroperóxidos de proteína e lipídeo podem ser importantes

fontes de radicais ROO<sup>•</sup>. Desta forma, os radicais ROO<sup>•</sup> derivados de lipídeos e proteínas podem oxidar a timina e gerar hidroperóxidos de timina. Martini e Termini (Martini e Termini, 1997) mostraram que 5-HPMdU é formado na reação de radicais ROO<sup>•</sup> e timidina. A detecção de produtos de oxidação de timidina, formados na presença de radicais ROO<sup>•</sup> sugere uma importante função oxidativa para os radicais peroxila de lipídeo e proteína.

Recentemente, Goto e colaboradores (Goto, *et al.*, 2008) mostraram que o radical peroxila de timidina, formado na reação de timidina e radical peroxila de 2,2'-azobis(amidinopropano) (AAPH), pode reagir com dGuo e gerar 8-oxodGuo. Alternativamente, o radical peroxila de timidina também pode ser formado a partir de radical peroxila de lipídeo ou proteína. Uma vez formado, o radical peroxila de timidina reage com dGuo e gera um dímero instável. Este dímero decompõe em 8-oxodGuo e 5-HMdU. De maneira alternativa, a reação de dois radicais peroxila de timidina adjacentes ou a reação de um radical peroxila de timidina e um radical peroxila de lipídeo ou proteína pode gerar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) através do mecanismo de Russell. Portanto, os resultados mostraram que o radical peroxila de timidina é capaz de oxidar a dGuo e gerar 8-oxodGuo (Goto, *et al.*, 2008).

O hidroperóxido 5-HPMU pode ser formado na exposição do DNA a radiação UVA (Delatour, *et al.*, 1998, Ravanat, *et al.*, 2001), na reação de timina e radical <sup>•</sup>OH (Cadet, 2006), na reação de radical peroxila e timina (Martini e Termini, 1997), ou na reação de radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e um doador de hidrogênio (Douki, *et al.*, 2002). Este hidroperóxido é estável, mas na presença de íons metálicos pode decompor em radical peroxila e alcoxila. Tofigh e Frenkel estudaram os efeitos de íons metálicos livres e quelados na decomposição de 5-HPMdU (Tofigh e Frenkel, 1989). Eles observaram que na presença de Fe<sup>2+</sup>, ocorria a decomposição instantânea de 5-HPMdU a seu álcool (5-HMdU) e aldeído (5-FodU). Já a decomposição de 5-HPMdU na presença íons Cu<sup>2+</sup> foi dependente do tempo de reação e gerou majoritariamente o aldeído 5-FodU. A geração destes compostos pode envolver a formação de radicais centrados no átomo de oxigênio. Estudos têm demonstrado que íons metálicos, como Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, estão ligados ao grupo fosfato do DNA e a alguns aminoácidos de proteínas (Sagripanti, *et al.*, 1991, Colwell e Morris, 2003, Noblitt, *et al.*, 2007). Considerando este fato, decidimos estudar se o O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) poderia ser gerado na reação de 5-HPMU e íons Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. Esta hipótese foi confirmada através da detecção por HPLC/MS/MS do endoperóxido AVSO<sub>2</sub> (Figuras 4.24D e 4.25D) (Nardello, et al., 2005) e do monitoramento da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$ nm) (Figuras 4.19). A detecção direta de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) através da emissão de luz monomolecular na região do IR-próximo foi possível somente na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> (Figura 4.19). Provavelmente, isto deve-se ao alto valor de meia-vida de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) em ACN-*d<sub>3</sub>* (600 ± 33 µs) (Ogilby e Foote, 1983) e ao fato do íon Fe<sup>2+</sup> ser um bom agente redutor (E<sup>o\*</sup>Fe(III)/Fe<sup>2+</sup> = 0,11 V) (Halliwell, 2007). Já na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> não foi possível detectar O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) através da emissão de luz monomolecular (Figura 4.20), provavelmente devido ao limite de detecção do equipamento.

Além de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), detectamos por HPLC/MS os produtos da reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> (Figuras 4.34 e 4.35, respectivamente). Como na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.29) ou HOCl (Figura 4.32), foi possível detectar o álcool 5-HMU e o aldeído 5-FoU, gerados na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. A diferença na concentração utilizada dos metais e na proporção obtida de 5-HMU e 5-FoU deve-se a diferente reatividade dos metais e aos diferentes mecanismos de decomposição de 5-HPMU na presença de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> (equações 20-24, Figura 5.3).

A formação de 5-HMU e 5-FoU na reação de 5-HPMU Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> possui envolvimento de intermediários reativos, como radicais 5-'OOPMU e 5-'OPMU (Figura 5.3). O radical 5-'OOPMU pode ser formado na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup> (equação 20) (Termini, 2000). Um mecanismo alternativo de geração de radical 5-'OOPMU envolve a oxidação de Cu<sup>2+</sup> por 5-HPMU, gerando Cu<sup>3+</sup> e radical 5-'OPMU (equação 21) (Jones e Burkitt, 2003). De forma similar, Fe<sup>2+</sup> pode reagir com 5-HPMU e produzir radical 5-'OPMU e Fe<sup>3+</sup> (equação 22) (Guo, *et al.*, 2003). O radical alcoxila de 5-HPMU formado na reação com Cu<sup>2+</sup> (equação 21) ou Fe<sup>2+</sup> (equação 22) pode então, abstrair um átomo de hidrogênio de 5-HPMU, gerando radical 5-'OOPMU e o álcool 5-HMU (equação 23). O Fe<sup>3+</sup> formado também pode reagir com outra molécula de 5-HPMU, regenerar Fe<sup>2+</sup> e produzir o radical 5-'OOPMU (equação 24). Uma vez formados, os radicais 5-'OOPMU podem reagir entre si e gerar O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) *via* mecanismo de Russell. Esta seria a explicação para a detecção de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> (Figuras 4.24 e 4.25, respectivamente).

Os resultados obtidos confirmam que o  $O_2 ({}^1\Delta_g)$  pode ser gerado na reação de 5-HPMU e HOCl, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. Concomitante a formação de  $O_2 ({}^1\Delta_g)$ , a decomposição de 5-HPMU na presença de HOCl, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup> também pode produzir radicais peroxila e alcoxila de 5-HPMU. Como observado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> ou HOCl, a formação destas espécies reativas pode ocasionar o desenvolvimento de danos oxidativos ao DNA e consequentemente desenvolvimento de mutações e doenças.

$$\begin{split} & \mathsf{Cu}^{2+} + 5\text{-}\mathsf{HPMU} \to \mathsf{Cu}^{+} + \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OOPMU} + \mathsf{H}^{+} & (\mathsf{equa}\ \mathsf{ca}\ \mathsf{o}\ \mathsf{20}) \\ & \mathsf{Cu}^{2+} + 5\text{-}\mathsf{HPMU} \to \mathsf{Cu}^{3+} + \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OPMU} + \mathsf{OH}^{-} & (\mathsf{equa}\ \mathsf{ca}\ \mathsf{o}\ \mathsf{21}) \\ & \mathsf{Fe}^{2+} + 5\text{-}\mathsf{HPMU} \to \mathsf{Fe}^{3+} + \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OPMU} + \mathsf{OH}^{-} & (\mathsf{equa}\ \mathsf{ca}\ \mathsf{o}\ \mathsf{22}) \\ & \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OPMU} + 5\text{-}\mathsf{HPMU} \to \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OOPMU} + 5\text{-}\mathsf{HMU} & (\mathsf{equa}\ \mathsf{ca}\ \mathsf{o}\ \mathsf{23}) \\ & \mathsf{Fe}^{3+} + 5\text{-}\mathsf{HPMU} \to \mathsf{Fe}^{2+} + \mathsf{radical} \ 5\text{-}^{\bullet}\mathsf{OOPMU} + \mathsf{H}^{+} & (\mathsf{equa}\ \mathsf{ca}\ \mathsf{o}\ \mathsf{24}) \end{split}$$

Figura 5.3 Possíveis mecanismos de decomposição de 5-HPMU na presença de Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup>.

#### 5.6 Lesões oxidativas produzidas em DNA plasmidial na presença de 5-(hidroperoximetil)uracila e íons $Cu^{2+}$

A molécula de DNA é conhecidamente alvo de ROS geradas no metabolismo celular. Estudos têm mostrado que entre as ROS,  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) e os radicais ROO<sup>•</sup> e RO<sup>•</sup> possuem relevante participação nos danos oxidativos produzidos no DNA (Cadet, 2006). Entre as bases do DNA, a dGuo é o alvo preferencial de ROS, pois possui o menor potencial de redução (1,1-1,24 V) em pH 7 (Burrows e Muller, 1998). Como a dGuo é a base do DNA com o menor potencial de redução, ela é a única que possui significante reatividade em relação ao  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) (Martinez, *et al.*, 2002, Ravanat, *et al.*, 2006). A dGuo também pode ser oxidada por radical ROO<sup>•</sup>, como radical peroxila de lipídeo (Adam, *et al.*, 2000, Remmen e Richardson, 2001, Lim, *et al.*, 2004), radical peroxila de proteína (Luxford, *et al.*, 1999, Luxford, *et al.*, 2000) ou radical peroxila de timina (Goto, *et al.*, 2008). Tanto na oxidação de dGuo por  $O_2$  ( ${}^1\Delta_g$ ) quanto por radical ROO<sup>•</sup>, o principal produto formado é 8-oxodGuo.

