

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$,
e estudos de lesões em DNA**

Glauca Regina Martinez

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Paolo Di Mascio

Orientador

SÃO PAULO

2003

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

Martinez, Glaucia Regina
M385g Geração química de oxigênio-18 molecular no estado
singlete, $^{18}\text{O}_2 (^1\Delta_g)$, e estudos de lesões em DNA / Glaucia
Regina Martinez. -- São Paulo, 2003.
171p

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

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

574.873282 CDD

**“Geração Química do Oxigênio-18
Molecular no Estado Singlete, $^{18}\text{O}_2$
($^1\Delta_g$), e Estudos de Lesões em DNA”**

***GLAUCIA REGINA
MARTINEZ***

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. PAOLO DI MASCIO
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP

Prof. Dr. LUIZ HENRIQUE CATALANI
IQ – USP

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK
ICB – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

SÃO PAULO
13 DE MARÇO 2003.

Apoio Financeiro

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

PRONEX/FINEP – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade de São Paulo

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

A Deus por tudo.

Aos meus pais, Doralice e Euclides, pelo incentivo e apoio.

Ao meu esposo, Eduardo, pelo amor e companherismo.

Ao meu irmão, Marcel, família e amigos pelo carinho e atenção.

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio pela orientação científica, incentivo, confiança e amizade.

À Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, pela colaboração científica, amizade e incentivo.

Aos pesquisadores do CEA/Grenoble/França, Dr. Jean Cadet, Dr. Jean-Luc Ravanat e Dr. Didier Gasparutto pela constante colaboração científica e por terem me recebido em seus laboratórios.

A todos os professores e alunos que participam do grupo de Radicais Livres, pelo apoio e discussões produtivas.

Aos professores do Instituto de Química da USP que muito contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Em particular ao Prof. Dr. José Manuel Riveros Nigra pela sugestão do título da tese.

A todos os funcionários do Instituto de Química da USP, em especial ao Rodolfo, pela amizade e ao pessoal da seção de pós-graduação pela atenção e eficiência na prestação de serviços.

A todos os antigos e atuais colegas dos laboratórios do Paolo e da Marisa: Janice, Sayuri, Priscila, Tedra, Lydia, Eduardo, Clécio, Ana Paula Martins, Daniela, Leonardo, Miriam, Christiane, Sabrina, Ana Paula Loureiro, Cláudia, Valdemir, Osmar, Alexandre, Lívea, Camila, pela convivência, apoio, incentivo e paciência.

A todos os colegas e amigos do Instituto de Química que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma no meu caminho pela pós-graduação e pela vida.

Aos meus colegas da graduação: Sheila, Herbert, Fábio, Ricardo, César, Rodrigo, Marcelo e muitos outros que me acompanharam nessa jornada.

Ao meu esposo, Eduardo, por me fazer mais feliz.

Aos meus pais, meu irmão, amigos e todos da minha família pela preocupação, carinho e apoio.

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida.

MUITO OBRIGADA A TODOS !!!

Índice

Índice

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Espécies reativas de oxigênio e implicações biológicas	1
1.2 Oxigênio	3
1.2.1 Oxigênio singlete	4
1.2.1.1 Luminescência do oxigênio singlete	5
1.2.1.2 Tempo de vida	7
1.2.1.3 Desativação do oxigênio singlete	8
1.2.1.4 Detecção do oxigênio singlete	11
1.2.1.4.1 Captadores químicos	11
1.2.1.4.2 Detecção da luminescência	14
1.2.1.4.3 Técnica resolvida no tempo na região do infravermelho próximo	15
1.2.1.4.4 Utilização de solventes deuterados e desativadores físicos	15
1.2.1.5 Geração de oxigênio singlete	16
1.2.1.5.1 Fotossensibilização	16
1.2.1.5.2 Peroxidação lipídica	18
1.2.1.5.3 Reações enzimáticas	20
1.2.1.5.4 Fagocitose	20
1.2.1.5.5 Fontes químicas	21
1.2.1.5.5.1 Derivados naftalênicos hidrossolúveis	23
1.3 Conseqüências biológicas da ação do oxigênio singlete	28
1.3.1 Danos em DNA	28
1.3.1.2 Efeito mutagênico do oxigênio singlete e sistemas de reparo	35
1.3.2 Danos em lipídeos e proteínas	36
1.3.3 Efeito sinalizador do oxigênio singlete em sistemas biológicos	39
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Materiais	42

3.2 Equipamentos	43
3.3 Procedimentos experimentais	45
3.3.1 Síntese do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico	45
3.3.1.1 Bromação radicalar do 1,4-dimetilnaftaleno	46
3.3.1.2 Síntese malônica	46
3.3.1.2.1 Tratamento de solventes e do éster malônico	47
3.3.1.3 Hidrólise e Descarboxilação	48
3.3.2 Síntese do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio	48
3.3.2.1 Tratamento de solvente para preparação do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio	49
3.3.3 Síntese da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida	49
3.3.3.1 Esterificação	49
3.3.3.2 Amidificação	50
3.3.4 Preparação dos endoperóxidos dos derivados de naftaleno	51
3.3.4.1 Síntese do endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio	51
3.3.4.2 Síntese do endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida	52
3.3.4.3 Preparação do endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida marcada com oxigênio-18	53
3.3.4.4 Análise dos endoperóxidos	53
3.3.5 Termólise de endoperóxidos e detecção de luminescência no infravermelho	54
3.3.6 Detecção do oxigênio singlete gerado por diferentes sistemas usando o captador químico EAS	55
3.3.6.1 Preparação do padrão de EASO ₂	55
3.3.6.2 Incubação do EAS com diversas fontes de oxigênio singlete	55
3.3.6.2.1 Incubação com o DHPNO ₂	55
3.3.6.2.2 Incubação com o DHPN ¹⁸ O ₂	56

3.3.6.2.3 Incubação com o sistema H_2O_2 e OCI^-	56
3.3.6.2.4 Incubação com o sistema ONOO^- e H_2O_2	56
3.3.6.3 Detecção do EASO_2 gerado pelos diferentes sistemas	57
3.3.6.4 Análise por espectrometria de massas do EAS , EASO_2 e $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$	57
3.3.7 Incubação dos endoperóxidos com 2'-desoxiguanosina	57
3.3.7.1 Quantificação dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados na incubação com os endoperóxidos NDPO_2 e DHPNO_2	57
3.3.7.1.1 Detecção da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	58
3.3.7.1.2 Detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína	58
3.3.7.2 Purificação e caracterização por espectrometria de massas dos produtos de oxidação gerados na incubação da 2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO_2 ou $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$	59
3.3.7.2.1 Purificação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por HPLC	59
3.3.7.2.2 Purificação dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína por HPLC	59
3.3.7.2.3 Caracterização por espectrometria de massas dos produtos de oxidação gerados na incubação da 2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO_2 ou $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$	60
3.3.8 Incubação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO_2 e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$	60
3.3.8.1 Separação por HPLC e caracterização por espectrometria de massas dos produtos gerados na incubação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO_2 e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$	60
3.3.8.2 Purificação e caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína	61

3.3.8.3	Purificação e caracterização da guanidino- hidantoína oxidada	61
3.3.9	Síntese da 8-bromo-2'-desoxiguanosina	62
3.3.10	Síntese da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina	63
3.3.11	Incubação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO ₂ ou DHPN ¹⁸ O ₂	64
3.3.11.1	Separação por HPLC e caracterização por MS dos produtos gerados na incubação da 8-metoxi- 2'-desoxiguanosina com DHPNO ₂ e DHPN ¹⁸ O ₂	64
3.3.12	Preparação de oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'- desoxiguanosina	65
3.3.12.1	Princípios gerais da síntese de oligonucleotídeos	65
3.3.12.2	Preparação do sinton fosforamidita da 8-metoxi- 2'-desoxiguanosina para síntese de oligonucleotídeo	68
3.3.12.2.1	Síntese da <i>N</i> ² -isobutiril-8-metoxi-2'- desoxiguanosina	69
3.3.12.2.2	Síntese da 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)- <i>N</i> ² - isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina	70
3.3.12.2.3	Síntese da 3'-O-[(2- cianoetoxi)(diisopropilamino) fosfino]-5'- O-(4,4'-dimetoxitritil)- <i>N</i> ² -isobutiril-8- metoxi-2'-desoxiguanosina	71
3.3.12.3	Síntese do oligonucleotídeo	72
3.3.12.4	Análise e purificação do oligonucleotídeo preparado	73
3.3.13	Incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo com DHPNO ₂	73
3.3.13.1	Separação por HPLC e detecção por MS/MS dos produtos gerados na incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo com DHPNO ₂	73
3.3.14	Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete	74

3.3.15 Incubação de DNA de timo de bezerro com os endoperóxidos NDPO ₂ e DHPNO ₂	75
3.3.16 Tratamento das células com os endoperóxidos	75
3.3.16.1 Avaliação da citotoxicidade dos derivados de naftaleno e respectivos endoperóxidos	75
3.3.16.2 Tratamento das células com DHPNO ₂ e NDPO ₂	76
3.3.16.3 Tratamento das células com DHPN ¹⁸ O ₂	76
3.3.16.4 Extração do DNA das células	77
3.3.17 Digestão do DNA	77
3.3.18 Quantificação da 8-oxodGuo gerada por ¹ O ₂ em DNA de timo de bezerro e DNA de células em cultura	78
3.3.18.1 Análise de 8-oxodGuo gerada por ¹ O ₂ em DNA de timo de bezerro e DNA de células de fibroblastos (detecção eletroquímica)	78
3.3.18.2 Análise de 8-oxodGuo gerada por ¹ O ₂ em DNA de células de monócitos (detecção por HPLC-MS/MS)	78
4 RESULTADOS	80
4.1 Caracterização dos endoperóxidos dos derivados do naftaleno	80
4.1.1 Endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio	80
4.1.2 Endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida	81
4.1.3 Endoperóxido da <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida marcada com oxigênio-18	83
4.2 Estudos da quimiluminescência da transição monomolecular do oxigênio singlete produzido pela termodecomposição de endoperóxidos	84
4.3 Detecção de ¹ O ₂ gerado por diferentes sistemas	86
4.3.1 Separação e identificação de EAS e EASO ₂ por HPLC	86
4.3.2 Detecção de EASO ₂ gerado na incubação com DHPNO ₂	87
4.3.3 Detecção de EASO ₂ gerado na incubação do H ₂ O ₂ com OCl ⁻	88

4.3.4 Detecção de EASO ₂ gerado na incubação do ONOO ⁻ com H ₂ O ₂	88
4.4 Análise de EAS e EASO ₂ por espectrometria de massas	90
4.5 Caracterização do EAS ¹⁸ O ₂ gerado pela incubação de DHPN ¹⁸ O ₂ com EAS	91
4.6 Oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	94
4.6.1 Análise dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados pelos endoperóxidos NDPO ₂ e DHPNO ₂ .	94
4.6.2 Análise por espectrometria de massas dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados na incubação com os endoperóxidos DHPNO ₂ e DHPN ¹⁸ O ₂ .	96
4.6.2.1 Caracterização da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina	96
4.6.2.2 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína	97
4.7 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	102
4.7.1 Separação por HPLC e detecção da imidazolona e oxazolona	102
4.7.2 Separação por HPLC e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína	105
4.7.3 Separação por HPLC e detecção do precursor do ácido cianúrico	108
4.7.4 Separação por HPLC e caracterização da guanidinhidantoína oxidada	110
4.8 Oxidação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	110
4.8.1 Separação por HPLC e caracterização dos produtos gerados na incubação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO ₂ ou DHPN ¹⁸ O ₂	114
4.9 Preparação e utilização do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina	114
4.9.1 Purificação por HPLC e caracterização do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina	120

4.9.2 Separação por HPLC e caracterização do produto gerado na incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO ₂	120
4.10 Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete	123
4.11 Formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em DNA por oxigênio singlete	125
4.11.1 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de timo de bezerro	125
4.11.2 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de células de fibroblastos	126
4.11.3 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de células de monócitos	127
5 DISCUSSÃO	131
5.1 Endoperóxidos de derivados de naftaleno como fonte química de oxigênio singlete	131
5.2 Detecção de oxigênio singlete gerado por diferentes sistemas	138
5.3 Oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	140
5.4 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	141
5.5 Oxidação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	146
5.6 Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete em solução aquosa	149
5.7 Formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em DNA pela oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete	151
6 CONCLUSÕES	153
7 PERSPECTIVAS	154
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXOS	A1

Índice de figuras e tabelas

Índice de figuras

- Figura 1.1** Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$). 5
- Figura 1.2** Tipos de reações do 1O_2 com compostos insaturados. **(A)** Reação do tipo “ene” formando hidroperóxido. **(B)** Cicloadição [2+2] formando dioxetano. **(C)** Cicloadição [2+4] formando endoperóxido. 11
- Figura 1.3** Reação de um derivado de furano com 1O_2 . R é um substituinte qualquer. 12
- Figura 1.4** Esquema de captura e liberação de 1O_2 pelo rubreno. 13
- Figura 1.5** Reação de um derivado de antraceno EAS com 1O_2 gerando o respectivo endoperóxido EASO₂. 14
- Figura 1.6** Esquema de fotossensibilização mostrando os mecanismos tipo I e II. (S = substrato, ISC = cruzamento intersistema, sens = sensibilizador). 17
- Figura 1.7** Representação geral das fases da peroxidação lipídica. Em destaque está representada a geração de 1O_2 pela interação de dois radicais peroxila. 19
- Figura 1.8** Termodecomposição de endoperóxido naftalênico e cicloadição de 1O_2 na posição 1,4 do anel naftalênico substituído com grupo hidrofílico (G). 22
- Figura 1.9** Derivados de naftaleno com substituintes hidrofílicos. 23

Figura 1.10 Estratégia de síntese para alguns derivados de naftaleno hidrossolúveis partindo do 1,4-dimetilnaftaleno.	24
Figura 1.11 Esquema de foto-oxidação da guanosina por $^1\text{O}_2$ à baixa temperatura em meio apolar (Kang e Foote, 2002a).	30
Figura 1.12 Esquema de oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$ em meio aquoso (Ravanat e Cadet, 1995 e Kang e Foote, 2002b).	31
Figura 1.13 Produtos clássicos de oxidação da guanina e 8-oxoGua formados pela reação com $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização.	32
Figura 1.14 Produtos formados pela oxidação da 8-oxoGuo usando (A) Fotossensibilização com riboflavina ou (B) Ir(IV) como oxidante. (C) Via preferencial da oxidação da 8-oxoGuo nucleosídeo em pH 4, em DNA fita dupla e em oligômeros fita simples a 4 °C. (D) Via preferencial da oxidação da 8-oxoGuo nucleosídeo em pH 7 a 25 °C e em oligonucleotídeos fita simples a 50°C.	33
Figura 1.15 Produtos relatados para oxidação da 8-oxodGuo usando a porfirina Mn-TMPyP/KHSO ₄ num modelo de dinucleotídeo. Formação da dlz e da dGh ^{ox} como produtos principais. Redução do composto dGh ^{ox} com NaBH ₄ para caracterização.	34
Figura 3.1 Rota de síntese do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico.	45
Figura 3.2 Rota de síntese do DHPN partindo do ANDP.	49
Figura 3.3 Esquema do sistema utilizado para síntese do DHPN ¹⁸ O ₂	53
Figura 3.4 Rota adotada para síntese da 8-MeOdGuo.	63
Figura 3.5 Reação de acoplamento utilizando monômero de fosforamidita.	66

- Figura 3.6** Ciclo de condensação pelo método da fosforamidita. 68
- Figura 3.7** Rota de preparação do sinton fosforamidita da 8-MeOdGuo. 69
- Figura 3.8** Estrutura da 8-oxodGuo (M), 8-oxodGuo (M+5) e ¹⁸O-8-oxodGuo (M+2). 79
- Figura 4.1** Espectro de massas do NDPO₂ dissolvido em água e detecção feita no modo ESI- com voltagem do cone de 10V. 80
- Figura 4.2.** Cinética da termólise do endoperóxido DHPNO₂ a 37 °C monitorando a absorção em 288nm. 81
- Figura 4.3** Sobreposição de espectros mostrando o surgimento da banda em 288nm à medida que o endoperóxido é destruído. 82
- Figura 4.4** Espectro de massa do DHPNO₂ dissolvido em água e detecção feita no modo ESI+ com voltagem do cone de 10V. 82
- Figura 4.5** Espectros de massas do DHPN¹⁸O₂ no modo ESI+ obtidos em diferentes voltagens de cone 5, 10 e 20V. 83
- Figura 4.6** Efeito da temperatura na intensidade de quimiluminescência do ¹O₂ em $\lambda = 1270$ nm na termólise do NDPO₂. 84
- Figura 4.7** Espectro de quimiluminescência do ¹O₂ no infravermelho. **(A)** Reação entre H₂O₂ e MoO₄²⁻ em 50% D₂O. **(B)** Termólise do DHPNO₂ 10 mM a 40°C em D₂O. **(C)** Termólise de NDPO₂ 10 mM a 40°C em H₂O. **(D)** Termólise do NDPO₂ 10 mM a 40°C em D₂O. 85
- Figura 4.8** Efeito de supressor da NaN₃ na intensidade de quimiluminescência do ¹O₂ monitorada em $\lambda = 1270$ nm. **(a)** Termólise

- de DHPNO₂ 10 mM em D₂O a 40 °C. **(b)** Termólise de DHPNO₂ 10 mM em D₂O a 40 °C com injeção de 0,4 mL de uma solução 0,1 M de NaN₃ no máximo de emissão de luz. 86
- Figura 4.9** Cromatogramas obtidos com injeção de amostra de EAS ou EASO₂. 87
- Figura 4.10** Cromatogramas das incubações de DHPNO₂ com EAS em pH 7,4. **(a)** DHPNO₂ termodecomposto e EAS após incubação por 2 h a 40°C. **(b)** DHPNO₂ e EAS antes da incubação (tempo = 0). **(c)** DHPNO₂ e EAS após incubação por 2 h a 40°C. 87
- Figura 4.11** Cromatogramas das incubações de EAS com o sistema H₂O₂ e OCl⁻ em pH 7,4. **(a)** Controle OCl⁻ e EAS. **(b)** Controle H₂O₂ e EAS. **(c)** Incubação OCl⁻, H₂O₂ e EAS. 88
- Figura 4.12** Cromatogramas das incubações de ONOO⁻ com EAS em pH 7,4. **(1)** **(a)** 1 mM de ONOO⁻ com 8 mM de EAS, **(b)** 15 mM de ONOO⁻ com 8 mM de EAS e **(c)** 15 mM de ONOO⁻ com 8 mM de EAS, co-injeção de EASO₂. **(2)** Incubação 15 mM de ONOO⁻ e 100 mM de H₂O₂ com 8 mM de EAS. 89
- Figura 4.13** Espectros de massas do EAS adquirido no modo ESI- obtidos em diferentes voltagens de cone 10 e 20V. 90
- Figura 4.14** Espectros de massas do EASO₂ adquirido no modo ESI- obtidos em diferentes voltagens de cone 10 e 20V. 91
- Figura 4.15** Reação de formação do EAS¹⁸O₂ pela termólise do DHPN¹⁸O₂ e espectros de massas adquiridos no modo ESI-. **(A)** Sem borbulhar N₂ antes da incubação. **(B)** Com borbulho de N₂ antes da incubação. **(C)** Com borbulho de O₂ antes da incubação. 92

- Figura 4.16** Razão dos produtos $EAS^{18}O_2$ e $EASO_2$ formados na incubação com $DHPN^{18}O_2$ sob diversas condições. **(A)** Efeito do O_2 dissolvido sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$: **(i)** sem borbulhar N_2 antes da incubação; **(ii)** com borbulho de N_2 antes da incubação; **(iii)** com borbulho de O_2 antes da incubação. **(B)** Efeito da concentração de $DHPN^{18}O_2$ sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$. **(C)** Efeito da quantidade de D_2O na solução sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$. 93
- Figura 4.17** Cromatograma do padrão de $0,5 \mu M$ de 8-oxodGuo, detector eletroquímico. 94
- Figura 4.18** Cromatograma da solução padrão de $0,52 mM$ de dSp. 95
- Figura 4.19** Comparação entre as quantidades de produtos formados pela oxidação da dGuo por 1O_2 gerado pelos endoperóxidos. **(A)** Níveis de dSp (μM). **(B)** Níveis de 8-oxodGuo (μM). O símbolo 30* refere-se à incubação da dGuo com $30 mM$ de $NDPO_2$ ou $DHPNO_2$ termodecompostos. 95
- Figura 4.20** Espectro de massas obtido no modo ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da 8-oxodGuo formada na incubação de dGuo com 1O_2 gerado pelo $DHPNO_2$. 96
- Figura 4.21** Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da 8-oxodGuo formada na incubação de dGuo com $^{18}[^1O_2]$ gerado pelo $DHPN^{18}O_2$. 97
- Figura 4.22** Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da dSp formada na incubação de dGuo com 1O_2 gerado pelo $DHPNO_2$. 98
- Figura 4.23** Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da dSp formada na incubação de dGuo com $^{18}[^1O_2]$ gerado pelo $DHPN^{18}O_2$. 99

- Figura 4.24** Possível mecanismo para formação da dSp com a incorporação de apenas um átomo de oxigênio-18 devido ao ataque da água no intermediário (I). 100
- Figura 4.25** Possível mecanismo para formação da dSp com a incorporação de dois átomos de oxigênio-18. 100
- Figura 4.26** Espectro de íons filhos obtido para a dSp formada pela reação de dGuo com $^{18}[^1\text{O}_2]$ no modo ESI+ selecionando os íons de m/z 184, 186 e 188 no MS1 com potencial do cone em 30 V e energia de colisão em 26 eV. 101
- Figura 4.27 (A)** Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 229 correspondente à dlz. **(B)** Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 247 correspondente à dOz. **(C)** Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 231 correspondente à dlz marcada com oxigênio-18. **(D)** Cromatograma obtido selecionando o íon em m/z = 249 correspondente à dOz marcada com oxigênio-18. 102
- Figura 4.28 (A)** Espectro de massas do produto dlz formado pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$. **(B)** Espectro de massas do produto dlz isotopicamente marcado com oxigênio-18 formado pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[^1\text{O}_2]$. 103
- Figura 4.29** Mecanismo de hidrólise da imidazolona para formar a oxazolona (Raoul *et al.*, 1995). 104
- Figura 4.30 (A)** Espectro de massas do produto dOz formado pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$. **(B)** Espectro de massas do produto dOz isotopicamente marcado com oxigênio-18 formado pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[^1\text{O}_2]$. 105
- Figura 4.31 (A)** Espectro de massas da dSp gerada na oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+ usando a função de perda

neutra de 116 u.m.a. **(B)** Espectro de massas da dSp gerada na oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+ adquirido no MS1. 106

Figura 4.32 Espectro de fragmentação (MS/MS) da dSp obtido no modo ESI+. **(A)** Formada pela foto-oxidação da dGuo na presença de azul de metileno. **(B)** Formada pela oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ gerado pelo DHPNO₂. 107

Figura 4.33 (A) Espectro de massas da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+. **(B)** Espectro de massas da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ obtido no modo ESI+. **(C)** Espectro de íons filhos da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+ selecionando o íon com $m/z = 184$ no MS1. **(D)** Espectro de íons filhos da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ obtido no modo ESI+ selecionando o íon com $m/z = 186$ no MS1. 108

Figura 4.34 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI+ para o precursor do ácido cianúrico. **(A)** Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 288$ na função de perda neutra de 116 u.m.a. **(B)** Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 288$. **(C)** Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 172$. **(D)** Espectro de massas referente ao sinal em 7 min do cromatograma A. **(E)** Espectro de massas referente ao sinal em 7 min do cromatograma B. 109

Figura 4.35 (A) Cromatograma com detecção UV em $\lambda = 230$ nm. **(B)** Cromatograma obtido selecionando a massa da dGh^{ox} em $m/z = 272$ para análise no modo ESI+. **(C)** Cromatograma obtido selecionando a massa do principal fragmento da dGh^{ox} $m/z = 156$ para análise no modo ESI+, na função de íons filhos de $m/z = 272$. 111

Figura 4.36 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI+ para a dGh^{ox}. **(A)** Cromatograma obtido selecionando o íon com

m/z = 272 **(B)** Cromatograma obtido na função íons filhos de m/z = 156. **(C)** Cromatograma obtido na função íons filhos de m/z = 272. **(D)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma A. **(E)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma B. **(F)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma C. 112

Figura 4.37 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI- para a dGh^{ox}. **(A)** Cromatograma obtido selecionando o íon com m/z = 270. **(B)** Cromatograma obtido na função íons filhos de m/z = 270. **(C)** Cromatograma obtido na função íons pais de m/z = 180. **(D)** Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma A. **(E)** Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma B. **(F)** Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma C. 113

Figura 4.38 Cromatogramas obtidos na função de perda neutra de 116 u.m.a. para os produtos formados na reação de 8-MeOdGuo com ¹O₂ ou ¹⁸[¹O₂]. **(A)** Selecionando o íon em m/z = 229 referente à dlz. **(B)** Selecionando o íon em m/z = 247 referente à dOz. **(C)** Selecionando o íon em m/z = 314 referente à 8-MeOdSp. **(D)** Selecionando o íon em m/z = 231 referente à dlz marcada com oxigênio-18. **(E)** Selecionando o íon em m/z = 249 referente à dOz marcada com oxigênio-18. **(F)** Selecionando o íon em m/z = 316 referente à 8-MeOdSp marcada com oxigênio-18. 114

Figura 4.39 (A) Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. para o produto dlz. **(B)** Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. para o produto dlz marcado com oxigênio-18. 115

Figura 4.40 (A) Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. do produto dOz e 8-MeOdGuo. **(B)** Espectro de massas

obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. dos produtos dOz e 8-MeOdGuo marcados com oxigênio-18. 116

Figura 4.41 (A) Cromatograma obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando a massa de $m/z = 191$ do produto formado na reação de 8-MeOdGuo com $^1\text{O}_2$. **(B)** Cromatograma obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando a massa de $m/z = 191$ do produto formado na reação de 8-MeOdGuo com $^{18}[^1\text{O}_2]$. **(C)** Espectro de massas da região mostrada nos cromatogramas A e B. 117

Figura 4.42 (A) Cromatograma obtido pela função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando o íon $m/z = 286$ na reação de 8-MeOdGuo com DHPNO₂. **(A1)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma A. **(A2)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma A. **(B)** Cromatograma obtido pela função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando o íon de $m/z = 288$ na reação de 8-MeOdGuo com DHPNO¹⁸O₂. **(B1)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma B. **(B2)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma B. 118

Figura 4.43 Espectros de massas na função de íons filhos obtido no modo ESI+ para o produto formado na reação da 8-MeOdGuo com $^1\text{O}_2$ ou $^{18}[^1\text{O}_2]$. **(A)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma A da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 286$ no MS1. **(B)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma A da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 286$ no MS1. **(C)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma B da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 288$ no MS1. **(D)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma B da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 288$ no MS1. 119

Figura 4.44 Comparação do consumo de 8-MeOdGuo e 8-oxodGuo na reação com $^1\text{O}_2$ produzido pela termólise de 10 mM do endoperóxido DHPNO₂ à 10°C. 120