Como foi demonstrado que 5-HPMU é uma fonte estável de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) e radicais 5-OOPMU e 5-OPMU, decidimos estudar se estas espécies reativas poderiam causar fragmentação direta ou modificação de base na molécula do DNA plasmidial (pBR322). Os resultados de captação química de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) com AVS (Figura 4.25) mostraram que a reação de 5-HPMU e íons Cu<sup>2+</sup> gera O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), possivelmente através de um mecanismo envolvendo a formação de radical 5-<sup>•</sup>OOPMU e/ou radical 5-<sup>•</sup>OPMU (equações 20 e 21, Figura 5.3). Estes radicais são altamente reativos (Koppenol, 1990), pois possuem um alto potencial de redução (E<sup>o</sup>' ROO<sup>•</sup>, H<sup>+</sup>/ROOH = 1 V; E<sup>o</sup>' RO<sup>•</sup>, H<sup>+</sup>/ROH = 1,6 V). Além disto, estudos mostram que a especificidade dos radicais ROO<sup>•</sup> e RO<sup>•</sup> está relacionada a um alto valor de meia-vida (meia-vida ROO<sup>•</sup> = 7 s; meia-vida RO<sup>•</sup> = 10<sup>-6</sup> s) (Pryor, 1986), tornando possível a difusão destes radicais e o ataque a alvos "distantes". Devido à alta reatividade e especificidade dos radicais ROO<sup>•</sup> e RO<sup>•</sup>, danos oxidativos, como modificação de base, quebra de fita, formação de sítios AP ou formação de adutos com as bases têm sido observados por inúmeros grupos de pesquisa (Burrows e Muller, 1998, Cadet, *et al.*, 2002, Douki, *et al.*, 2002, Hong, *et al.*, 2007, Goto, *et al.*, 2008).

Os resultados da incubação de pBR322, 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup>, variando a concentração do metal (10 e 100 µM) (Figura 4.37) ou utilizando solventes tratados com Chelex<sup>®</sup> (Figura 4.36), mostraram claramente o aumento da forma OC e a diminuição da forma SC. O aumento da porcentagem da forma OC está relacionada a maior produção de radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e/ou 5-<sup>•</sup>OPMU, que podem ocasionar quebra de fita simples do DNA. Resumidamente, o mecanismo de formação de quebra de fita simples e dupla do DNA é iniciado pela abstração de um dos sete átomos de hidrogênio da desoxirribose, levando a formação de um radical centrado no átomo de carbono. Após subsequentes reações, ocorre clivagem das ligações *N*-glicosídica e fosfodiéster, gerando as formas OC e L (Pogozelski e Tullius, 1998). Portanto, como os radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e/ou 5-<sup>•</sup>OPMU são fortes agentes oxidantes, eles podem facilmente abstrair um dos átomos de hidrogênio da desoxirribose e gerar as formas OC e L. Não foi investigado neste trabalho qual átomo de hidrogênio da desoxirribose foi abstraído pelos radicais de 5-HPMU. Sabe-se que há uma preferência do radical <sup>•</sup>OH em abstrair os átomos de hidrogênio da desoxirribose (H-5'>H-4'>H-3'≈H-2'≈H-1') (Balasubramanian, *et al.*, 1998). A facilidade de abstração é influenciada pela força da ligação C-H e pela acessibilidade do átomo de hidrogênio. No entanto, não sabemos qual dos átomos de hidrogênio abstraído foi responsável pela formação de quebra de fita do DNA. Resultados similares de formação de quebra de fita simples e dupla também foram relatados por outros autores na incubação de DNA plasmidial com hidroperóxido de lipídeo (Yang e Schaich, 1996), com radical peroxila de AAPH (Harkin e Burcham, 1997) e com hidroperóxido de timidina (Martini e Termini, 1997).

Os resultados variando a concentração de 5-HPMU em 10 e 25  $\mu$ M (Figura 4.38) não mostraram diferença significativa da porcentagem da forma SC. No entanto, comparando-se a incubação 1  $\mu$ M de 5-HPMU (linha 6, Figura 4.38 A e 4.38B) com 10 e 25  $\mu$ M de 5-HPMU (linhas 7 e 8, Figura 4.38A e 4.38B) podemos observar que há uma diminuição significativa da forma SC, quando aumentou-se a concentração de 5-HPMU. Foi possível observar inclusive a presença da forma L em concentrações superiores a 1  $\mu$ M de 5-HPMU (linhas 7 e 8, Figura 4.38 A e 4.38B). Podemos concluir que a diminuição da forma SC e o aumento da forma OC podem estar relacionados à produção de radicais peroxila e alcoxila de 5-HPMU. Os resultados reforçam a hipótese de geração de radicais 5-°OOPMU e/ou 5-°OPMU, além da geração de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup> $\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e Cu<sup>2+</sup>.

Um segundo objetivo era investigar se estava ocorrendo modificação de base, além de fragmentação da molécula do DNA em baixas concentrações de 5-HPMU. Para isto, foi feita a incubação de pBR322, 5-HPMU (10 ou 25  $\mu$ M) e Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M) na presença das enzimas de reparo FPG e NTH (Figura 4.39). As duas enzimas reparam o DNA por meio de um mecanismo de excisão de base, sendo que ambas possuem atividade glicosilase e AP endonuclease. A

atividade glicosilase faz com que a enzima reconheça a base modificada e clive a ligação *N*glicosídica, gerando sítios AP. A enzima com atividade AP-endonuclease cliva o sítio AP na posição 3'da desoxirribose, produzindo uma extremidade 5'-fosfato e outra extremidade 3' com o resíduo da desoxirribose. Na presença da enzima FPG ou NTH, é possível verificar a formação de purinas ou pirimidinas oxidadas. Uma vez que a enzima reconhece a base oxidada, ocorre a clivagem da ligação fosfosdiéster entre o resíduo contendo a modificação e outro resíduo adjacente. Isto ocasiona quebra de fita do DNA e o aparecimento das formas OC e L.

Os resultados obtidos na incubação de pBR322, 5-HPMU (10  $\mu$ M) e Cu<sup>2+</sup> (10  $\mu$ M) (linha 5, Figura 4.39A e 4.39B) com H<sub>2</sub>O e na presença de FPG mostraram um aumento significativo da porcentagem da forma OC e uma diminuição da forma SC. Contudo, a incubação com H<sub>2</sub>O e com NTH não apresentou diferença significativa na porcentagem de OC e SC (linha 5, Figura 4.39A e 4.39B). Como foi observado na incubação de pBR322+ Cu<sup>2+</sup> + 5-HPMU (1, 10 e 25  $\mu$ M) (Figura 4.38), na incubação com 25  $\mu$ M de 5-HPMU em H<sub>2</sub>O e na presença de FPG ou NTH (linha 6, Figura 4.39A e 4.39B) também não ocorreu diferença significativa na formação do DNA OC, confirmando que a concentração do metal é crucial para o aumento da decomposição de 5-HPMU.

A análise dos resultados obtidos na presença das enzimas de reparo FPG e NTH mostra que possivelmente ocorre modificação de base em adição a fragmentação do DNA (Lim, *et al.*, 2004). Como a FPG foi a única enzima ativa no reparo do DNA, podemos concluir que ocorreu oxidação preferencial da dGuo a 8-oxodGuo, pois esta base possui o menor potencial de redução e é mais susceptível a oxidação por O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) (Ravanat, *et al.*, 2004, Cadet, *et al.*, 2006) e por radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU (Luxford, *et al.*, 1999, Adam, *et al.*, 2000, Luxford, *et al.*, 2000, Goto, *et al.*, 2008). Além disto, devido ao potencial de redução da 8-oxodGuo ser 0,5 V menor que da dGuo (Burrows e Muller, 1998) também pode ocorrer oxidação de 8-oxodGuo a Oz, Oxa, e Sp na reação com O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) (Duarte, *et al.*, 2000, Martinez, *et al.*, 2002, Martinez, *et al.*, 2007) e/ou radicais 5-<sup>•</sup>OOPMU e 5-<sup>•</sup>OPMU (Adam, *et al.*, 2002). Logo, a atividade de reparo da FPG pode estar relacionada à formação de 8-oxodGuo e de produtos de oxidação da 8-oxodGuo (Cadet, *et al.*, 2002). Os resultados obtidos na presença da enzima de reparo FPG mostraram a formação de modificação de base, especialmente oxidação de purinas. Já em altas concentrações de 5-HPMU ou Cu<sup>2+</sup> e na ausência das enzimas, ocorre a formação direta de quebra simples e dupla da fita do DNA, o que pôde ser visualizado pela presença das formas OC e L, respectivamente.