- Figura 4.45 (A)** Cromatograma do material bruto da síntese do T_8-MeO_T, no qual está indicado o sinal referente ao produto esperado. **(B)** Cromatograma do produto T_8-MeO_T após purificação. 121
- Figura 4.46** Espectro de massas obtido para o oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo no modo ESI-. 122
- Figura 4.47** Cromatogramas obtidos para análise em HPLC e análise por MS no modo ESI-. **(A)** Monitoramento do íon de $m/z = 904$. **(B)** Monitoramento do íon de $m/z = 835$. **(C)** Espectro de massas obtido no modo ESI- para o oligonucleotídeo detectado no cromatograma A. **(D)** Espectro de massas obtido no modo ESI- para o oligonucleotídeo detectado no cromatograma B. 123
- Figura 4.48 (A)** Decaimento da luminescência em 1270 nm e efeito do desativador no tempo de vida do 1O_2 . **(B)** Gráfico da k_{obs} em função da concentração do desativador. 124
- Figura 4.49** Comparação entre as quantidades de 8-oxodGuo formada pela oxidação de DNA-TB por 1O_2 gerado pelos endoperóxidos. Controle refere-se às incubações contendo somente DNA-TB e o símbolo 20* refere-se à incubação de DNA-TB com 20 mM de NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos. 125
- Figura 4.50** Cromatogramas de detecção da 8-oxodGuo. **(a)** Padrão de 5 pmol de 8-oxodGuo. **(b)** Amostra do DNA extraído das células que não foram tratadas com os endoperóxidos. **(c)** Amostra do DNA extraído das células que foram tratadas com 5 mM de DHPNO₂. 126
- Figura 4.51** Comparação entre as quantidades de 8-oxodGuo formada pela oxidação do DNA celular de fibroblastos quando tratados com 1O_2 gerado pelos endoperóxidos. 127

- Figura 4.52** Reação do oxigênio singlete $^{18}[^1\text{O}_2]$ com a guanina em DNA. 128
- Figura 4.53** Cromatogramas de HPLC-MS/MS obtidos para detecção de 8-oxodGuo em DNA extraído de células de monócitos. **(A)** Células sem nenhum tratamento. **(B)** Células tratadas com endoperóxido não-marcado DHPNO₂. **(C)** Células tratadas com endoperóxido isotopicamente marcado DHPN¹⁸O₂. Para cada exemplo, o equipamento foi configurado para monitorar as transições de m/z 284→168 referente à 8-oxodGuo (M), 286→170 referente à ¹⁸O-8-oxodGuo (M+2) e 289→173 referente à 8-oxodGuo (M+5). 129
- Figura 4.54** Formação de 8-oxodGuo e ¹⁸O-8-oxodGuo em DNA de células de monócitos. **(A)** Incubadas com 6,5 mM de DHPN¹⁸O₂. **(B)** Incubadas com 16 mM de DHPN¹⁸O₂. 129
- Figura 4.55** Formação de ¹⁸O-8-oxodGuo (M+2) em DNA de células de monócitos incubadas com DHPN¹⁸O₂. **(A)** Células incubadas a 37°C por 1 h sem endoperóxido. **(B)** Células incubadas com DHPN¹⁸O₂ a 4 °C por 1 h. **(C)** Células pré-incubadas com DHPN¹⁸O₂ a 4 °C por 15 min e lavadas com PBS e posterior incubação a 37 °C por 1 h. **(D)** Células incubadas com DHPN¹⁸O₂ a 37 °C por 1 h. 130
- Figura 5.1** Estrutura de alguns sensibilizadores conhecidos. 132
- Figura 5.2** Derivados de naftaleno com substituintes com função éter. 134
- Figura 5.3** Produtos de oxidação da dGuo e 8-oxodGuo formados pela reação com ¹O₂ gerado pelo DHPNO₂. 146
- Figura 5.4** Produtos de oxidação da 8-MeOdGuo formados pela reação com ¹O₂ gerado pelo DHPNO₂. A seta em negrito indica a rota quando a 8-MeOdGuo está incorporada em oligonucleotídeo. 148

Figura 5.5 Produtos de oxidação da 8-MeOdGuo e da 8-oxodGuo formados pela reação com $^1\text{O}_2$ gerado pelo DHPNO ₂ .	148
---	-----

Índice de tabelas

Tabela 1.1 Principais propriedades físico-químicas de alguns derivados de naftaleno (Aubry <i>et al.</i> , 1995 e Pierlot <i>et al.</i> 1996).	25
Tabela 1.2 Dados de termólise de endoperóxidos de derivados de naftaleno em água a 37 °C.	27
Tabela 1.3 Dados de constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) do $^1\text{O}_2$ pelos derivados dos nucleosídeos em 1,1,2-triclorotrifluoretano (Prat <i>et al.</i> , 1997).	28
Tabela 1.4 Dados de constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) e constantes de reação (k_r) com o $^1\text{O}_2$ para ácidos graxos insaturados, seus derivados ésteres de metila e colesterol.	37
Tabela 1.5 Dados de constante de reação com o $^1\text{O}_2$ (k_r) das cadeias laterais de aminoácidos em pH 7 (Monroe, 1985; Rougee <i>et al.</i> , 1988; Wilkinson <i>et al.</i> , 1995).	38
Tabela 4.1 Principais informações sobre o espectro de massas do DHPN ¹⁸ O ₂	83
Tabela 4.2 Constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) do $^1\text{O}_2$	125

Abreviaturas

Abreviaturas

λ	Comprimento de onda
τ	Tempo de vida do $^1\text{O}_2$
4-OH-8-oxodGuo	4-Hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
5'-DMTr- N^2 -ibu-8-MeOdGuo	5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)- N^2 -isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina
8-BrdGuo	8-Bromo-2'-desoxiguanosina
8-MeOdGuo	8-Metoxi-2'-desoxiguanosina
8-oxodGMP	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato
8-oxodGTP	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
8-oxodGuo	8-Oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
8-oxoGuo	8-Oxo-7,8-dihidroguanosina
ácido cianúrico	Ácido 1-(-2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosil) cianúrico
ACN	Acetonitrila
ANDP	Ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BBMN	1,4-Bis(bromometil)naftaleno
TLC	Cromatografia em camada delgada
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DEPT	Correlação ^1H - ^{13}C por intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
dGh	Guanidinohidantoína com a 2'-desoxirribose
dGh ^{ox}	Guanidinohidantoína oxidada
dGuo	2'-Desoxiguanosina
DHPN	<i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida
DHPN (IUPAC)	<i>N</i> -(2,3-dihidroxipropil)-3-{4-[2-(2,3-dihidroxipropilcarbomoil)-etil]-naftalen-1-il}-propanamida
DHPN ¹⁸ O ₂	Endoperóxido <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida marcado com oxigênio-18
DHPNO ₂	Endoperóxido <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
dlz	Imidazolona
DME	Meio de cultura modificado por Dulbecco
DMF	Dimetilformamida
DMN	1,4-Dimetilnaftaleno
DMNO ₂	Endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DMTr	4,4'-Dimetoxitritil
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DNA-TB	DNA de timo de bezerro
dOxa	Ácido oxalúrico
dOz	Oxazolona
DPA	9,10-Difenilantraceno
DPAO ₂	Endoperóxido do 9,10-difenilantraceno
dSp	Espiroiminodihidantoína com 2'-desoxirribose
EAS	Sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracen-9-il]-etil}éster de sódio
EAS ¹⁸ O ₂	Endoperóxido do sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-etil]éster de sódio marcado com oxigênio-18
EASO ₂	Endoperóxido do sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-etil]éster de sódio
EDTA	Ácido etilenotriaminotetraacético
ESI-	Modo negativo de ionização por <i>electrospray</i>
ESI+	Modo positivo de ionização por <i>electrospray</i>
Gh	Guanidinhidantoína
HMN	1,4-Dihidroximetilnaftaleno
HMN (IUPAC)	(4-hidroximetil-naftalen-1-il)-metanol
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
Ia	Iminoalantoína
Ia ^{ox}	Iminoalantoína oxidada
imidazolona	2-Amino-5-[(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)-amino]-4 <i>H</i> -imidazol-4-ona
ISC	Cruzamento intersistema
JNK	c-Jun- <i>N</i> -terminal quinase
L•	Radical lipídico centrado no carbono
LH	Ácido graxo insaturado
LOO•	Radical peroxila lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitogênio
MeOH	Metanol
MNEA	<i>N,N,N</i> -trimetil- <i>N</i> -2-(4-metilnaftil)etil amônio
MNP	3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio
MNP (IUPAC)	3-(4-metil-naftalen-1-il)propanoato de sódio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas com detecção em <i>tandem</i>
MS1	Primeiro analisador do espectrômetro de massas
MS2	Segundo analisador do espectrômetro de massas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2 <i>H</i> -tetrazolium
N ² -ibu-8-MeOdGuo	N ² -isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NDP	3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

NDP (IUPAC)	3-[4-(2-carboxi-etil)naftalen-1-il]-propanoato de sódio
NDPE	3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila
NDPO ₂	Endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio
NMR	Ressonância magnética nuclear
oxazolona	2,2-Diamino-4-[-(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil) amina]-5-(2H)-oxazolona
PBS-A	Tampão fosfato salina - 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 47 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0.
PDA	Detector de fotodiodos em série
pH	Potencial hidrogeniônico
RNAse	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sens	Sensibilizador
SFB	Soro fetal bovino
Sp	Espiroiminodihidantoína
T_8-MeO_T	Oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo
T_Iz_T	Oligonucleotídeo contendo a imidazolona
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
u.m.a.	Unidade de massa atômica
UV	Ultravioleta

Resumo

Resumo

O oxigênio molecular eletronicamente excitado ao estado singlete $^1\Delta_g$ (1O_2) é bastante reativo frente a moléculas orgânicas com alta densidade eletrônica. As reações do 1O_2 com o ácido desoxirribonucleico (DNA) têm sido estudadas extensivamente, uma vez que, provocam lesões que têm sido relacionadas com diversos processos citotóxicos e patológicos.

Esse trabalho visou estudar os mecanismos pelos quais ocorrem os processos de oxidação de bases do DNA por 1O_2 . Para isso, um parâmetro essencial foi a identificação dos produtos de oxidação gerados na reação dessa biomolécula com 1O_2 .

Foi desenvolvida uma fonte de 1O_2 , com caráter não-iônico, preparada com oxigênio-18 molecular e a *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPN $^{18}O_2$). A fonte é capaz de gerar 1O_2 isotopicamente marcado ($^{18}[^1O_2]$).

A incubação de DNA de timo de bezerro e células de fibroblastos com os endoperóxidos hidrofílicos do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDPO $_2$) e da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO $_2$), como fontes puras de 1O_2 , mostrou que a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) é a lesão majoritária. Quando o DHPNO $_2$ foi usado, níveis mais altos de 8-oxodGuo foram detectados devido ao seu maior rendimento de formação de 1O_2 e por ser capaz de penetrar em células. O uso do DHPN $^{18}O_2$ na incubação de células demonstrou que o 1O_2 lesa diretamente o DNA nuclear e forma 8-oxodGuo com oxigênio-18 incorporado.

A identificação dos principais produtos de oxidação da 8-oxodGuo por 1O_2 ou $^{18}[^1O_2]$ foi feita usando análises de HPLC e espectrometria de massas em *tandem* com ionização por *electrospray*. Dessa forma, a imidazolona, oxazolona e os diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína marcados com oxigênio-18 foram detectados. Além disso, foi caracterizado um nucleosídeo modificado que exibe as características da guanidinohidantoína oxidada.

O uso do EAS para captação de 1O_2 em sistemas aquosos e detecção do produto EASO $_2$ por HPLC e espectrometria de massas possibilitou mostrar que a decomposição espontânea de ONOO $^-$ não gerava 1O_2 .

O trabalho desenvolvido contribuiu na elucidação de algumas propostas fundamentais para esclarecer os mecanismos que envolvem a geração do $^1\text{O}_2$ e sua interação com o DNA. A compreensão desses processos é importante para desvendar fenômenos biológicos importantes como envelhecimento e câncer.

Abstract

Abstract

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) exhibits a substantial reactivity towards electron-rich organic molecules. Since DNA damage has been related to aging, cancer and other cytotoxic effects, its reaction with $^1\text{O}_2$ have been extensively studied. Although, the mechanism and products of these reactions are not yet completely elucidated.

The aim of the present work was to study the mechanism of DNA oxidation by $^1\text{O}_2$. Emphasis was placed on the identification of the main products generated by the reaction of $^1\text{O}_2$ with DNA.

For this purpose, we developed a water-soluble naphthalene endoperoxide, the DHPN $^{18}\text{O}_2$, whose thermodecomposition leads to the formation of isotopically labeled singlet oxygen ($^{18}[^1\text{O}_2]$).

Calf thymus DNA and fibroblast cells were incubated with the hydrophilic endoperoxides NDPO $_2$ and DHPNO $_2$, as chemical generators of pure $^1\text{O}_2$. It was found that 8-oxodGuo is the major $^1\text{O}_2$ -mediated DNA damage product. In order to demonstrate that $^1\text{O}_2$ is directly involved in the formation of 8-oxodGuo, the DHPN $^{18}\text{O}_2$ was used. Incubation of the cells with such a generator of $^{18}[^1\text{O}_2]$ resulted in the formation of ^{18}O -labeled 8-oxodGuo in the nuclear DNA, clearly demonstrating that $^1\text{O}_2$, when released within cells, is able to directly oxidize cellular DNA.

The qualitative identification of the $^1\text{O}_2$ -oxidation products of 8-oxodGuo was achieved using HPLC coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Thus, the [^{18}O]-labeled and unlabeled imidazolone, oxazolone, together with the diastereoisomeric spiroiminodihydantoin nucleosides, were detected as the main degradation products. In addition, a modified nucleoside that exhibits similar features than those of the oxidized guanidinohydantoin molecule was also produced.

In this way, we contributed in the elucidation of some proposals of great importance to clarify the mechanisms that are involved in the interaction of $^1\text{O}_2$ with DNA.

Introdução

1 Introdução

1.1 Espécies reativas de oxigênio e implicações biológicas

O bom funcionamento celular depende de uma série de fatores e de condições que possibilitem que os processos ocorram de forma ordenada e integrada. As biomoléculas desempenham um importante papel na estruturação, metabolismo e divisão celular, logo, a integridade e quantidade apropriada dessas moléculas devem ser mantidas.

Em função de sua estrutura química, uma biomolécula pode ser mais ou menos susceptível a modificações por certos agentes, de origem endógena ou exógena, presentes no meio celular.

Os organismos aeróbicos apresentam uma enorme vantagem metabólica, pois, a oxidação completa da glicose a dióxido de carbono e água gera em torno de 36 moléculas de ATP. O maior parte do oxigênio (85-90%) consumido pelas células de mamífero é reduzido a duas moléculas de água pela citocromo oxidase na mitocôndria. Existem ainda, várias enzimas como oxidases e oxigenases que são responsáveis pelo consumo de cerca de 10-15% do oxigênio captado (Halliwell e Gutteridge, 1999). Entretanto, uma pequena parte do oxigênio pode gerar espécies reativas (ROS). Essas espécies não são necessariamente radicais e podem ser formadas através de reações de transferência de energia ou de elétrons para o oxigênio molecular no estado fundamental.

A geração de ROS por transferência de elétrons pode levar à formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela adição de um elétron e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela adição de mais um elétron ao $O_2^{\bullet-}$. Essas espécies são moderadamente reativas, porém, a interação com outros componentes presentes no meio celular, como íons Fe^{2+} , pode levar à formação de produtos muito mais reativos como o radical hidroxila ($\bullet OH$). É estimado que cerca de 1-2% do oxigênio consumido pela cadeia respiratória da mitocôndria sofre redução por um elétron pela NADH desidrogenase ou pela coenzima Q gerando $O_2^{\bullet-}$ (Kowaltowski e Vercesi, 1999).

O óxido nítrico (NO^{\bullet}) é um radical livre produzido fisiologicamente por uma classe de enzimas denominada óxido nítrico sintases. Apesar do caráter radicalar, o NO^{\bullet} é pouco reativo. Porém, a interação do NO^{\bullet} com o $O_2^{\bullet-}$ gera um

potente oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-), que pode reagir por *via* iônica envolvendo a transferência de dois elétrons ou formar radicais livres a partir da homólise da ligação peroxo. Foi proposto, por muito tempo, que o ONOO^- protonado (ONOOH , $\text{pK}_a = 6.6$) era capaz de formar um isômero *trans* com potencial de oxidação e reatividade similares ao $^*\text{OH}$. Alguns trabalhos, no entanto, têm mostrado que, quando protonado e em ausência de substratos, o ONOOH se decompõe e gera o $^*\text{OH}$ e o radical dióxido de nitrogênio (Coddington *et al.*, 1999).

A geração de ROS por transferência de energia leva à formação do oxigênio eletronicamente excitado ao estado singlete. Esta espécie é um potente oxidante frente a compostos contendo alta densidade eletrônica.

Além do metabolismo aeróbico, fontes ambientais como poluição, radiação e metabolismo de xenobióticos contribuem para formação de ROS e outras espécies, como os compostos carbonílicos eletronicamente excitados ao estado triplete, que também podem participar de processos que levam a danos biomoléculas (Cilento, 1982).

Estando a célula exposta a tantos agressores sua sobrevivência depende de uma linha de defesa antioxidante eficiente. Esse importante papel é desempenhado por enzimas como superóxido dismutases, glutathione peroxidase e catalase e por compostos biológicos como carotenóides, tióis e vitaminas E e C. Existem ainda sistemas enzimáticos de reparo para corrigir lesões provocadas por espécies que superaram essa primeira barreira de defesa antioxidante (Halliwell e Gutteridge, 1990; Di Mascio *et al.*, 1991).

Quando ocorre um desequilíbrio e a geração dessas espécies reativas se sobrepõe às defesas antioxidantes, ocorre um fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Sies, 1986).

Estas espécies são capazes de lesar biomoléculas disparando processos de peroxidação lipídica, despolimerização de açúcares, inativação de proteínas, oxidação de bases e quebras de fitas do DNA. Esses processos levam ao envelhecimento, aparecimento de tumores e câncer, doenças inflamatórias e outras numerosas enfermidades.

Por outro lado, existem processos celulares nos quais a geração dessas espécies em quantidades controladas pode ser utilizada em situações fisiológicas,

como o NO^* na neurotransmissão, resposta imunológica e controle de pressão sanguínea, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ no processo de fagocitose e o H_2O_2 na biossíntese de hormônios da tireóide em animais e na síntese de lignina em plantas. Outros processos, como de sinalização celular, relacionados com a ativação de proteínas quinases e/ou inativação de proteínas fosfatases poderiam, também, ser mediados por ROS. Nesse caso, espécies com reatividade mais seletiva seriam mais adequadas em relação àquelas que produziriam um dano indiscriminado (Halliwell e Gutteridge, 1999).

1.2 Oxigênio

O oxigênio tem sido reconhecido como uma substância química desde os trabalhos de Scheele e Priestley no século XVIII. Por volta de 1774, Scheele, um farmacêutico sueco, observou um gás que mantinha a respiração, porém, o manuscrito relatando sua descoberta foi publicado posteriormente em 1777. Isso permitiu que Priestley, um homem do clero inglês, publicasse primeiro, em 1776, observações similares sobre o aquecimento do óxido de mercúrio. Independentemente da verdadeira cronologia da descoberta desse elemento, somente a partir de 1787 ele foi denominado oxigênio, que significa gerador de ácido, por Lavoisier, que acreditava que todos os ácidos continham oxigênio (Ho *et al.*, 1995).

Desde esses primeiros trabalhos, informações valiosas sobre o oxigênio foram sendo descobertas. Avogadro, em 1811, relatou que o oxigênio é uma molécula diatômica. Faraday publicou em 1848 que o oxigênio apresentava propriedades paramagnéticas que eram diferentes de outros gases como nitrogênio e hélio. Mulliken, em 1928, mostrou que as propriedades paramagnéticas do oxigênio eram devidas a sua configuração eletrônica. Herzberg, analisando o espectro solar em 1934, descobriu o oxigênio em um estado de energia maior e o relatou como oxigênio singlete (Min e Boff, 2002).

A forma mais abundante de oxigênio elementar é sua molécula diatômica e gasosa que representa cerca de 21 % por volume de ar seco. Os átomos de oxigênio na atmosfera são compostos de três isótopos: ^{16}O , ^{17}O e ^{18}O que representam respectivamente 99,759 %; 0,037 % e 0,204 % da abundância isotópica natural relativa (Staschewski, 1974). Os isótopos ^{17}O e ^{18}O e compostos

que os contêm são valiosos na elucidação de mecanismos de reações envolvendo oxigênio. Entretanto, por causa de suas abundâncias naturais relativas serem baixas, experimentos com essas espécies têm custo elevado (Ho *et al.*, 1995).

1.2.1 Oxigênio singlete

O oxigênio molecular, no estado fundamental, apresenta seu nível eletrônico de mais alta energia constituído por dois orbitais degenerados π^* (orbitais diferentes com a mesma energia) ocupados por dois elétrons, sendo que cada elétron fica em um orbital π^* com spins paralelos, constituindo um estado triplete ($^3\Sigma_g^-$) (Figura 1.1). Esta característica conferiria ao oxigênio uma alta reatividade, entretanto, sua redução direta por dois elétrons com spins antiparalelos é proibida pela regra de conservação de spin, tornando-o relativamente inerte.

O oxigênio eletronicamente excitado pode apresentar-se em dois estados distintos, o $^1\Delta_g$ e o $^1\Sigma_g^+$, tendo o primeiro energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (cerca de 2 a 4 μ s em H_2O) e o segundo tendo energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado $^1\Delta_g$ (Figura 1.1). Considerando estas características, a única forma de oxigênio singlete que apresenta interesse em sistemas biológicos é a forma $^1\Delta_g$, que será denotado por 1O_2 .




Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)
$^1\Sigma_g^+$		37,5
$^1\Delta_g$		22,5
$^3\Sigma_g^-$		

Figura 1.1 Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$).

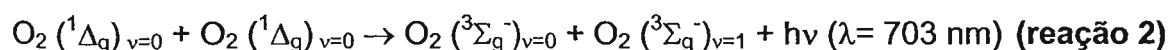
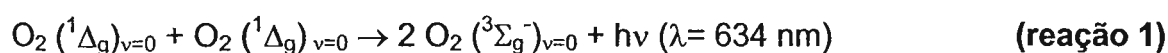
1.2.1.1 Luminescência do oxigênio singlete

Sendo o 1O_2 uma molécula no estado eletrônico excitado, o decaimento para o estado fundamental pode ser acompanhado de emissão de luz. Essa luminescência é extremamente fraca e o rendimento quântico de luminescência, ou seja, a fração de moléculas de 1O_2 que emitem luz ao invés de decair não-radiativamente por desativação pelo solvente, varia em torno de 10^{-6} a 10^{-3} (Foote e Clennan, 1995).

A descoberta da geração do 1O_2 em um sistema químico, por diversos grupos independentemente, começou com a observação da luminescência na região do vermelho do espectro visível que acompanhava a decomposição de H_2O_2 na presença de hipoclorito (OCl^-). Em 1960, Selinger publicou um espectro com uma banda estreita em 634 nm. Em 1962, foi sugerido, por Stauff e Schmidkunz, que essa emissão poderia ser interpretada como sendo a transição simultânea de duas moléculas de oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Delta_g$) para o estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$) (Khan, 1976).

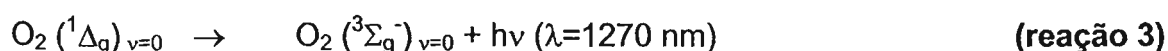
A investigação espectroscópica foi estendida por Khan e Kasha (1963 e 1964), que observaram a presença de duas bandas de emissão centradas em

634 (reação 1) e 703 nm (reação 2) para as quais consideraram duas possíveis interpretações: (i) a sugestão de Stauff e Schmidkunz para transição simultânea de duas moléculas de oxigênio no estado $^1\Delta_g$ e (ii) o deslocamento da emissão $^1\Sigma_g^+ \rightarrow ^3\Sigma_g^-$ pelo efeito do solvente. Entretanto, a mesma banda de emissão foi observada quando oxigênio era produzido por descarga de microondas em fase gasosa, excluindo, então, o efeito do solvente e confirmando a sugestão da transição $O_2(^1\Delta_g) + O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-) + O_2(^3\Sigma_g^-)$ (Arnold *et al.*, 1964). Essa luminescência é também conhecida como emissão bimolecular.



A reação do H_2O_2 e OCl^- foi estudada em detalhes e foi mostrado que os átomos do O_2 são fornecidos pelo H_2O_2 (Cahill e Taube, 1952). A constante de velocidade observada é altamente dependente do pH e apresenta uma variação bem definida indicativa da perda de próton no complexo ativado. Estes experimentos cinéticos e considerações teóricas permitiram que fosse proposto o ataque nucleofílico do HO_2^- sobre o átomo de cloro do ácido hipocloroso ($HOCl$) no primeiro passo. Essas espécies sofrem quebras heterolíticas formando $ClOO^-$ que se decompõe em Cl^- e 1O_2 (Aubry, 1991).

A principal transição monomolecular do 1O_2 (reação 3) ocorre na região do infravermelho e foi mostrada por Browne e Ogryzlo (1964) também usando o sistema H_2O_2/OCl^- .



Foi estudado o efeito dos isótopos ^{16}O e ^{18}O nessa transição e foi observado que ela ocorre no mesmo comprimento de onda para ambos os isótopos. Porém, para a transição $O_2(^1\Delta_g)_{v=0} \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)_{v=1}$ observa-se efeito isotópico. Em CCl_4 , por exemplo, essa transição ocorre em $\lambda = 1587$ nm para o 1O_2 com isótopos 16 e em $\lambda = 1566$ nm para o 1O_2 com isótopos 18 (Schmidt e Afshari, 1992).

1.2.1.2 Tempo de vida

Em 1953, Bowen descobriu que a adição de pequenas quantidades de hidrocarboneto reduzia a velocidade de captura do oxigênio na foto-oxidação do antraceno em dissulfeto de carbono. A explicação para esse fenômeno foi mostrada por Foote *et al.* (1972), que observou a dependência da velocidade de foto-oxidação do antraceno com o solvente e mostrou que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ era maior em dissulfeto de carbono do que em benzeno ou metanol (Moroe, 1985).

O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ (τ) é muito menor em solução (ordem de μs) que em fase gasosa (45 min a pressão zero) devido a sua desativação por colisão com as moléculas do solvente, transformando a energia de excitação eletrônica do $^1\text{O}_2$ em energia vibracional do O_2 e do solvente (Schmidt e Afshari, 1992). Em particular, solventes que têm ligações C-H e O-H favorecem esse processo. Quando os átomos de hidrogênio são substituídos por átomos de deutério, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é marcadamente aumentado (Moroe, 1985). Esse efeito foi observado pela primeira vez por Kearns que observou um aumento no tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em água deuterada (Kajiwara e Kearns, 1973).

O tempo de vida foi avaliado para os isótopos ^{16}O e ^{18}O . Foi observado que em água, água deuterada, etanol e acetona deuterada não há efeito isotópico, ou seja, o tempo de vida é o mesmo para ambos os isótopos do oxigênio, porém, para solventes como acetonitrila, clorofórmio e tetracloreto de carbono existe um pequeno efeito isotópico ($^{18}\tau_{\Delta}/^{16}\tau_{\Delta}$) da ordem de 1,2 a 1,4 (Schmidt e Afshari, 1992).

Em função de seu alto tempo de vida, comparado a outras espécies reativas de oxigênio, o $^1\text{O}_2$ pode difundir por distâncias apreciáveis. Em monocamadas de estereato foi estimada uma distância de meia-desativação de 11,5 nm (Schnuriger e Bourdon, 1968). Em soluções micelares, o comprimento médio de difusão do $^1\text{O}_2$ é consideravelmente maior que a distância média entre as micelas e, na ausência de moléculas que o desativem, o $^1\text{O}_2$ pode atingir diversas micelas em seu tempo de vida, sendo estimado um tempo de residência de 2 e 6 ns dentro de micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), respectivamente (Lissi *et al.*, 1993).

Foi avaliada qual seria a distância que o $^1\text{O}_2$ poderia difundir em células antes de reagir ou ser desativado. Para isso, células humanas foram incubadas com dois tipos de fotossensibilizadores (seção 1.2.1.5.1) com propriedades espectroscópicas diferentes e capazes de gerar $^1\text{O}_2$. Foi feita a excitação de um dos fotossensibilizadores com um comprimento de onda que o outro não absorvia e observaram o efeito sobre o outro, chegando a conclusão que a distância de difusão ficava em torno de 10 a 20 nm (Moan, 1990 e Moan e Berg, 1991).