## 5.7 Caracterização de 5-(hidroperoximetil)uracila, 5-(hidroximetil)uracila e 5-formiluracila por HPLC/MS/MS

A detecção por HPLC/MS de 5-HPMU e dos produtos de decomposição de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU, foram essenciais para confirmarmos a geração destes compostos (Figuras 4.29 a 4.33). Uma adicional confirmação da identidade química de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU foi obtida através de fragmentação induzida por colisão com moléculas de argônio, no espectrômetro de massa (Figuras 4.31). Cada composto foi detectado e fragmentado separadamente. A análise dos íons fragmento de 5-HPMU (m/z 159) (Figura 4.31A) e 5-HMU (m/z 143) (Figura 4.31B) indicou a presença majoritária do íon fragmento com m/z 125. Já o espectro de massa dos íons fragmento de 5-FoU (Figura 4.31C) possui intensos íons com m/z 98, 70 e 71. Analisando os íons fragmento de cada composto, foi proposto um mecanismo de fragmentação para 5-HPMU (Figura 5.4A), 5-HMU (Figura 5.4B) e 5-FoU (Figura 5.4C). Neste mecanismo, foi proposto que a molécula de 5-HPMU (Figura 5.4A) pode estar protonada (m/z 159) no átomo de oxigênio do

grupo peróxido (1) ou no átomo de nitrogênio da amida (2). Estes íons estão em ressonância e podem fragmentar no espectrômetro de massa de forma diferente. O íon molecular (1) pode perder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e gerar o íon fragmento (3) com m/z 125. A perda neutra de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é comum em hidroperóxidos orgânicos e já foi relatada em outros trabalhos (Pulfer, et al., 2004, Ronsein, et al., 2009). No entanto, 5-HPMU também pode estar na forma do íon molecular (2), que pode sofrer uma cisão homolítica da ligação O-O, gerando o íon fragmento (4) com m/z 142 e o radical <sup>•</sup>OH. Comparando-se a energia de ligação entre o átomo de carbono e o átomo de oxigênio (C-O ≈ 84 kcal/mol), ou entre nitrogênio e oxigênio (N-O ≈ 53 kcal/mol) ou flúor e oxigênio (F-O ≈ 44 kcal/mol), pode-se observar que a energia de ligação entre átomos de oxigênio do grupo peróxido é menor (O-O ≈ 34 kcal/mol) (Back, 2006, Ronsein, et al., 2009). Logo, a clivagem homolítica da ligação O-O do peróxido 5-HPMU pode ocorrer. Embora, a clivagem homolítica da ligação O-O seja favorável, não foi observado o íon fragmento (4) com alta intensidade (Figura 4.31A). Isto se deve a baixa estabilidade do íon fragmento (4). Analisando o espectro de massa (Figura 4.31A) e o mecanismo de fragmentação de 5-HPMU (Figura 5.4A) podemos concluir que a perda de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é favorecida em relação à perda de 'OH, pois o íon fragmento (3)  $(m/z \ 125)$  é mais intenso que o íon fragmento (4) (m/z 142). Além disto, podemos inferir que a molécula de 5-HPMU é detectada no espectrômetro de massa predominantemente na forma do íon molecular (1) (m/z 159).

O álcool 5-HMU (Figura 4.31B) foi detectado através do íon molecular (5) com m/z 143. O íon molecular (5) pode perder uma molécula de água e gerar o íon fragmento (6) com m/z 125 (Figura 4.31B). O íon fragmento (6) é estável, conferindo grande intensidade ao pico com m/z125. A perda de água é uma fragmentação conhecida em espectrometria de massa e é utilizada frequentemente para identificar a presença de álcool (Ronsein, *et al.*, 2009).

A análise de aldeídos por espectrometria de massa mostra que é comum detectar o íon fragmento proveniente da perda do grupo aldeído. Esta perda corresponde a 29 u.m.a e ocorre após o rompimento da ligação entre o carbono da carbonila e o carbono adjacente, devido à protonação do átomo de oxigênio da carbonila. Como não foi observado o íon fragmento referente à perda do grupo aldeído, concluímos que a molécula de 5-FoU estava protonada em um grupo funcional diferente do grupo aldeído (Figura 5.4C). Propusemos que 5-FoU estaria protonado no átomo de nitrogênio localizado entre as duas carbonilas, gerando o íon molecular (7) com m/z 141 (Figura 5.4C). Após protonar, o íon molecular (7) pode perder o grupo -CHNO e gerar o íon fragmento (8) com m/z 98. A perda do grupo -CO do íon fragmento (8) gera os íons com m/z 70 (9, 10 e 11) e m/z 71, sendo que o íon com m/z 71, provavelmente é formado após rearranjo intramolecular de átomo de hidrogênio. Devido alta intensidade do íon fragmento com m/z 70, pode-se concluir que a molécula detectada é estável. Logo, a análise da estabilidade dos íons em ressonância com m/z 70 (9, 10 ou 11) indica que o íon detectado refere-se à molécula (10), pois o íon (10) é um carbocátion secundário e, portanto é mais estável que os demais (íons 9 e 11). Deste modo, podemos concluir que os resultados de fragmentação por espectrometria de massa em tandem forneceram evidências adicionais da identidade química de 5-HPMU, 5-HMU e 5-FoU. Além disto, a detecção e caracterização por HPLC/MS/MS dos produtos formados na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup>, HOCl, Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>, que são o álcool 5-HMU e o aldeído 5-FoU, auxiliou no estudo do mecanismo envolvido na geração de  $O_2(^1\Delta_g)$  nestas reações.


Figura 5.4 Mecanismo de fragmentação de 5-HPMU (A), 5-HMU (B) e 5-FoU (C).

CONCLUSÕES

### 6 Conclusões

Os resultados obtidos forneceram provas inequívocas da formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) produzido na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> através do mecanismo de Russell. Neste mecanismo, a reação de dois radicais peroxila pode gerar um intermediário tetraóxido linear, que decompõe por um mecanismo cíclico em uma molécula de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ), um álcool (5-HMU) e um aldeído (5-FoU).

A decomposição de 5-HPMU na presença de HOCl também produziu  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ). O mecanismo envolvido possivelmente possui a participação de um intermediário clorado, formado a partir da transferência de um átomo de cloro de HOCl para 5-HPMU. Adicionalmente, a geração de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) foi comprovada na reação de 5-HPMU e íons Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>, que são íons potencialmente importantes em sistemas biológicos. Os mecanismos de formação de  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) na reação de 5-HPMU e HOCl, Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> possivelmente possuem participação de radicais 5-OOPMU e 5-OPMU.

O O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) e os radicais peroxila e/ou alcoxila de 5-HPMU gerados na incubação de 5-HPMU, Cu<sup>2+</sup> e DNA plasmidial foram capazes de produzir modificação de base e quebra simples da fita do DNA.

Em resumo, pode-se concluir que 5-HPMU é uma potencial fonte intramolecular de  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) e radicais peroxila e/ou alcoxila. Além da possível geração de  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) a partir da reação de dois radicais 5-°OOPMU *via* mecanismo de Russell, devemos ressaltar que o  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) também pode ser gerado através deste mecanismo a partir da reação de um radical 5-°OOPMU e um radical peroxila de lipídeo ou proteína, desde que ambos sejam derivados de hidroperóxidos primários ou secundários. Combinadas ou isoladas, estas espécies reativas podem gerar danos oxidativos no DNA, que se não forem reparados podem levar ao desenvolvimento de mutações e diversas patologias.

PERSPECTIVAS

## 7 Perspectivas

A integridade da molécula de DNA é essencial para a manutenção das funções bioquímicas em qualquer ser vivo. A presença de danos oxidativos no DNA pode ocasionar uma série de malefícios e talvez a longo prazo, pode levar ao desenvolvimento de graves doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas. Portanto, é essencial um estudo detalhado dos mecanismos envolvidos na oxidação da molécula do DNA.

Nas últimas décadas, o mecanismo de oxidação da dGuo e dos produtos formados tem sido extensivamente estudado. Entre os produtos de oxidação formados, a 8-oxodGuo é a lesão mais estudada e possivelmente é obtida com o maior rendimento na oxidação da dGuo por  $O_2$  ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ). No entanto, há outros danos oxidativos que podem ser formados no DNA e que podem ser igualmente lesivos, como os hidroperóxidos de timina. Os hidroperóxidos de timina representam um risco para o DNA, pois *in vitro* são compostos extremamente estáveis, especialmente 5-HPMU.

Embora seja um hidroperóxido estável, 5-HPMU pode decompor e gerar espécies reativas, como O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ), radical peroxila e radical alcoxila. Uma vez geradas, estas espécies reativas podem oxidar bases adjacentes, levando a propagação do dano oxidativo no DNA. Além da geração de espécies oxidantes, a decomposição de 5-HPMU pode gerar compostos mutagênicos, como 5-HMU e 5-FoU. Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas sobre a de geração intramolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) no DNA a partir de 5-HPMU. Além disto, há possibilidade de oxidação da molécula de DNA por radicais peroxila e alcoxila de 5-HPMU, Portanto, o entendimento do mecanismo de oxidação do DNA, mediado por 5-HPMU, abre perspectivas para o estudo de lesões oxidativas formadas em sistemas mais complexos, como oligonucleotídeos, oligonucleosídeos e DNA celular.

REFERÊNCIAS

### 8 Referências

Adam, W., Arnold, M. A., Grune, M., Nau, W. M., Pischel, U., Saha-Moller, C. R. (2002). Spiroiminodihydantoin is a Major Product in the Photooxidation of 2 '-Deoxyguanosine by the Triplet States and Oxyl Radicals Generated from Hydroxyacetophenone Photolysis and Dioxetane Thermolysis. *Organic Lett.* 4(4): 537-540.

Adam, W., Kurz, A., Saha-Möller, C. R. (2000). Peroxidase-Catalyzed Oxidative Damage of DNA and 2'-Deoxyguanosine by Model Compounds of Lipid Hydroperoxides: Involvement of Peroxyl Radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 13(12): 1199-1207.

Adam, W., Cilento, G. (1982). Chemical and Biological Generation of Excited States. Academic Press, I.

Agnez-Lima, L. F., Di Mascio, P., Napolitano, R. L., Fuchs, R. P., Menck, C. F. M. (**1999**). Mutation Spectrum Induced by Singlet Oxygen in *Escherichia coli* Deficient in Exonuclease III. *Photochem. Photobiol.* 70(4): 505-511.

Agnez-Lima, L. F., Napolitano, R. L., Fuchs, R. P. P., Di Mascio, P., Muotri, A. R., Menck, C. F. M. (2001). DNA Repair and Sequence Context Affect <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Induced Mutagenesis in Bacteria. *Nucleic Acids Res.* 29(13): 2899-2903.

Agon, V. V., Bubb, W. A., Wright, A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (**2006**). Sensitizer-Mediated Photooxidation of Histidine Residues: Evidence for the Formation of Reactive Side-Chain Peroxides. *Free Radical Biol. Med.* 40(4): 698-710.

Arnold, S. J., Witzke, H., Ogryzlo, E. A. (1964). Some New Emission Bands of Molecular Oxygen. J. Chem. Phys. 40(6): 1769-1770.

Aubry, J. M., Pierlot, C., Rigaudy, J., Schmidt, R. (2003). Reversible Binding of Oxygen to Aromatic Compounds. *Acc. Chem. Res.* 36(9): 668-675.

Back, R. D. (2006). The Chemistry of Peroxides, John Wiley and Sons, 2. Balasubramanian, B., Pogozelski, W. K., Tullius, T. D. (1998). DNA Strand Breaking by the Hydroxyl Radical is Governed by the Accessible Surface Areas of the Hydrogen Atoms of the DNA Backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17): 9738-9743.

Bao, Y. P., Jemth, P., Mannervik, B., Williamson, G. (**1997**). Reduction of Thymine Hydroperoxide by Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase and Glutathione Transferases. *FEBS Lett.* 410(2-3): 210-212.

Baumstark, A. L. (1985). Reaction Modes and Products. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press Inc., II: 1-35.

Baute, J., Depicker, A. (2008). Base Excision Repair and Its Role in Maintaining Genome Stability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 43(4): 239-276.

Beckwith, A. L. J., Davies, A. G., Davison, I. G. E., Maccoll, A., Mruzek, M. H. (**1989**). The Mechanisms of the Rearrangements of Allylic Hydroperoxides:  $5-\alpha$ -Hydroperoxy- $3-\beta$ -hydroxycholest-6-ene and  $7-\alpha$ -Hydroperoxy- $3-\beta$ -hydroxycholest-5-ene. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2 (7): 815-824.

Bianchini, F., Donato, F., Faure, H., Ravanat, J. L., Hall, J., Cadet, J. (**1998**). Urinary Excretion of 5-(Hydroxymethyl)uracil in Healthy Volunteers: Effect of Active and Passive Tobacco Smoke. *Int. J. Cancer* 77(1): 40-46.

Bjelland, S., Eide, L., Time, R. W., Stote, R., Eftedal, I., Volden, G., Seeberg, E. (1995). Oxidation of Thymine to 5-Formyluracil in DNA - Mechanisms of Formation, Structural Implications, and Base Excision by Human Cell-Free-Extracts. *Biochemistry* 34(45): 14758-14764.

Bjelland, S., Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, Toxicity and Repair of DNA Base Damage Induced by Oxidation. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 531(1-2): 37-80.

Bloodworth, A. J., Eggelte, H. J. (1985). Reaction Modes and Products. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press Inc., II: 93-203.

Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J.,Dizdaroglu, M. (**1992**). Substrate-Specificity of the *Escherichia coli* Fpg Protein (Formamidopyrimidine DNA Glycosylase) - Excision of Purine Lesions in DNA Produced by Ionizing-Radiation or Photosensitization. *Biochemistry* 31(1): 106-110.

Boorstein, R. J., Cummings, A., Marenstein, D. R., Chan, M. K., Ma, Y. L., Neubert, T. A., Brown, S. M., Teebor, G. W. (2001). Definitive Identification of Mammalian 5-Hydroxymethyluracil DNA N-Glycosylase Activity as SMUG1. *J. Biol. Chem.* 276(45): 41991-41997.

Boorstein, R. J., Teebor, G. W. (**1988**). Mutagenicity of 5-Hydroxymethyl-2'-Deoxyuridine to Chinese-Hamster Cells. *Cancer Res.* 48(19): 5466-5470.

Bou, R., Codony, R., Tres, A., Decker, E. A., Guardiola, F. (2008). Determination of Hydroperoxides in Foods and Biological Samples by the Ferrous Oxidation-Xylenol Orange Method: A Review of the Factors that Influence the Method's Performance. *Anal. Biochem.* 377(1): 1-15.

Bourdat, A. G., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., Cadet, J. (**2000**). Tandem Base Lesions are Generated by Hydroxyl Radical within Isolated DNA in Aerated Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 122(19): 4549-4556.

Box, H. C., Budzinski, E. E., Dawidzik, J. B., Gobey, J. S., Freund, H. G. (**1997**). Free Radical-Induced Tandem Base Damage in DNA Oligomers. *Free Radical Biol. Med.* 23(7): 1021-1030. Box, H. C., Budzinski, E. E., Freund, H. G., Evans, M. S., Patrzyc, H. B., Wallace, J. C., Maccubbin, A. E. (**1993**). Vicinal Lesions in X-Irradiated DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 64(3): 261-263.

Browne, R. J., Ogryzlo, E. A. (1964). Chemiluminescence from Reaction of Chlorine with Aqueous Hydrogen Peroxide. *P. Chem. Soc. London.* (APR): 117-&.

Buege, J. A., Aust, S. D., Sidney Fleischer and Lester, P. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.

Burrows, C. J., Muller, J. G. (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* 98(3): 1109-1151.

Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A. G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J. L., Sauvaigo, S. (2002). Recent Aspects of Oxidative DNA Damage: Guanine Lesions, Measurement and Substrate Specificity of DNA Repair Glycosylases. *Biol. Chem.* 383(6): 933-943.

Cadet, J., Di Mascio, P. (**2006**). Peroxides in Biological Systems. *The Chemistry of Peroxides*. Z. Rappoport, John Wiley and Sons Inc, II: 915-988.

Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J. L., Di Mascio, P. (**2009**). Sensitized Formation of Oxidatively Generated Damage to Cellular DNA by UVA Radiation. *Photochem. Photobiol.* 8(7): 903-911.

Cadet, J., Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2006). Singlet Oxygen Oxidation of Isolated and Cellular DNA: Product Formation and Mechanistic Insights. *Photochem. Photobiol.* 82(5): 1219-1225.

Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R. (2007). Photodynamic Therapy: Update 2006 - Part 1: Photochemistry and Photobiology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Vener.* 21(3): 293-302.

Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R. (2007). Photodynamic Therapy: Update 2006 Part 2: Clinical Results. *J. Eur. Acad. Dermatol. Vener.* 21(4): 439-451.