A concentração estacionária para o $^1\text{O}_2$ pode ser determinada levando em consideração sua velocidade de formação e difusão, partição entre diferentes microambientes e seu tempo de vida (Lissi *et al.*, 1993). Com base em medidas da luminescência na região espectral do vermelho, referente à emissão bimolecular do $^1\text{O}_2$, foi sugerido um valor de $\sim 10^{-18}$ M em sistemas biológicos (Boveris e Cadenas, 1997).

1.2.1.3 Desativação do oxigênio singlete

O oxigênio singlete pode ser desativado de duas maneiras: por *via* física e/ou química. Por alterar a importância relativa de cada um dos processos, o efeito do solvente deve ser considerado quando ambas contribuem para desativação do $^1\text{O}_2$ (Lissi *et al.*, 1993).

A *via* física envolve a interação do oxigênio com um supressor que acelera sua conversão para o estado fundamental sem consumir o oxigênio ou formar produto. Existem dois mecanismos principais: transferência de energia e transferência de carga. Em ambos os casos, a constante de velocidade bimolecular de desativação do $^1\text{O}_2$ é denominada k_q (reação 4). Em particular, a constante de desativação do $^1\text{O}_2$ pelo solvente é denominada k_d (reação 5) e é igual ao inverso do tempo de vida ($1/\tau$).



O mecanismo por transferência de energia pode ser exemplificado pela ação de carotenos. O β -caroteno, em solventes apolares, interage com o $^1\text{O}_2$ e é promovido ao estado triplete excitado. A eficiência desse processo de

transferência se deve principalmente ao fato da energia de excitação do β -caroteno ficar abaixo da energia do $^1\text{O}_2$. O k_q dessa reação excede $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Isso significa que o processo ocorre em toda colisão (controlada por difusão). Outros carotenos também se mostraram eficientes no processo de desativação do $^1\text{O}_2$, o que pode ser considerado como um papel biológico importante na proteção contra efeitos oxidativos em sistemas fotossintéticos (Foote e Clennan, 1995).

Complexos diamagnéticos de níquel (II) são eficientes supressores de $^1\text{O}_2$ pelo mecanismo de transferência de energia. Esses compostos são usados comercialmente como estabilizadores em polímeros contra destruição de corantes por processos oxidativos e se tornaram importantes no campo de estocagem ótica de dados. Complexos de ditioleno de níquel têm sido aplicados em discos compactos de gravação como inibidores da destruição, pelo laser ou pela luz solar, dos corantes de cianina presentes na camada de gravação (Beutner *et al.*, 2000).

Compostos ricos em elétrons representam a segunda classe de supressores. Foi sugerida que a conversão do $^1\text{O}_2$ para o estado fundamental é acelerada pela transferência parcial de carga com esses compostos (Foote e Clennan, 1995).

Em geral, aminas são bons supressores físicos por transferência de carga, embora algumas possam sofrer reação com o $^1\text{O}_2$ (Moroe, 1985). A eficiência de desativação do $^1\text{O}_2$ pelas aminas aumenta conforme o potencial de ionização da amina diminui, seguindo, em geral, a ordem de eficiência: terciária, secundária, primária (Lissi *et al.*, 1993). Em particular, o 1,4-diazobicyclo[2,2,2]octano (DABCO) tem um baixo potencial de oxidação comparado com outras aminas e, portanto, desativa o $^1\text{O}_2$ eficientemente sem sofrer qualquer reação (Foote e Clennan, 1995). Além disso, solventes que possuem a característica de estabilizar uma carga ou um dipolo em função de seu efeito dielétrico e que não sejam doadores de próton, favorecem o processo (Encinas *et al.*, 1987).

A azida de sódio (NaN_3) também é um potente supressor físico por transferência de carga. O k_q da azida em água deuterada é $4,78 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e esse valor pode variar em função do solvente (Li *et al.*, 2001). Em solução aquosa, o pH e a concentração de sal influenciam o processo. O valor de k_q diminui em pH menor que 5,5 pela protonação da azida e formação do ácido hidrazóico, cuja

constante de desativação é pelo menos duas ordens de magnitude menor comparada à constante do íon azida. O aumento da força iônica da solução aumenta a velocidade de desativação. Esse efeito pode ser importante em soluções-tampão e reações que ocorrem nas proximidades de interfaces carregadas. Além disso, outros íons inorgânicos, como nitrito e iodeto, também podem agir como supressores físicos de $^1\text{O}_2$ por transferência de carga (Lissi *et al.*, 1993).

Na *via* química há consumo de oxigênio e formação de produto. Em geral, as reações químicas do $^1\text{O}_2$ com compostos insaturados levam à formação de hidroperóxidos alílicos, dioxetanos e endoperóxidos (Figura 1.2). Nessas reações o $^1\text{O}_2$ se comporta como um reagente eletrofílico e o padrão de reatividade é semelhante àquele exibido por etileno com substituintes eletronegativos (Foote e Clennan, 1995). A constante de velocidade de reação do $^1\text{O}_2$ com relação a um substrato qualquer (S) é denominada k_r (reação 6).



A formação de hidroperóxidos alílicos ocorre *via* reação do tipo “ene” e tem em geral uma baixa energia de ativação (<20 kJ/mol), é estereoespecífica e ocorre de forma suprafacial envolvendo a abstração do hidrogênio alílico perpendicular ao eteno na conformação molecular de mais baixa energia e ataque do oxigênio pela mesma face.

Etenos com baixos potenciais de ionização que não tem hidrogênios alílicos reagem com $^1\text{O}_2$ formando dioxetanos. Esse tipo de reação é estereoespecífica e geralmente ocorre *via* cicloadição (2+2).

Oxigênio singlete comporta-se como um poderoso dienófilo na cicloadição do tipo Diels-Alder (4+2) gerando endoperóxidos. A estabilidade desses compostos é bem variada, pois depende da estrutura do substrato (Gilbert e Baggott, 1991).

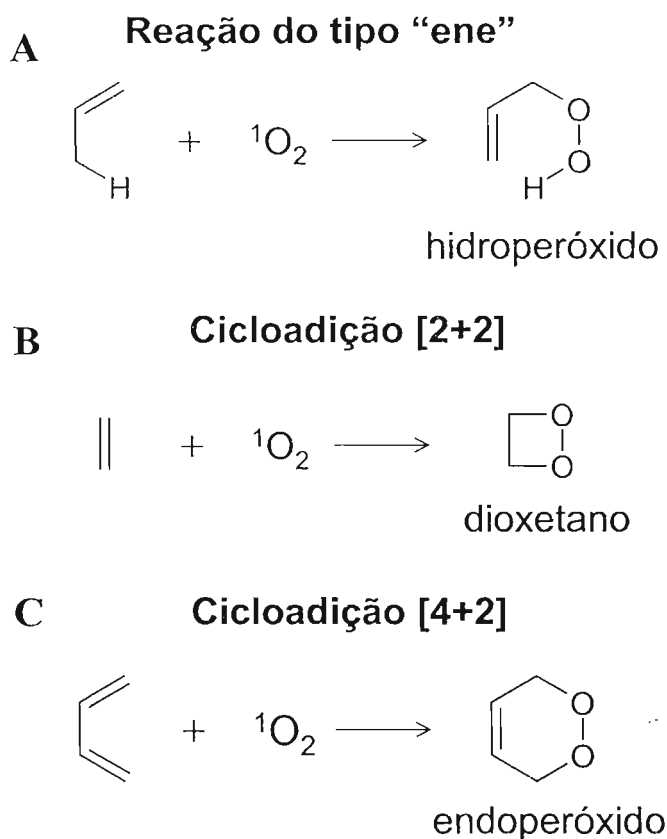


Figura 1.2 Tipos de reações do $^1\text{O}_2$ com compostos insaturados. **(A)** Reação do tipo “ene” formando hidroperóxido. **(B)** Cicloadição [2+2] formando dioxetano. **(C)** Cicloadição [4+2] formando endoperóxido.

Com relação aos possíveis alvos biológicos do $^1\text{O}_2$, importantes biomoléculas como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA são susceptíveis à oxidação devido à alta reatividade dessa espécie frente a moléculas orgânicas ricas em elétrons (Sies, 1993, Menck *et al.*, 1993 e Di Mascio *et al.*, 1995).

1.2.1.4 Detecção do oxigênio singlete

1.2.1.4.1 Captadores químicos

Considerando a reatividade do $^1\text{O}_2$ frente a diferentes compostos, uma das maneiras de detectá-lo é fazendo uso de captadores químicos, cujo produto de reação possa ser facilmente detectado em baixas concentrações. A eficiência de um captador químico depende principalmente da sua reatividade com $^1\text{O}_2$ e a sua

solubilidade no solvente de interesse. A reatividade de uma substância em relação ao $^1\text{O}_2$ também pode ser expressa por seu valor β , que é a concentração na qual 50% do $^1\text{O}_2$ disponível será capturado (McCall, 1984).

Por muito tempo, os captadores mais utilizados foram os derivados do furano (Kreitner *et al.*, 1996), estes compostos são oxidados a produtos dicarbonílicos presumidamente *via* reação Diels-Alder para formar ozonida como intermediário (Figura 1.3). Embora estes compostos sejam altamente reativos com $^1\text{O}_2$, eles apresentam a desvantagem de reagir com outros oxidantes gerando os mesmos produtos observados pela reação com $^1\text{O}_2$ (McCall, 1984).

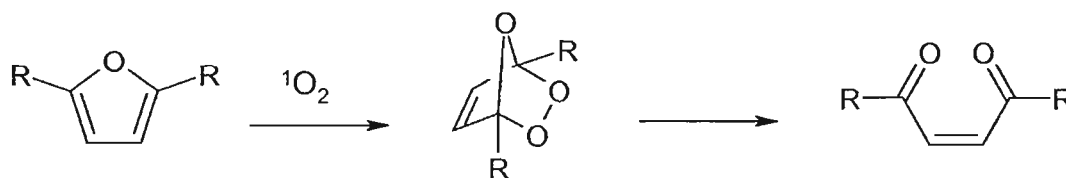


Figura 1.3 Reação de um derivado de furano com $^1\text{O}_2$. R é um substituinte qualquer.

Outra substância freqüentemente usada é o colesterol, pois, o produto da reação tipo “ene”, o 5- α -hidroperóxido do colesterol, é considerado uma “impressão digital” do $^1\text{O}_2$, porém, suas limitações são a baixa reatividade e uma certa instabilidade do produto que pode sofrer rearranjo para uma mistura de 7- α -hidroperóxidos sob certas condições (Foote e Clennan, 1995).

A ligação reversível de oxigênio a compostos aromáticos policíclicos começou a ser estudada em 1926 por Dufraisse (Moureu *et al.*, 1926a), pela observação que uma solução de benzeno contendo rubreno e exposta ao ar gerava um produto incolor e quando essa mesma solução era aquecida a 150°C, regenerava o composto de partida (Figura 1.4). Ele também demonstrou que uma luminescência acompanhava essa dissociação (Moureu *et al.*, 1926b).

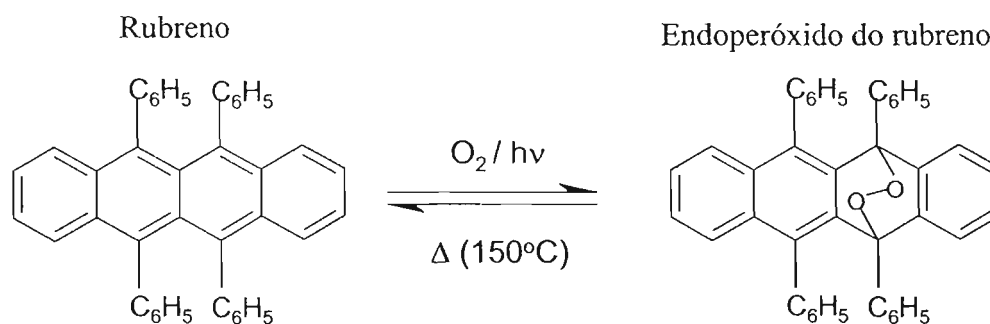


Figura 1.4 Esquema de captura e liberação de $^1\text{O}_2$ pelo rubreno.

Nas duas décadas seguintes, muitos endoperóxidos foram preparados e estudados para melhor entender suas propriedades. Em 1942, Dufraisse mostrou que o endoperóxido do 1,4-dimetoxi-9,10-difenilantraceno era capaz de liberar oxigênio a temperatura ambiente e que o oxigênio liberado estava num estado ativado (Dufraisse e Velluz, 1942). Entretanto, a natureza precisa das espécies envolvidas nesse processo, isto é, do $^1\text{O}_2$, foi estabelecida usando o endoperóxido do 9,10-difenilantraceno (Wasserman e Scheffer, 1967). Foi observado que sua decomposição na presença de 2,5-difenil-4-metiloxazol ou 1,3-difenilisobenzofurano formava os mesmos produtos que eram obtidos quando estes compostos eram submetidos à fotossensibilização (seção 1.2.1.5.1).

Levando em consideração as propriedades desses hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, estes poderiam ser usados como captadores de $^1\text{O}_2$, uma vez que formam endoperóxidos à temperatura ambiente e sua decomposição ocorre somente em temperaturas razoavelmente elevadas (acima de 100°C). Uma das limitações dessas substâncias é a solubilidade em água, porém, este problema pode ser contornado com modificações na estrutura, adicionando-se grupos que os tornem mais hidrofílicos (Aubry *et al.*, 1981).

Sendo assim, são características desejáveis de um captador de $^1\text{O}_2$ (McCall, 1984): ser solúvel em água; a solubilidade em água deve ser maior que o valor β ; o produto formado da reação com $^1\text{O}_2$ deve ser único em relação a este oxidante; produtos de oxidação do captador com outros oxidantes podem ser tolerados, desde que não gerem o mesmo produto formado pelo $^1\text{O}_2$; o captador e seu produto de oxidação devem ser estáveis para permitir o isolamento para

caracterização; o produto de reação deve ser facilmente detectável em quantidades pequenas.