Cannon-Carlson, S. V., Gokhale, H., Teebor, G. W. (**1989**). Purification and Characterization of 5-Hydroxymethyluracil-DNA Glycosylase from Calf Thymus - Its Possible Role in the Maintenance of Methylated Cytosine Residues. *J. Biol. Chem.* 264(22): 13306-13312.

Carbonare, M. D., Pathak, M. A. (1992). Skin Photosensitizing Agents and the Role of Reactive Oxygen Species in Photoaging. J. Photochem. Photobiol., B 14(1-2): 105-124.

Cavalcante, A. K. D., Martinez, G. R., Di Mascio, P., Menck, C. F. M., Agnez-Lima, L. F. (2002). Cytotoxicity and Mutagenesis Induced by Singlet Oxygen in Wild Type and DNA Repair Deficient *Escherichia coli* Strains. *DNA Repair* 1(12): 1051-1056.

Cline, R. E., Fink, R. M., Fink, K. (1959). Synthesis of 5-Substituted Pyrimidines via Formaldehyde Addition. J. Am. Chem. Soc. 81(10): 2521-2527.

Colwell, B. A., Morris, D. L. (**2003**). Formation of the Oxidative Damage Marker 8-Hydroxy-2 'deoxyguanosine from the Nucleoside 2 '-Deoxyguanosine: Parameter Studies and Evidence of Fe(II) Binding. *J. Inorg. Biochem.* 94(1-2): 100-105.

Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M.,Lunec, J. (2003). Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. *Faseb J.* 17(10): 1195-1214.

Costa de Oliveira, R., Ribeiro, D. T., Nigro, R. G., Di Mascio, P., Menck, C. F. M. (1992). Singlet Oxygen Induced Mutation Spectrum in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res.* 20(16): 4319-4323.

Davies, M. J. (2003). Singlet Oxygen-Mediated Damage to Proteins and Its Consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305(3): 761-770.

Davies, M. J., Hawkins, C. L. (**2000**). Hypochlorite-Induced Oxidation of Thiols: Formation of Thiyl Radicals and the Role of Sulfenyl Chlorides as Intermediates. *Free Radical Res.* 33(6): 719-729.

Davies, M. J., Truscott, R. J. W. (2001). Photo-Oxidation of Proteins and Its Role in Cataractogenesis. J. Photochem. Photobiol., B 63(1-3): 114-125.

Delatour, T., Douki, T., D'Ham, C.,Cadet, J. (**1998**). Photosensitization of Thymine Nucleobase by Benzophenone Through Energy Transfer, Hydrogen Abstraction and One-Electron Oxidation. *J. Photochem. Photobiol.*, *B* 44(3): 191-198.

Dewilde, A., Pellieux, C., Pierlot, C., Wattre, P., Aubry, J. M. (**1998**). Inactivation of Intracellular and Non-Enveloped Viruses by a Non-Ionic Naphthalene Endoperoxide. *Biol. Chem.* 379(11): 1377-1379.

Di Mascio, P.,Sies, H. (**1989**). Quantification of Singlet Oxygen Generated by Thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylene)dipropionate endoperoxide. Monomol and Dimol Photoemission and the Effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J. Am. Chem. Soc.* 111(8): 2909-2914.

Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K., Kucuk, O. (**2001**). Effect of Soy Isoflavone Supplementation on Markers of Oxidative Stress in Men and Women. *Cancer Lett.* 172(1): 1-6.

Djuric, Z., Heilbrun, L. K., Lababidi, S., Berzinkas, E., Simon, M. S., Kosir, M. A. (2001). Levels of 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in DNA from Blood of Women Scheduled for Breast Biopsy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10(2): 147-149.

Djuric, Z., Lewis, S. M., Lu, M. H., Mayhugh, M., Tang, N., Hart, R. W. (2001). Effect of Varying Dietary Fat Levels on Rat Growth and Oxidative DNA Damage. *Nutr. Cancer* 39(2): 214-219.

Douki, T., Delatour, T., Paganon, F., Cadet, J. (**1996**). Measurement of Oxidative Damage at Pyrimidine Bases in  $\gamma$ -irradiated DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 9(7): 1145-1151.

Douki, T., Riviere, J., Cadet, J. (2002). DNA Tandem Lesions Containing 8-Oxo-7,8dihydroguanine and Formamido Residues Arise from Intramolecular Addition of Thymine Peroxyl Radical to Guanine. *Chem. Res. Toxicol.* 15(3): 445-454.

Douki, T., Cadet, J. (1999). Modification of DNA Bases by Photosensitized One-electron Oxidation. *Int. J. Radiat. Biol.* 75(5): 571-581.

Duarte, V., Gasparutto, D., Yamaguchi, L. F., Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Cadet, J. (2000). Oxaluric Acid as the Major Product of Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 122(51): 12622-12628.

Faure, H., Mousseau, M., Cadet, J., Guimier, C., Tripier, M., Hida, H., Favier, A. (**1998**). Urine 8-Oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine vs. 5-(Hydroxymethyl)uracil as DNA Oxidation Marker in Adriamycin-treated Patients. *Free Radical Res.* 28(4): 377-382.

Frankel, E. N., Neff, W. E., Bessler, T. R. (1979). Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.5. Photosensitized Oxidation. *Lipids* 14(12): 961-967.

Frimer, A. A., Stephenson, L. M. (1985). Reaction Modes and Products. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press Inc., II: 67-91.

Furukawa, A., Hiraku, Y., Oikawa, S., Luxford, C., Davies, M. J., Kawanishi, S. (2005). Guanine-Specific DNA Damage Induced by  $\gamma$ -Irradiated Histone. *Biochem. J.* 388: 813-818.

Gay, C. A., Gebicki, J. A. (2003). Measurement of Protein and Lipid Hydroperoxides in Biological Systems by the Ferric-Xylenol Orange Method. *Anal. Biochem.* 315(1): 29-35.

Gay, C., Collins, J., Gebicki, J. M. (**1999**). Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. *Anal. Biochem.* 273(2): 149-155.

Girotti, A. W. (**1992**). Photosensitized Oxidation of Cholesterol in Biological Systems - Reaction Pathways, Cytotoxic Effects and Defense Mechanisms. *J. Photochem. Photobiol.*, *B* 13(2): 105-118.

Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., Kanazawa, K. (2008). A Formation Mechanism for 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine Mediated by Peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biol. Med.* 45(9): 1318-1325.

Gray, E. W., Ogryzlo, E. A. (1969). The Cooperative Emission Bands of "Singlet" Molecular Oxygen. *Chem. Phys. Lett.* 3(9): 658-660.

Guo, Q., Qian, S. Y., Mason, R. P. (2003). Separation and Identification of DMPO Adducts of Oxygen-Centered Radicals Formed from Organic Hydroperoxides by HPLC-ESR, ESI-MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14(8): 862-871.

Hahn, B. S., Wang, S. Y. (**1976**). Synthesis and Characterization of 5-Hydroperoxymethyluracil (ThyαOOH). *J. Org. Chem.* 41(3): 567-568.

Halliwell, B. (2006). Phagocyte-Derived Reactive Species: Salvation or Suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31(9): 509-515.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press Inc., 1.

Hanahan, D. (**1983**). Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-580.

Harkin, L. A., Burcham, P. C. (1997). Formation of Novel C-1-Oxidised Abasic Sites in Alkylperoxyl Radical-Damaged Plasmid DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237(1): 1-5.

Hawkins, C. L., Davies, M. J. (**1998**). Hypochlorite-Induced Damage to Proteins: Formation of Nitrogen-Centred Radicals from Lysine Residues and Their Role in Protein Fragmentation. *Biochem. J.* 332: 617-625.

Hawkins, C. L., Davies, M. J. (**1998**). Reaction of HOCl with Amino Acids and Peptides: EPR Evidence for Rapid Rearrangement and Fragmentation, Reactions of Nitrogen-Centred Radicals. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (9): 1937-1945.

Hollstein, M. C., Brooks, P., Linn, S., Ames, B. N. (**1984**). Hydroxymethyluracil DNA Glycosylase in Mammalian-Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(13): 4003-4007.

Hong, I. S., Carter, K. N., Sato, K., Greenberg, M. M. (2007). Characterization and Mechanism of Formation of Tandem Lesions in DNA by a Nucleobase Peroxyl Radical. *J. Am. Chem. Soc.* 129(13): 4089-4098.

Howard, J. A., Ingold, K. U. (**1968**). Self-Reaction of Sec-Butylperoxy Radicals. Confirmation of the Russell Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 90(4): 1056-1058.

Isildar, M., Schuchmann, M. N., Schulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C. (**1982**). Oxygen-Uptake in the Radiolysis of Aqueous-Solutions of Nucleic-Acids and their Constituents. *Int. J. Radiat. Biol.* 41(5): 525-533.

Jessup, W., Dean, R. T., Gebicki, J. M. (**1994**). Iodometric Determination of Hydroperoxides in Lipids and Proteins. *Method. Enzymol.* 233: 289-303.