Derivados de antraceno com substituintes hidrossolúveis são modelos interessantes para uso como captador de $^1\text{O}_2$, pois, de acordo com o tipo e a posição dos substituintes no anel, a reatividade, estabilidade e solubilidade podem ser modificadas. O derivado de antraceno, o sulfato mono-{2-[10-(2-sulfoxi-etil)-antracên-9-il]-etil}éster de sódio (EAS), possui as características mencionadas anteriormente: reage com $^1\text{O}_2$ para formar o endoperóxido correspondente (EASO₂) (Figura 1.5), sua solubilidade independe do pH e é maior que o valor β para todos os valores de pH, possui alta estabilidade (até 120°C) e pode ser facilmente detectado por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (McCall, 1984 e Di Mascio e Sies, 1989).

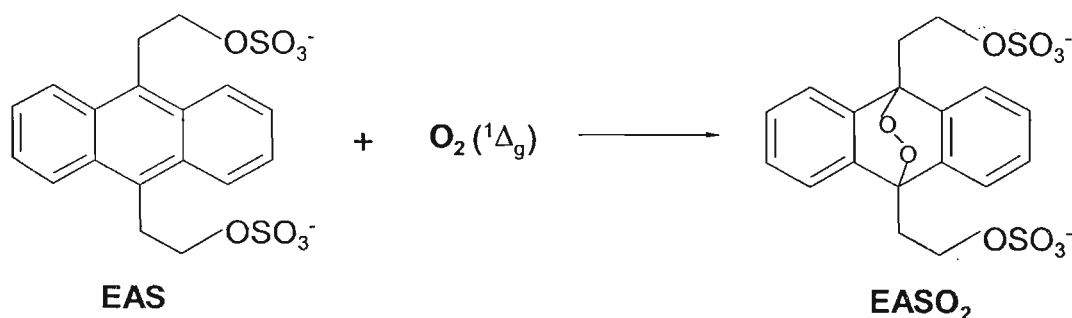


Figura 1.5 Reação de um derivado de antraceno EAS com $^1\text{O}_2$ gerando o respectivo endoperóxido EASO₂.

1.2.1.4.2 Detecção da luminescência

A emissão bimolecular pode ser monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível na região do vermelho, termoeletricamente resfriada e conectada a um sistema discriminador e amplificador (Boveris *et al.*, 1981). A intensidade da emissão é proporcional ao quadrado da concentração de $^1\text{O}_2$ e isso foi verificado para sistemas simples (Kanofsky, 1989).

A luminescência da emissão monomolecular pode ser detectada por um espectrômetro tendo como fotodetector um fotodiodo de germânio. A intensidade da emissão é diretamente proporcional a concentração do $^1\text{O}_2$ (Khan, 1981).

1.2.1.4.3 Técnica resolvida no tempo na região do infravermelho próximo

Nessa técnica, o decaimento da luminescência da transição monomolecular do $^1\text{O}_2$ é monitorado por um sistema que detecta diretamente sua presença permitindo o acompanhamento da emissão em função do tempo (Di Mascio *et al.*, 1995). Para essa finalidade, os fotodiodos de germânio de resposta rápida, acoplados a amplificadores apropriados, são os mais utilizados. Existem ainda detectores alternativos, como os fotodiodos de InGaAs e, mais recentemente, uma fotomultiplicadora sensível a essa região do espectro fabricada pela Hamamatsu Photonics KK (Shizuoka, Japão). Esse equipamento irá, provavelmente, substituir os fotodiodos devido a seu ganho maior e resposta mais rápida (Nonell e Braslavsky, 2000).

Esse tipo de metodologia pode ser usado para: (i) identificação de $^1\text{O}_2$, (ii) medidas de rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ em processos de fotossensibilização e (iii) tempo de vida do $^1\text{O}_2$ e determinação das constantes de velocidade da interação do $^1\text{O}_2$ com substrato (S) (Nonell e Braslavsky, 2000).

Com relação ao item (iii), o método é baseado na relação de Stern-Volmer, a qual descreve o aumento da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) pela adição de um supressor em um sistema homogêneo (reação 7).

$$k_{\text{obs}} = k_d + k_t [\text{S}], \text{ onde } k_t = k_q + k_r \quad (\text{reação 7})$$

A separação entre k_r e k_q é mais problemática, contudo, pode ser feita pela competição entre o substrato de interesse e um substrato que somente reage com $^1\text{O}_2$ e tem um valor de k_r conhecido (Foote *et al.*, 1968).

1.2.1.4.4 Utilização de solventes deuterados e supressores físicos

Em função do alto tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em solventes deuterados, essa propriedade tem sido usada para indicar ou confirmar a participação dessa espécie em diversos sistemas. Contudo, nesses casos, outros testes devem ser usados para eliminar a participação de outras espécies reativas que também apresentam um tempo de vida aumentado nesse tipo de solvente (Di Mascio *et al.*, 1995).

Do mesmo modo, a azida de sódio, por ser um potente supressor físico, vem sendo utilizada para mostrar o envolvimento do $^1\text{O}_2$ em diversos processos, inclusive biológicos. Entretanto, também nesse caso, deve ser considerado o efeito da azida na inibição de algumas enzimas. Apesar disso, foi mostrado que fibroblastos podem tolerar até 100 mM de azida por 2 h (Briviba e Sies, 2000).

1.2.1.5 Geração de oxigênio singlete

1.2.1.5.1 Fotossensibilização

A possibilidade do envolvimento do $^1\text{O}_2$ como intermediário reativo em reações de fotossensibilização foi sugerida primeiramente por Kautsky (1939). Ele demonstrou que a excitação de um sensibilizador adsorvido em sílica-gel provocava a oxidação de um substrato adsorvido em uma outra porção de partículas de sílica-gel fisicamente separada daquela contendo o sensibilizador. Sugeriu ainda que a extinção da fluorescência do sensibilizador era resultado da transferência de energia para as moléculas de oxigênio e produção de oxigênio ativado. O autor chegou a esta conclusão considerando que a maioria dos sensibilizadores apresenta uma pequena energia de fluorescência, portanto, somente estados metaestáveis de vida longa do oxigênio, como $^1\Sigma_g$ e $^1\Delta_g$, poderiam ser formados.

Entretanto, essa proposta foi rejeitada por muitos cientistas notáveis de sua época (Kearns, 1971) e somente em 1964, o envolvimento do $^1\text{O}_2$ em processos de foto-oxidação foi redescoberto. Experimentos conduzidos por Foote e Wexler (1964a e 1964b) mostraram que os produtos gerados na presença de H_2O_2 e OCl^- eram os mesmos produtos obtidos quando era feita a fotossensibilização. Além deles, Corey e Taylor (1964) mostraram que espécies excitadas de oxigênio geradas por uma descarga de radio-freqüência ou fotossensibilização reagiam com antracenos substituídos e olefinas formando os mesmos produtos.

O processo de fotossensibilização ocorre quando o sensibilizador, luz de comprimento de onda apropriado e oxigênio estão presentes simultaneamente (Kochevar e Redmond, 2000). Primeiramente, ocorre a excitação eletrônica do sensibilizador ao estado excitado singlete ($^1\text{sens}^*$) pela energia luminosa e, na maioria dos casos, por um processo conhecido como cruzamento intersistemas, o

sensibilizador é levado ao estado excitado tripleto ($^3\text{sens}^*$), o qual tem uma duração maior que o $^1\text{sens}^*$. A velocidade de desativação do $^3\text{sens}^*$ é da ordem de $10\text{-}10^4\text{ s}^{-1}$ e do $^1\text{sens}^*$ é muito maior ($\sim 10^8\text{ s}^{-1}$). Dessa forma, os sensibilizadores mais eficientes são aqueles que possuem um $^3\text{sens}^*$ de longa duração e alto rendimento quântico.

Existem dois destinos possíveis para o $^3\text{sens}^*$. No mecanismo tipo I há transferência de elétron entre o $^3\text{sens}^*$ e componentes do sistema. Esse processo gera íons radicais que podem reagir com O_2 ($^3\Sigma_g$) resultando em produtos oxidados (Figura 1.6). No mecanismo tipo II ocorre transferência de energia do $^3\text{sens}^*$ para o O_2 ($^3\Sigma_g$), gerando $^1\text{O}_2$ (Figura 1.6). Esses mecanismos podem ocorrer simultaneamente e a razão entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, substrato e concentração de oxigênio (Foote, 1991).

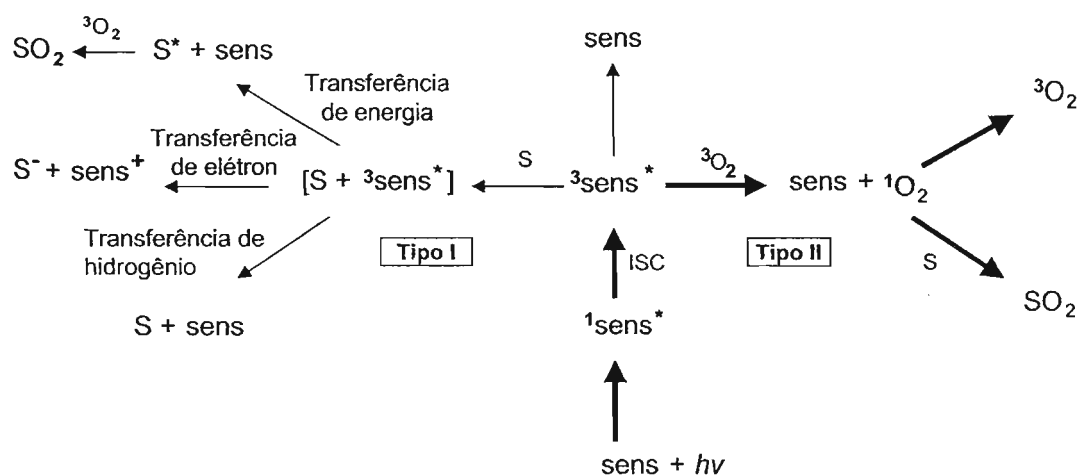


Figura 1.6 Esquema de fotossensibilização mostrando os mecanismos tipo I e II. (S = substrato, ISC = cruzamento intersistema, sens = sensibilizador).

Reações de fotossensibilização, geralmente envolvendo $^1\text{O}_2$, são importantes em diversas situações biológicas como em cloroplastos que contém clorofilas e alta concentração de oxigênio, ou em células da retina que possuem retinal e podem estar expostas a alta intensidade luz por um período prolongado. Nessas células, as clorofilas ou o retinal podem sofrer sensibilização e formar $^1\text{O}_2$. Esse processo pode provocar a destruição desses compostos e danos aos lipídeos ao redor. Existem ainda situações patológicas em que as reações de

fotossensibilização podem ocorrer, como em alguns tipos de porfirias, doenças causadas por defeitos na biossíntese do grupo heme que provoca o acúmulo de porfirinas na pele. Nesse caso, a exposição à luz pode causar danos devido à geração excessiva de $^1\text{O}_2$ (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Além disso, a oxidação de alimentos por $^1\text{O}_2$ tem sido mostrada em processos envolvendo a reversão do sabor do óleo de soja e perda de vitamina D, riboflavina e ácido ascórbico de leite estocado sob luz (Min e Boff, 2002).

Apesar dos efeitos deletérios, a fotossensibilização controlada pode ser usada de forma terapêutica como no tratamento da icterícia presente em bebês recém-nascidos. A cor amarela da pele se deve ao acúmulo do pigmento bilirrubina. Isso ocorre devido à quantidade insuficiente de uma enzima no fígado, a glucoronil transferase, responsável pela transformação da bilirrubina em um produto solúvel em água para excreção. A exposição do bebê à luz azul causa a destruição do pigmento pela fotossensibilização (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Outro exemplo é a terapia fotodinâmica usada para tratamento de tumores, a qual envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida pela ativação do agente pela luz de um comprimento de onda específico. Esta terapia resulta de uma seqüência de processos fotoquímicos envolvendo oxigênio molecular cujos produtos de oxidação podem ser prejudiciais às funções celulares e, desta forma, podem causar um dano irreversível ao tumor, levando à sua destruição (Dougherty *et al.*, 1998).

1.2.1.5.2 Peroxidação lipídica

Outra possível fonte de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos é a peroxidação lipídica (Figura 1.7). Esse processo se inicia pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo insaturado (LH) formando, dessa maneira, um radical lipídico centrado no carbono (L^*). Esse radical é estabilizado por um rearranjo molecular e adquire a estrutura de um dieno conjugado. Depois de iniciado, o processo se torna autocatalítico. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação de um radical peroxila (LOO^*). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando assim uma nova cadeia de

oxidação a partir da formação de outro L^\bullet . O radical LOO^\bullet se combina com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico (LOOH).

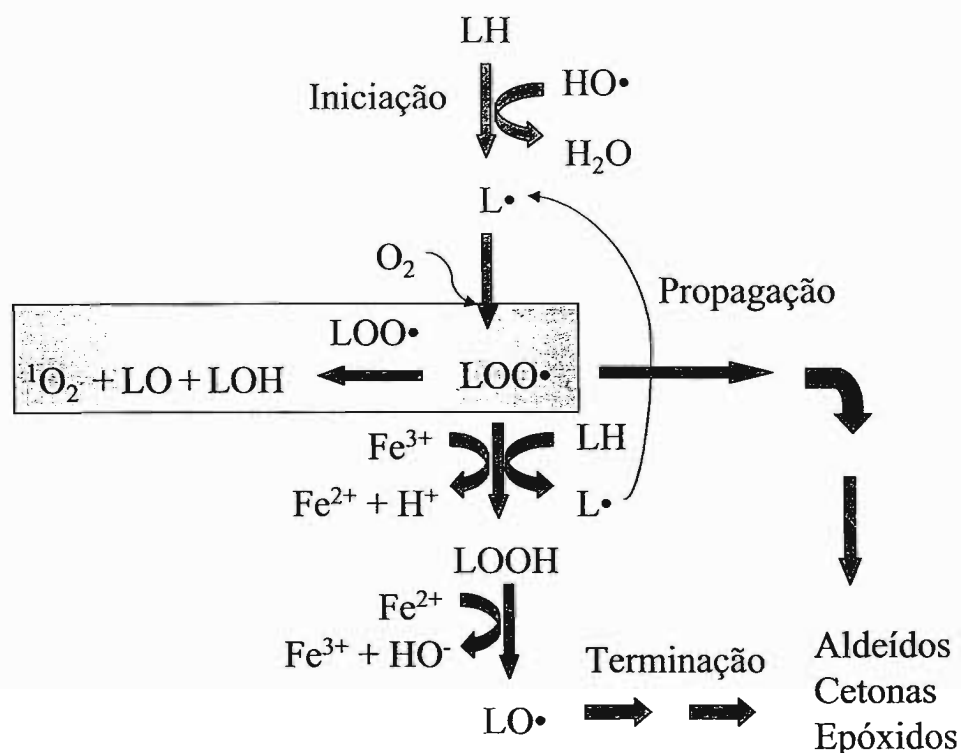


Figura 1.7 Representação geral das fases da peroxidação lipídica. Em destaque está representada a geração de 1O_2 pela interação de dois radicais peróxila.