Jockusch, S., Turro, N. J., Thompson, E. K., Gouterman, M., Callis, J. B., Khalil, G. E. (2008). Singlet Molecular Oxygen by Direct Excitation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7(2): 235-239.

Jones, C. M., Burkitt, M. J. (2003). EPR Spin-Trapping Evidence for the Direct, One-Electron Reduction of Tert-Butylhydroperoxide to the Tert-Butoxyl Radical by Copper(II): Paradigm for a Previously Overlooked Reaction in the Initiation of Lipid Peroxidation. J. Am. Chem. Soc. 125(23): 6946-6954.

Jovanovic, S. V., Simic, M. G. (1986). Mechanism of OH Radical Reactions with Thymine and Uracil Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 108(19): 5968-5972.

Kang, P.,Foote, C. S. (**2000**). Synthesis of a <sup>13</sup>C,<sup>15</sup>*N*-Labeled Imidazole and Characterization of the 2,5-endoperoxide and Its Decomposition. *Tetrahedron Lett.* 41(49): 9623-9626.

Kanofsky, J. R. (**1983**). Singlet Oxygen Production by Lactoperoxidase - Evidence from 1270 nm Chemi-Luminescence. *J. Biol. Chem.* 258(10): 5991-5993.

Kanofsky, J. R. (**1984**). Singlet Oxygen Production by Chloroperoxidase Hydrogen Peroxide-Halide Systems. *J. Biol. Chem.* 259(9): 5596-5600.

Kaplan, J. (1947). The Atmospheric Bands of Oxygen. Phys. Rev. 71(4): 274-274.

Kasai, H., Iida, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Tanooka, H. (**1990**). 5-Formyldeoxyuridine - A New Type of DNA Damage Induced by Ionizing-Radiation and Its Mutagenicity to Salmonella Strain TA102. *Mutat. Res.* 243(4): 249-253.

Khan, A. U. (1980). Direct Spectroscopic Observation of 1.27  $\mu$ m and 1.58  $\mu$ m Emission of Singlet ( ${}^{1}\Delta_{g}$ ) Molecular Oxygen in Chemically Generated and Dye-Photosensitized Liquid Solutions at Room Temperature. *Chem. Phys. Lett.* 72(1): 112-114.

Khan, A. U. (1981). Direct Spectral Evidence of the Generation of Singlet Molecular-Oxygen  $({}^{1}\Delta_{g})$  in the Reaction of Potassium Superoxide with Water. J. Am. Chem. Soc. 103(21): 6516-6517.

Khan, A. U. (1985). Singlet Molecular Oxygen Spectroscopy: Chemical and Photosensitized. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press, I: 40-79.

Khan, A. U., Kasha, M. (1963). Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. J. Chem. Phys. 39(8): 2105-2106.

Khan, A. U., Kasha, M. (**1970**). Chemiluminescence Arising from Simultaneous Transitions in Pairs of Singlet Oxygen Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 92(11): 3293-3300.

Khan, A. U., Kasha, M. (**1979**). Direct Spectroscopic Observation of Singlet Oxygen Emission at 1268 nm Excited by Sensitizing Dyes of Biological Interest in Liquid Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(12): 6047-6049.

Kiryu, C., Makiuchi, M., Miyazaki, J., Fujinaga, T.,Kakinuma, K. (**1999**). Physiological Production of Singlet Molecular Oxygen in the Myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Chloride System. *FEBS Lett.* 443(2): 154-158.

Klungland, A., Paulsen, R., Rolseth, V., Yamada, Y., Ueno, Y., Wiik, P., Matsuda, A., Seeberg, E.,Bjelland, S. (**2001**). 5-Formyluracil and Its Nucleoside Derivatives Confer Toxicity and Mutagenicity to Mammalian Cells by Interfering with Normal RNA and DNA Metabolism. *Toxicol. Lett.* 119(1): 71-78.

Kochevar, I. E., Redmond, R. W. (2000). Photosensitized Production of Singlet Oxygen. *Method Enzymol*. Academic Press Inc, 319: 20-28.

Koppenol, W. H. (**1990**). Oxyradical Reactions - from Bond-Dissociation Energies to Reduction Potentials. *FEBS Lett.* 264(2): 165-167.

Koppenol, W. H. (**1994**). Thermodynamic Considerations on the Formation of Reactive Species from Hypochlorite, Superoxide and Nitrogen Monoxide - Could Nitrosyl Chloride be Produced by Neutrophils and Macrophages. *FEBS Lett.* 347(1): 5-8.

Korytowski, W., Girotti, A. W. (**1999**). Singlet Oxygen Adducts of Cholesterol: Photogeneration and Reductive Turnover in Membrane Systems. *Photochem. Photobiol.* 70(4): 484-489.

Kulig, M. J., Smith, L. L. (**1973**). Sterol Metabolism.25. Cholesterol Oxidation by Singlet Molecular Oxygen. *J. Org. Chem.* 38(20): 3639-3642.

Lau, D., Baldus, S. (**2006**). Myeloperoxidase and Its Contributory Role in Inflammatory Vascular Disease. *Pharmacol. Ther.* 111(1): 16-26.

Li, M. Y., Cline, C. S., Koker, E. B., Carmichael, H. H., Chignell, C. F.,Bilski, P. (**2001**). Quenching of Singlet Molecular Oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) by Azide Anion in Solvent Mixtures. *Photochem. Photobiol.* 74(6): 760-764.

Lim, P., Wuenschell, G. E., Holland, V., Lee, D.-H., Pfeifer, G. P., Rodriguez, H., Termini, J. (2004). Peroxyl Radical Mediated Oxidative DNA Base Damage: Implications for Lipid Peroxidation Induced Mutagenesis. *Biochemistry* 43(49): 15339-15348.

Liu, P. F., Burdzy, A., Sowers, L. C. (2003). Repair of the Mutagenic DNA Oxidation Product, 5-Formyluracil. *DNA Repair* 2(2): 199-210.

Lloyd, R. S., Haidle, C. W., Robberson, D. L. (**1978**). Bleomycin-Specific Fragmentation of Double-Stranded DNA. *Biochemistry* 17(10): 1890-1896.

Luxford, C., Dean, R. T., Davies, M. J. (2000). Radicals Derived from Histone Hydroperoxides Damage Nucleobases in RNA and DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 13(7): 665-672.

Luxford, C., Morin, B., Dean, R. T., Davies, M. J. (**1999**). Histone H1 and Other Protein and Amino Acid-Hydroperoxides Can Give Rise to Free Radicals which Oxidize DNA. *Biochem. J.* 344: 125-134.

Martinez, G. R., Garcia, F., Catalani, L. H., Cadet, J., Oliveira, M. C. B., Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (**2006**). Synthesis of a Hydrophilic and Non-Ionic Anthracene Derivative, the N,N '-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a Chemical Trap for Singlet Molecular Oxygen Detection in Biological Systems. *Tetrahedron* 62(46): 10762-10770.

Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., Almeida, E. A., Garcia, C. C. M., Barbosa, L. F., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (**2003**). Oxidative and Alkylating Damage in DNA. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* 544(2-3): 115-127.

Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Ravanat, J. L., Cadet, J.,Di Mascio, P. (**2002**). <sup>18</sup>O-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone and Oxazolone Derivatives. *Biol. Chem.* 383(3-4): 607-617.

Martinez, G. R., Ravanat, J. L., Cadet, J., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (**2007**). Spiroiminodihydantoin Nucleoside Formation from 2'-Deoxyguanosine Oxidation by [<sup>18</sup>O-labeled] Singlet Molecular Oxygen in Aqueous Solution. *J. Mass Spectrom.* 42(10): 1326-1332.

Martinez, G. R., Ravanat, J. L., Medeiros, M. H. G., Cadet, J., Di Mascio, P. (**2000**). Synthesis of a Naphthalene Endoperoxide as a Source of <sup>18</sup>O-Labeled Singlet Oxygen for Mechanistic Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 122(41): 10212-10213.

Martini, M., Termini, J. (1997). Peroxy Radical Oxidation of Thymidine. *Chem. Res. Toxicol.* 10(2): 234-241.

Maxam, A. M., Gilbert, W. (1980). Sequencing End-Labeled DNA with Base-Specific Chemical Cleavages. *Methods Enzymol.* 65(1): 499-560.

McCall, D. B. (**1984**). Sodium 9,10-bis(2-ethylene)anthracene Disulfate: A New Water-Soluble Singlet Oxygen Trap for Biological Systems and Polymer-Immobilized Naphtalene Endoperoxides: A New Convenient Singlet Oxygen Generator. *Tese da Wayne State University* 

Mendenhall, G. D., Sheng, X. C., Wilson, T. (**1991**). Yields of Excited Carbonyl Species from Alkoxyl and from Alkylperoxyl Radical Dismutations. *J. Am. Chem. Soc.* 113(23): 8976-8977.