Outras possibilidades incluem a formação de peróxidos cíclicos pelo ataque a uma dupla ligação na mesma cadeia e a combinação de dois radicais LOO^\bullet . Neste caso, foi relatado o valor de $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a constante de velocidade dessa reação em modelos de membranas (Barclay *et al.*, 1989). No mecanismo proposto por Russell (1957), a combinação de dois radicais LOO^\bullet levaria à formação de um tetra-óxido como intermediário e seriam obtidos álcool, cetona e oxigênio como produtos finais. Pela regra de conservação de spin, ou o oxigênio formado estaria no estado excitado singlete, ou a carbonila estaria no estado excitado tripleto. A formação de 1O_2 no sistema utilizado pelo estudo de Russell foi demonstrada usando o captador químico 9,10-difenilantraceno (DPA). Neste caso, foi detectado o respectivo endoperóxido ($DPAO_2$), produto de reação com

$^1\text{O}_2$ (Howard e Ingold, 1968). Essa espécie poderia ser formada diretamente no processo de decomposição do tetra-óxido ou por transferência de energia da carbonila triplete formada (Kellogg, 1969).

1.2.1.5.3 Reações enzimáticas

Foi sugerido que a geração de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos também poderia ocorrer em reações catalisadas por enzimas como as peroxidases e oxigenases. Em geral, esses estudos envolveram a utilização da detecção da luminescência do $^1\text{O}_2$, efeito de solvente deuterado e de conhecidos supressores de $^1\text{O}_2$ (Kanofsky, 1989).

1.2.1.5.4 Fagocitose

Foi mostrado que um dos papéis de geração de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos pode estar associado ao mecanismo de defesa contra vírus e bactérias por células responsáveis pela fagocitose (Steinbeck *et al.*, 1992). Nesse estudo, bolinhas de vidro cobertas com o DPA, como captador químico de $^1\text{O}_2$, foram utilizadas para determinar se $^1\text{O}_2$ era formado por neutrófilos durante o processo de fagocitose. Os resultados mostraram que a mieloperoxidase tem um papel fundamental, pois, a geração de HOCl num meio contendo H_2O_2 levou à formação de $^1\text{O}_2$.

Para distinguir entre a ação bactericida do ácido hipohaloso (HOCl ou HOBr) e do $^1\text{O}_2$ (gerado pela termodecomposição de endoperóxido ou pelo sistema mieloperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Br}^-$) foram avaliadas a viabilidade e a inativação das enzimas da cadeia respiratória de bactérias (*E. coli*) normais e transformadas, as quais eram capazes de produzir licopeno em grande quantidade. Levando em consideração o fato que o licopeno é um forte supressor de $^1\text{O}_2$, os autores utilizaram essa propriedade para tentar diferenciar a ação de cada um dos oxidantes. Os resultados obtidos não permitem uma conclusão definitiva, mas indicaram que $^1\text{O}_2$ gerado em fagossomo de neutrófilo seria o principal oxidante responsável pela ação bactericida (Tatsuzawa *et al.*, 1998).

1.2.1.5.5 Fontes químicas

Existem ainda outras formas químicas para gerar $^1\text{O}_2$. A oxidação do H_2O_2 pelo OCl^- foi descrita na seção 1.2.1.1. O desproporcionamento do H_2O_2 pelo íon molibdato (MoO_4^{2-}) só ocorre em solução alcalina e é catalítica com relação ao MoO_4^{2-} , sendo que a espécie mononuclear diperoxo (MoO_6^{2-}) é a responsável pela geração de $^1\text{O}_2$ e a regeneração do MoO_4^{2-} (Aubry *et al.*, 1989). A formação de $^1\text{O}_2$ nesse processo foi evidenciada pela captação química usando um derivado de rubreno solúvel em água e foi determinado um rendimento de 50% de $^1\text{O}_2$ para qualquer pH ou concentração de H_2O_2 (Aubry, 1985 e Aubry e Cazin, 1988).

A formação de $^1\text{O}_2$ na oxidação do H_2O_2 por ONOO^- foi proposta por Di Mascio *et al.* (1994 e 1996) com base nos resultados obtidos em estudos de luminescência da emissão bimolecular e monomolecular, efeito de água deuterada e azida na intensidade da luminescência e captação química usando o EAS como captador e detecção do respectivo endoperóxido EASO_2 por HPLC.

Esses processos descritos até agora envolvem compostos tóxicos, fortemente oxidantes, possibilidade de geração de outras espécies além do $^1\text{O}_2$ e condições não compatíveis com as necessárias para estudos em sistemas biológicos (meio aquoso, pH neutro, temperaturas moderadas). Sendo assim, a decomposição térmica de endoperóxidos tem se tornado uma ferramenta valiosa, pois é uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$, não gera subprodutos e não necessita de condições drásticas de trabalho (Pierlot *et al.*, 1996).

O endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno (DMNO_2) é capaz de gerar $^1\text{O}_2$ a 39°C com um rendimento de 76% (Aubry, 1991). Dessa forma, derivados hidrossolúveis do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) podem ser obtidos para agirem como geradores de $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos. Esses compostos naftalênicos são preparados pela reação com $^1\text{O}_2$ a baixa temperatura ($0-5^\circ\text{C}$) gerando o endoperóxido correspondente. Esse produto é estável por meses quando mantido a -80°C e libera uma quantidade definida de $^1\text{O}_2$ quando aquecido a 37°C (Figura 1.8).

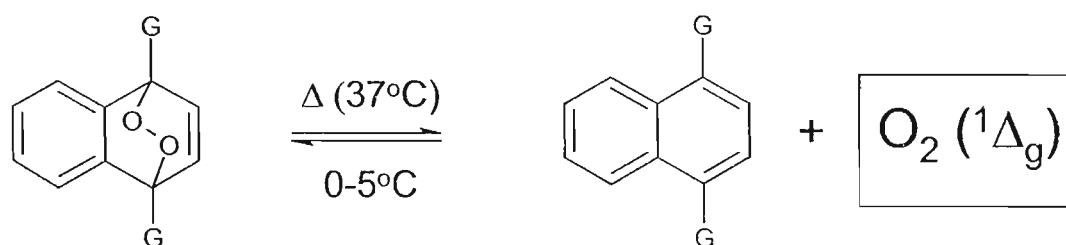


Figura 1.8 Termodecomposição de endoperóxido naftalênico e cicloadição de $^1\text{O}_2$ na posição 1,4 do anel naftalênico substituído com grupo hidrofílico (G).

Os primeiros geradores de $^1\text{O}_2$ que possuíam as propriedades descritas acima são conhecidos como 3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio (MNP) e 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDP) (Figura 1.9). Os endoperóxidos correspondentes têm sido usados como fonte de $^1\text{O}_2$ para estudar a reatividade dessa espécie em alvos químicos ou biológicos (Saito *et al.*, 1981, e Di Mascio e Sies, 1989).

Apesar destes compostos liberarem $^1\text{O}_2$ em fase aquosa, nem sempre esse processo ocorre nas proximidades do alvo desejado. Neste caso, outras características devem estar presentes nos substituintes do naftaleno para que estas moléculas apresentem uma afinidade particular por nucleotídeos, sítios carregados negativamente ou alvos intracelulares. Para este fim, uma segunda geração de geradores tem sido sintetizada (Pierlot *et al.*, 1996 e Dewilde *et al.*, 1998). Eles carregam substituintes como sais quaternários de amônio como no cloreto de *N,N,N*-trimetil-*N*-2-(4-metilnaftil)etil amônio (MNEA, Figura 1.9) ou grupos hidrofílicos não-iônicos como no 1,4-dihidroximetilnaftaleno (HMN) e na *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPN) (Figura 1.9).

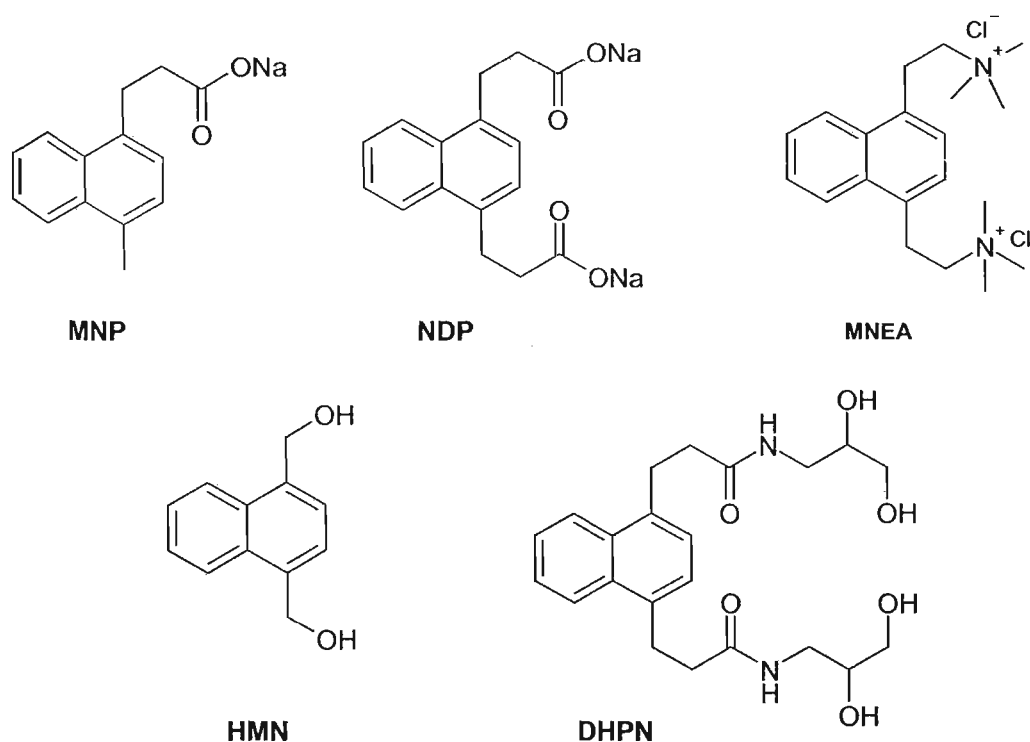


Figura 1.9 Derivados de naftaleno com substituintes hidrofílicos.

1.2.1.5.5.1 Derivados naftalênicos hidrossolúveis

Algumas características importantes devem ser levadas em consideração quando se deseja modificar os substituintes do naftaleno. Os substituintes do naftaleno devem ser insensíveis ao $^1\text{O}_2$ e ao fotossensibilizador ou às fontes químicas de $^1\text{O}_2$ necessárias para preparar o endoperóxido correspondente. Além disso, a função hidrofílica não deve desativar o $^1\text{O}_2$.

O naftaleno em si não reage com $^1\text{O}_2$ e a ligação direta de grupos atraentes de elétrons no anel aromático diminuiria sua reatividade. Sendo assim, pelo menos um ou, preferencialmente, dois grupos doadores de elétrons devem estar presentes nas posições 1,4 do anel para permitir a cicloadição [4+2] e estabilizar o endoperóxido. Dessa forma, os grupos metil do 1,4-dimetilnaftaleno oferecem uma posição adequada para entrada de substituintes, uma vez que a cadeia alquílica possibilita uma boa separação entre o grupo hidrofílico e o anel naftalênico (Pierlot *et al.*, 2000a).

A figura 1.10 mostra uma rota de síntese simples e versátil para esse tipo de derivado naftalênico (Lock e Walter, 1942; Marvel e Wilson, 1958 e Dewilde *et al.*, 1998).

Para síntese dos respectivos endoperóxidos, dois aspectos fundamentais devem ser considerados quanto aos derivados de naftaleno: a solubilidade em água, embora a solubilidade dos endoperóxidos correspondentes deve ser um pouco maior em função das propriedades hidrofílicas do endoperóxido e as constantes de velocidade de reação com o $^1\text{O}_2$, pois o tempo de reação pode ser longo e a reação pode requerer uma grande quantidade de $^1\text{O}_2$ em função da instabilidade térmica dos endoperóxidos.