Merkel, P. B., Kearns, D. R. (1972). Radiationless Decay of Singlet Molecular-Oxygen in Solution - Experimental and Theoretical Study of Electronic-to-Vibrational Energy-Transfer. J. Am. Chem. Soc. 94(21): 7244-7253.

Mi, L. J., Chaung, W., Horowitz, R., Teebor, G. W., Boorstein, R. J. (**1997**). DNA Base Excision Repair Induces Apoptosis in V79 Fibroblast Cells. *J. Chim. Phys.-Chim. Biol.* 94(2): 342-349.

Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P., Miller, J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM Combine to Prevent Mutations by an Oxidatively Damaged Form of Guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(15): 7022-7025.

Miyamoto, S., Martinez, G. R., Martins, A. P. B., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2003). Direct Evidence of Singlet Molecular Oxygen  $[O_2({}^{1}\Delta_g)]$  Production in the Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Peroxynitrite. *J. Am. Chem. Soc.* 125(15): 4510-4517.

Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2003). Singlet Molecular Oxygen Generated from Lipid Hydroperoxides by the Russell Mechanism: Studies Using <sup>18</sup>O-Labeled Linoleic Acid Hydroperoxide and Monomol Light Emission Measurements. *J. Am. Chem. Soc.* 125(20): 6172-6179.

Miyamoto, S., Martinez, G. R., Rettori, D., Augusto, O., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (2006). Linoleic Acid Hydroperoxide Reacts with Hypochlorous Acid, Generating Peroxyl Radical Intermediates and Singlet Molecular Oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(2): 293-298.

Monroe, B. M. (1985). Singlet Oxygen in Solution: Lifetimes and Reactions Rate Constants. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press, I: 177-224

Morgan, P. E., Dean, R. T., Davies, M. J. (2002). Inhibition of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase by Peptide and Protein Peroxides Generated by Singlet Oxygen Attack. *Eur. J. Biochem.* 269(7): 1916-1925.

Morgan, P. E., Pattison, D. I., Hawkins, C. L., Davies, M. J. (**2008**). Separation, Detection, and Quantification of Hydroperoxides Formed at Side-Chain and Backbone Sites on Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Free Radical Biol. Med.* 45(9): 1279-1289.

Moriya, M. (**1993**). Single-Stranded Shuttle Phagemid for Mutagenesis Studies in Mammalian Cells: 8-Oxoguanine in DNA Induces Targeted G:C to T:A Transversions in Simian Kidney Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(3): 1122-1126.

Morris, J. C. (1966). Acid Ionization Constant of HOCl from 5 to 35 Degrees. J. Phys. Chem. 70(12): 3798-3805.

Nardello, V., Aubry, J. M., Johnston, P., Bulduk, I., de Vries, A. H. M., Alsters, P. L. (**2005**). Facile Preparation of the Water-Soluble Singlet Oxygen Traps Anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS) and Anthracene-9,10-diethylsulfonate (AES) Via a Heck Reaction with Vinylsulfonate. *Synlett* (17): 2667-2669.

Neeley, W. L., Essigmann, J. M. (2006). Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chem. Res. Toxicol.* 19(4): 491-505.

Nielsen, N. S., Timm-Heinrich, M., Jacobsen, C. (**2003**). Comparison of Wet-Chemical Methods for Determination of Lipid Hydroperoxides. *J. Food Lipids* 10(1): 35-50.

Niles, J. C., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (**2001**). Spiroiminodihydantoin is the Major Product of the 8-oxo-7,8-dihydroguanosine Reaction with Peroxynitrite in the Presence of Thiols and Guanosine Photooxidation by Methylene Blue. *Organic Lett.* 3(7): 963-966.

Niu, Q. J., Mendenhall, G. D. (**1992**). Yields of Singlet Molecular-Oxygen from Peroxyl Radical Termination. *J. Am. Chem. Soc.* 114(1): 165-172.

Niu, Q. S., Mendenhall, G. D. (1990). Structural Effects on the Yields of Singlet Molecular-Oxygen ( ${}^{1}\Delta_{g}O_{2}$ ) from Alkylperoxyl Radical Recombination. *J. Am. Chem. Soc.* 112(4): 1656-1657.

Noblitt, S. D., Huehls, A. M., Morris, J. D. L. (2007). The Role of Metal Ion Binding in Generating 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine from the Nucleoside 2'-Deoxyguanosine and the Nucleotide 2'-Deoxyguanosine-5'-monophosphate. *J. Inorg. Biochem.* 101(3): 536-542.

Noxon, J. F. (1961). Observation of  $(b \, {}^{1}\Sigma_{g}^{+} - a \, {}^{1}\Delta_{g})$  Transition in O<sub>2</sub>. *Can. J. Phys.* 39(8): 1110-1119.

Noxon, J. F., Vallance Jones, A. (**1962**). Observation of (0,0) Band of the  $({}^{1}\Delta_{g} - {}^{3}\Sigma_{g})$  System of Oxygen in Day and Twilight Airglow. *Nature* 196(4850): 157-158.

Ogilby, P. R., Foote, C. S. (**1982**). Chemistry of Singlet Oxygen. 36. Singlet Molecular-Oxygen  $({}^{1}\Delta_{g})$  Luminescence in Solution Following Pulsed Laser Excitation -Solvent Deuterium-Isotope Effects on the Lifetime of Singlet Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 104(7): 2069-2070.

Ogilby, P. R., Foote, C. S. (1983). Chemistry of Singlet Oxygen. 42. Effect of Solvent, Solvent Isotopic-Substitution, and Temperature on the Lifetime of Singlet Molecular-Oxygen  $({}^{1}\Delta_{g})$ . *J. Am. Chem. Soc.* 105(11): 3423-3430.

Pierlot, C., Aubry, J. M., Briviba, K., Sies, H., Di Mascio, P. (**2000**). Naphthalene Endoperoxides as Generators of Singlet Oxygen in Biological Media. *Methods Enzymol.* 319: 3-20.

Pogozelski, W. K., Tullius, T. D. (**1998**). Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. *Chem. Rev.* 98(3): 1089-1107.

Prado, F. M., Oliveira, M. C. B., Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Ronsein, G. E., Di Mascio, P. (**2009**). Thymine Hydroperoxide as a Potential Source of Singlet Molecular Oxygen in DNA. *Free Radical Biol. Med.* 47(4): 401-409.

Prutz, W. A. (**1998**). Interactions of Hypochlorous Acid with Pyrimidine Nucleotides, and Secondary Reactions of Chlorinated Pyrimidines with GSH, NADH, and Other Substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 349(1): 183-191.

Pryor, W. A. (1986). Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes, and Reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48(1): 657-667.

Pulfer, M. K., Harrison, K., Murphy, R. C. (2004). Direct Electrospray Tandem Mass Spectrometry of the Unstable Hydroperoxy Bishemiacetal Product Derived from Cholesterol Ozonolysis. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15(2): 194-202.

Ravanat, J. L., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Cadet, J. (2000). Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. *J. Biol. Chem.* 275(51): 40601-40604.

Ravanat, J. L., Douki, T., Cadet, J. (2001). Direct and Indirect Effects of UV Radiation on DNA and Its Components. J. Photochem. Photobiol., B 63(1-3): 88-102.

Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Cadet, J. (2004). Mechanistic Aspects of the Oxidation of DNA Constituents Mediated by Singlet Molecular Oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 423(1): 23-30.

Ravanat, J. L., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., Cadet, J. (2006). Singlet Oxygen Oxidation of 2 '-Deoxyguanosine. Formation and Mechanistic Insights. *Tetrahedron* 62(46): 10709-10715.

Ravanat, J. L., Saint-Pierre, C., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., Cadet, J. (2001). Damage to Isolated DNA Mediated by Singlet Oxygen. *Helv. Chim. Acta* 84: 3702-3709. Remmen, H. V., Richardson, A. (2001). Oxidative Damage to Mitochondria and Aging. *Exp. Gerontol.* 36(7): 957-968.

Ronsein, G. E., Miyamoto, S., Bechara, E., Di Mascio, P., Martinez, G. R. (2006). Singlet Oxygen-Mediated Protein Oxidation: Damage Mechanisms, Detection Techniques and Biological Implications. *Quim. Nova* 29(3): 563-568.

Ronsein, G. E., Oliveira, M. C. B., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (**2009**). 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.* 20(2): 188-197.

Ronsein, G. E., Oliveira, M. C. B., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P. (**2008**). Tryptophan Oxidation by Singlet Molecular Oxygen  $[O_2 ({}^{1}\Delta_g)]$ : Mechanistic Studies Using  ${}^{18}$ O-Labeled Hydroperoxides, Mass Spectrometry, and Light Emission Measurements. *Chem. Res. Toxicol.* 21(6): 1271-1283.

Rosenthal, I. (1985). Singlet Oxygen Electronic Structure and Energy Transfer. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press, I: 13-38.

Russell, G. A. (**1957**). Deuterium-Isotope Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons. Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 79(14): 3871-3877.

Sagripanti, J.-L., Goering, P. L., Lamanna, A. (1991). Interaction of Copper with DNA and Antagonism by Other Metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110(3): 477-485.

Scholes, G., Weiss, J., Wheeler, C. M. (**1956**). Formation of Hydroperoxides from Nucleic Acids by Irradiation with X-Rays in Aqueous Systems. *Nature* 178(4525): 157-157.

Scholes, G., Weiss, J. (1954). Chemical Action of X-Rays on Nucleic Acids and Related Substances in Aqueous Systems. 2. The Mechanism of the Action of X-Rays on Nucleic Acids in Aqueous Systems. *Biochem. J.* 56(1): 65-72.

Scholes, G., Weiss, J. (1960). Organic Hydroxy-Hydroperoxides - Class of Hydroperoxides Formed under the Influence of Ionizing Radiations. *Nature* 185(4709): 305-306.

Shen, H. R., Spikes, J. D., Kopecekova, P.,Kopecek, J. (**1996**). Photodynamic Crosslinking of Proteins.1. Model studies Using Histidine- and Lysine-containing *N*-(2-hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymers. *J. Photochem. Photobiol.*, *B* 34(2-3): 203-210.

Shen, H. R., Spikes, J. D., Kopeckova, P.,Kopecek, J. (**1996**). Photodynamic Crosslinking of proteins.2. Photocrosslinking of a Model Protein-Ribonuclease A. J. Photochem. Photobiol., B 35(3): 213-219.

Shen, H.-R., Spikes, J. D., Smith, C. J., Kopecek, J. (2000). Photodynamic Cross-Linking of Proteins: IV. Nature of the His-His Bond(s) Formed in the Rose Bengal-Photosensitized Cross-Linking of *N*-benzoyl-Histidine. *J. Photochem. Photobiol.*, A 130(1): 1-6.

Steinbeck, M. J., Khan, A. U., Karnovsky, M. J. (**1992**). Intracellular Singlet Oxygen Generation by Phagocytosing Neutrophils in Response to Particles Coated with a Chemical Trap. *J. Biol. Chem.* 267(19): 13425-13433.

Straight, R. S., Spikes, J. D. (**1985**). Photosensitized Oxidation of Biomolecules. *Singlet O*<sub>2</sub>. A. A. Frimer, CRC Press, IV: 91-143.

Sun, S. N., Bao, Z. J., Ma, H. M., Zhang, D. Q., Zheng, X. P. (**2007**). Singlet Oxygen Generation from the Decomposition of  $\alpha$ -Linolenic Acid Hydroperoxide by Cytochrome C and Lactoperoxidase. *Biochemistry* 46(22): 6668-6673.

Suzuki, H., Kurita, T., Kakinuma, K. (**1982**). Effects of Neuraminidase on  $O_2$  Consumption and Release of  $O_2$  and  $H_2O_2$  from Phagocytosing Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Blood* 60(2): 446-453.

Tan, K. H., Meyer, D. J., Coles, B., Ketterer, B. (**1986**). Thymine Hydroperoxide, a Substrate for Rat Se-Dependent Glutathione-Peroxidase and Glutathione Transferase Isoenzymes. *FEBS Lett.* 207(2): 231-233.

Tan, K. H., Meyer, D. J., Gillies, N., Ketterer, B. (**1988**). Detoxification of DNA Hydroperoxide by Glutathione Transferases and the Purification and Characterization of Glutathione Transferases of the Rat-Liver Nucleus. *Biochem. J.* 254(3): 841-845.

Tatsuzawa, H., Maruyama, T., Hori, K., Sano, Y.,Nakano, M. (**1999**). Singlet Oxygen ( ${}^{1}\Delta_{g}$  O<sub>2</sub>) as the Principal Oxidant in Myeloperoxidase-Mediated Bacterial Killing in Neutrophil Phagosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262(3): 647-650.

Terao, J., Matsushita, S. (1977). Products Formed by Photosensitized Oxidation of Unsaturated Fatty-Acid Esters. J. Am. Oil Chem. Soc. 54(6): 234-238.

Termini, J. (2000). Hydroperoxide-Induced DNA Damage and Mutations. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 450(1-2): 107-124.

Tofigh, S., Frenkel, K. (1989). Effect of Metals on Nucleoside Hydroperoxide, a Product of Ionizing-Radiation in DNA. *Free Radical Biol. Med.* 7(2): 131-143.

Wagner, J. R., van Lier, J. E., Berger, M., Cadet, J. (1994). Thymidine Hydroperoxides - Structural Assignment, Conformational Features, and Thermal-Decomposition in Water. J. Am. Chem. Soc. 116(6): 2235-2242.

Waldemar, A., Kurz, A., Saha-Moller, C. R. (2000). Peroxidase-Catalyzed Oxidative Damage of DNA and 2 '-Deoxyguanosine by Model Compounds of Lipid Hydroperoxides: Involvement of Peroxyl Radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 13(12): 1199-1207.

Wardman, P. (**1989**). Reduction Potentials of One-Electron Couples Involving Free-Radicals in Aqueous-Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 18(4): 1637-1755.

Wasserman, H. H., Scheffer, J. R., Cooper, J. L. (1972). Singlet Oxygen Reactions with 9,10-Diphenylanthracene Peroxide. J. Am. Chem. Soc. 94(14): 4991-4996.

Wasserman, H. H., Murray, R. W. (1979). Singlet Oxygen. *Organic Chemistry*. H. H. Wasserman, Academic Press, 40: 174-242.

Wilkinson, F., Helman, W. P., Ross, A. B. (1995). Rate Constants for Tte 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 24(2): 663-1021.

Winterbourn, C. C., Kettle, A. J. (**2000**). Biomarkers of Myeloperoxidase-Derived Hypochlorous Acid. *Free Radical Biol. Med.* 29(5): 403-409.

Yang, M. H., Schaich, K. M. (1996). Factors Affecting DNA Damage Caused by Lipid Hydroperoxides and Aldehydes. *Free Radical Biol. Med.* 20(2): 225-236.

APÊNDICES

# **APÊNDICES**

# Apêndice A - Análise de 5-(hidroperoxi)metiluracila por RMN

O hidroperóxido 5-HPMU (5 mg) foi solubilizado em 600  $\mu$ l de DMSO- $d_6$  e analisado por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY e HMBC (Figuras A-1 a A-4, Tabela A-1) em um espectrômetro de 500 MHz DRX500 da Bruker – Biopsin (Alemanha).



**Figura A-1.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de 5-HPMU.



**Figura A-2.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de 5-HPMU.

Posição	Deslocamento químico de <sup>1</sup> H (ppm)	Posição	Deslocamento químico de <sup>13</sup> C (ppm)
а	11,120 (s)	1	151,235
b	10,905 (d)	2	163,740
c	7,479 (d)	3	106,989
d	4,471 (s)	4	142,693
e	4,471 (s)	5	69,884
f	11,575 (s)		

s = singleto, d = dubleto



Figura A-3. Espectro de COSY de RMN de 5-HPMU.



Figura A-4. Espectro de HMBC de RMN de 5-HPMU.

### Apêndice B - Cálculo do rendimento de oxigênio molecular singlete

O rendimento de  $O_2 ({}^{1}\Delta_g)$  foi calculado através da decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub>, um endoperóxido derivado de naftaleno hidrossolúvel (Figura A-5). A decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub> a 37 °C pode gerar O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_g$ ) com um rendimento de 59 % ( $k = 5,02 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ ). A emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_g$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270 \text{ nm}$ ) foi monitorada durante a decomposição térmica de 21 mM de DHPNO<sub>2</sub> (em D<sub>2</sub>O) por 4000 s a 37 °C (Figura A-5). A área da região de emissão de luz estável (250 a 450 s) foi integrada com o objetivo de se estabelecer uma correlação entre o valor de área e a quantidade de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_g$ ) produzida. Posteriormente, o valor da área da cinética de emissão de luz de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_g$ ) gerado na reação de 5-HPMU e Ce<sup>4+</sup> (Figura 4.10) ou HOCI (Figura 4.16) foi comparado com o valor de área obtido na decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub> (250 a 450 s) e finalmente, calculou-se o rendimento de O<sub>2</sub> ( ${}^{1}\Delta_g$ ).



**Figura A-5.** Emissão de luz monomolecular de O<sub>2</sub> ( $^{1}\Delta_{g}$ ) na região do IR-próximo ( $\lambda = 1270$  nm) monitorada na decomposição térmica de DHPNO<sub>2</sub>, realizada a 37 °C durante 4000 s.