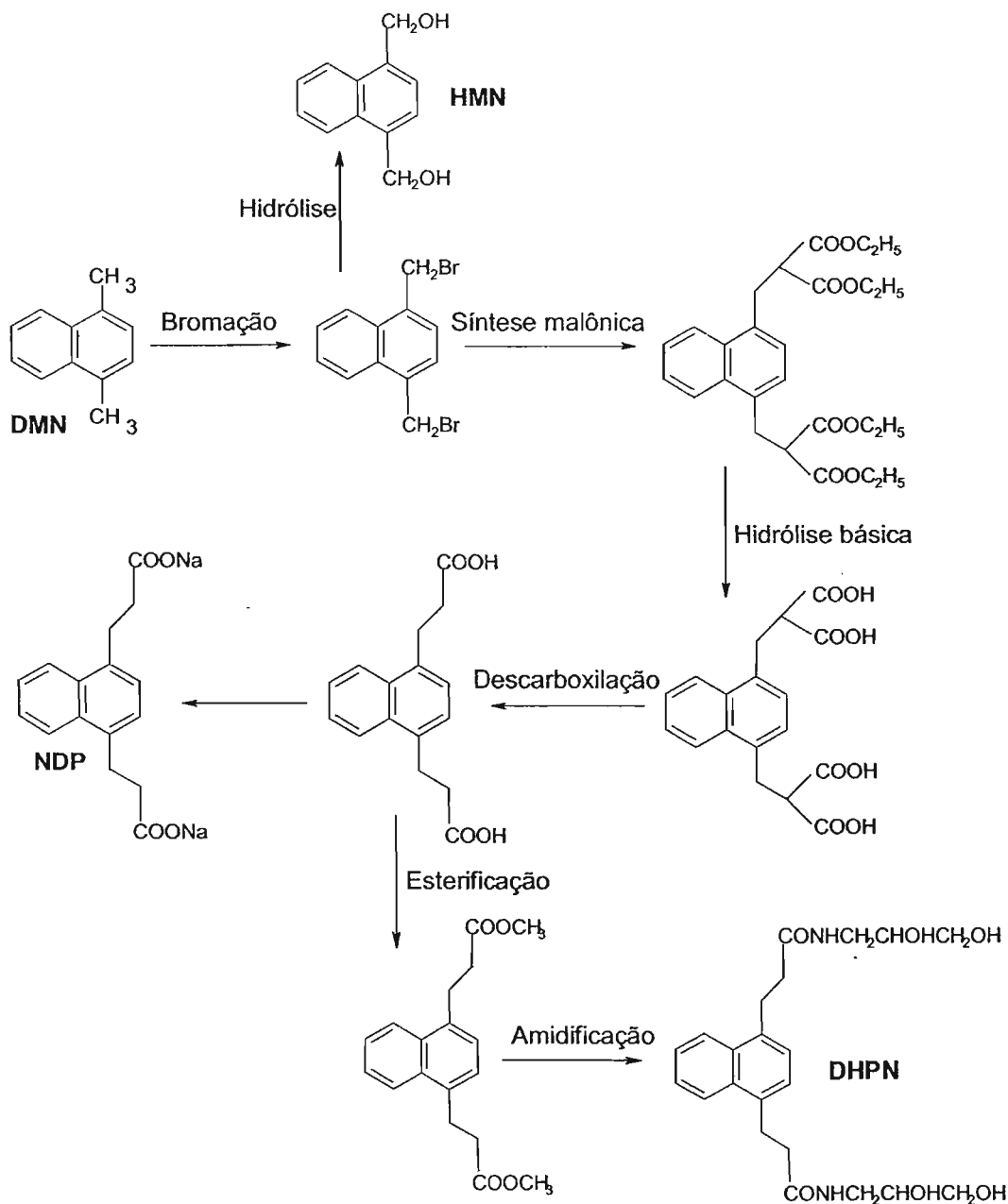


Figura 1.10 Estratégia de síntese para alguns derivados de naftaleno hidrossolúveis partindo do 1,4-dimetilnaftaleno.

A tabela 1.1 traz informações sobre solubilidade em água e constantes de velocidade de reação com $^1\text{O}_2$ de alguns derivados de naftaleno com substituintes hidrofílicos.

Tabela 1.1 Principais propriedades físico-químicas de alguns derivados de naftaleno (Aubry et al., 1995 e Pierlot et al., 1996).

	MNP	NDP	DHPN	MNEA	HMN
Solubilidade em água (M) ^a	10 ⁻²	> 1	3.9x10 ⁻²	> 1	0.95x10 ⁻²
10 ⁻⁵ k_t (M ⁻¹ s ⁻¹) ^b	70	28	10	14	4

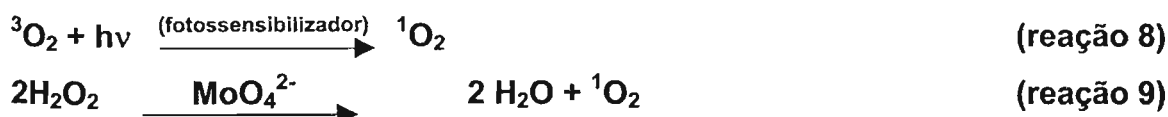
a) Concentração em mol/L a temperatura de 20°C

b) Constante de velocidade de reação (k_t) dos derivados de naftaleno com $^1\text{O}_2$ medidas por cinética rápida em água deuterada.

Para explicar as diferenças de reatividade entre esses compostos, dois fenômenos devem ser considerados, a densidade eletrônica no anel naftalênico e efeitos estéricos dos substituintes. Os efeitos eletrônicos devem ser considerados quando os grupos hidrofílicos estão muito próximos do anel naftalênico, pois dessa maneira, o efeito atraente de elétron causado pelos átomos eletronegativos como no MNEA e no HMN tornam essas moléculas 5 e 17 vezes, respectivamente, menos reativas frente ao $^1\text{O}_2$ que o MNP. Cadeias alquílicas mais longas como no NDP e na DHPN aumentam a densidade eletrônica no anel, porém, o efeito estérico diminui a reatividade quando comparados com o MNP.

Além de todos os parâmetros físico-químicos destacados anteriormente serem importantes para o planejamento de um gerador de $^1\text{O}_2$ para estudos em meio biológico, outro aspecto que deve ser considerado é sua capacidade de penetrar em células. Nesse sentido, um parâmetro que deve ser avaliado é o coeficiente de partição octanol / água. Esse parâmetro foi determinado para o NDP e para o DHPN em sistema 1-octanol / tampão fosfato pH 7,4 / NaCl, sendo encontrado os valores 0,007 e 0,33 para o NDP e DHPN, respectivamente; mostrando que os substituintes do DHPN, por serem não-iônicos conferem à molécula um caráter mais lipofílico quando comparado ao NDP (Klotz et al., 1999).

Uma vez obtidos os derivados naftalênicos, duas fontes primárias de $^1\text{O}_2$ podem ser usadas para preparar endoperóxidos em escala preparativa. O método fotoquímico convencional (reação 8) e o método que emprega o desproporcionamento do peróxido de hidrogênio catalisado pelo molibdato (reação 9):



Em ambos os casos o processo de oxidação ocorre mais rapidamente em solventes deuterados (ex.: água deuterada), uma vez que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é maior nesse tipo de solvente (seção 1.2.1.2). Além disso, a oxidação em outros solventes como metanol é desaconselhada, pois diminui a reatividade do derivado de naftaleno em cerca de duas ordens de grandeza (Cazin *et al.*, 1986). Esse fenômeno foi explicado pela possível formação de um exciplex com caráter de transferência de carga (Aubry *et al.*, 1995).

A escolha do método depende das propriedades físico-químicas do composto naftalênico. Para derivados de naftaleno com substituintes carboxilados, como MNP e NDP (Figura 1.9), o método químico é mais adequado, já que o endoperóxido formado pode ser recuperado por precipitação da forma ácida. Para outros derivados, a foto-oxidação deve ser usada na condição que o fotossensibilizador possa ser eliminado no final do processo. Os fotossensibilizadores mais usados são o azul de metileno e a rosa bengala.

A termólise do endoperóxido naftalênico segue cinética de primeira ordem com constante de velocidade k , a tabela 1.2 traz valores de $t_{50\%}$ (tempo necessário para decompor 50% dos endoperóxidos) e $t_{95\%}$ (tempo necessário para decompor 95% dos endoperóxidos). Os dados mostram que os endoperóxidos liberam seu oxigênio molecular dentro de 2 h a 37 °C; este valor é conveniente quando se trabalha com sistemas biológicos.

Uma parte do oxigênio formado durante a termólise está no estado excitado singlete (em geral, cerca de 50%) e pode ser medido pela detecção do endoperóxido do rubreno-2,3,8,9-tetracarboxilato de tetrapotássio (Aubry *et al.*, 1981 e Pierlot *et al.*, 1996).

Tabela 1.2 Dados de termólise de endoperóxidos de derivados de naftaleno em água a 37 °C.

	MNPO ₂	NDPO ₂	DHPNO ₂	MNEAO ₂	HMNO ₂
t _{50%} (min) ^a	23	23	23	22	70
t _{95%} (min) ^b	99	99	99	95	300
¹ O ₂ (%) ^c	45	50	59	65	51

a Tempo necessário para decompor 50% dos endoperóxidos $t_{50\%} = \ln 2/k_t$

b Tempo necessário para decompor 95% dos endoperóxidos $t_{95\%} = \ln 20/k_t$

c Rendimento acumulativo de ¹O₂ produzido na termólise.

Estudos sobre o mecanismo envolvido na termólise de derivados de naftalenos e antracenos foram feitos usando parâmetros de ativação e efeito de campo magnético. Os parâmetros de ativação foram obtidos pela associação das constantes de velocidade de termólise com a temperatura. Foi observado que um valor positivo da entropia de ativação estava associado com baixos rendimentos de ¹O₂ e que valores próximos de zero correlacionavam com rendimentos quase quantitativos. Esses resultados foram interpretados em termos da existência de dois mecanismos diferentes para a dissociação de endoperóxidos. O mecanismo radicalar associado a baixos rendimentos de ¹O₂ e o mecanismo concertado para geração quantitativa de ¹O₂. Essa interpretação foi fortalecida pela observação do efeito do campo magnético sobre o rendimento de ¹O₂ gerado pelos endoperóxidos cuja termólise supostamente deveria ocorrer *via* mecanismo radicalar (Turro *et al.*, 1981).

Para verificar a geração intracelular de ¹O₂ pelos endoperóxidos, células de fibroblastos de pele humana foram incubadas com 5 mM de NDPO₂ e DHPNO₂ por 30 min a 37°C. A quantidade do derivado de naftaleno associado às células foi determinada por HPLC com detecção UV. Observou-se o valor de 82 nmol de DHPN/10⁶ células e < 0,1 nmol de NDP/10⁶ células. Além disso, para células tratadas com DHPNO₂ foi observada a perda da fluorescência do DPA. Esse resultado não foi observado no tratamento com NDPO₂. Dessa forma, foi demonstrado que o DHPNO₂ é capaz de liberar ¹O₂ intracelularmente (Klotz *et al.*, 1999).

1.3 Conseqüências biológicas da ação do oxigênio singlete

1.3.1 Danos em DNA

Entre as biomoléculas susceptíveis a danos pela ação de ROS, o DNA é de particular importância devido ao seu papel fundamental no metabolismo celular e hereditariedade. Evidências têm sido acumuladas a respeito dos efeitos genotóxicos e carcinogênicos de ROS, entre as quais, o $^1\text{O}_2$ (Schulz *et al.*, 1994; Stary e Sarasin, 2000; Agnez-Lima *et al.*, 2001).

Entre as bases do DNA, tem sido demonstrado que a guanina é a única base reativa com $^1\text{O}_2$. A determinação das constantes de desativação total de derivados dos nucleosídeos em 1,1,2-triclorotrifluoretano mostrou uma diferença de duas ordens de grandeza da guanina em relação às demais bases (Tabela 1.3). Sendo estabelecida a seguinte ordem de reatividade relativa para as bases do DNA frente ao $^1\text{O}_2$: guanina>>citocina>adenina>uracila>timina (Prat *et al.*, 1997).

Tabela 1.3 Dados de constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) do $^1\text{O}_2$ pelos derivados dos nucleosídeos em 1,1,2-triclorotrifluoretano (Prat *et al.*, 1997).

Base	k_t ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Guanina	3,0
Citosina	0,058
Adenina	0,018
Uracila	0,011
Timina	0,0069

Muitas tentativas têm sido feitas para isolar e caracterizar intermediários e produtos da foto-oxidação de derivados da guanina. Entretanto, por causa da baixa solubilidade do derivados da guanina em diversos solventes, instabilidade de intermediários e dificuldades analíticas na separação de fotoprodutos instáveis e polares, o mecanismo da oxidação fotossensibilizada da guanina ainda não está resolvido (Kang e Foote, 2002a).

Foi reportada a presença do endoperóxido no anel imidazol da purina por estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) da fotossensibilização à baixa temperatura (-80 °C) do nucleosídeo modificado da guanosina, a 2'-3'-5'-O-(*tert*-butildimetilsilil)-8-metilguanosina, (Sheu e Foote, 1993).

Em recente estudo de fotossensibilização a baixa temperatura usando um derivado da guanosina solúvel em solventes orgânicos, a 2'-3'-5'-O-(*tert*-butildimetilsilil)guanosina, foi identificado um produto majoritário final que apresenta o anel imidazol aberto e pequena quantidade de 8-oxo-7,8-dihidroguanosina (8-oxoGuo) (Sheu *et al.*, 2002). O mecanismo de formação desse produto majoritário foi estudado usando fotossensibilização (< -100 °C) de um composto marcado com ¹³C na posição 8, a 2'-3'-5'-O-*tert*-butildimetilsilil-N-*tert*-butildimetilsilil-8-¹³C-guanosina (Kang e Foote, 2002a). Os resultados mostraram a presença de dois intermediários transientes detectados por NMR de ¹³C e assinalados como estruturas do ácido carbâmico. Ambos intermediários se decompueram para formar CO₂ a partir do carbono da posição 8 do anel purínico e o produto com o anel imidazol aberto anteriormente caracterizado. Com bases nas observações experimentais foi proposto um mecanismo que envolve endoperóxido e dioxirano como intermediários (Figura 1.11).

Estudos de fotossensibilização em solução aquosa da 2'-desoxiguanosina (dGuo) mostraram a formação de dois produtos principais num primeiro momento: dois diastereoisômeros da 4-hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (4-OH-8-oxodGuo) e em quantidade bem menor, a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo). O mecanismo mais provável dessa reação envolveria a formação de um endoperóxido *via* cicloadição (4+2) tipo Diels-Alder do ¹O₂ no anel purínico e num passo subsequente ocorreria a clivagem e formação dos produtos mencionados anteriormente (Buchko *et al.*, 1995; Ravanat e Cadet, 1995).

Entretanto, posteriormente foi publicado (Niles *et al.*, 2001) que a mistura de diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína nucleosídeo (Sp) é o produto de decomposição final da fotossensibilização da guanosina com azul de metileno. Este resultado foi obtido pela comparação das características de tempo de retenção em HPLC e propriedades espectroscópicas de UV, NMR e massas com o composto que era obtido pela oxidação a 8-oxoGuo com CoCl₂/KHSO₅

previamente caracterizado como a mistura dos diastereoisômeros da Sp (Luo *et al.*, 2000).

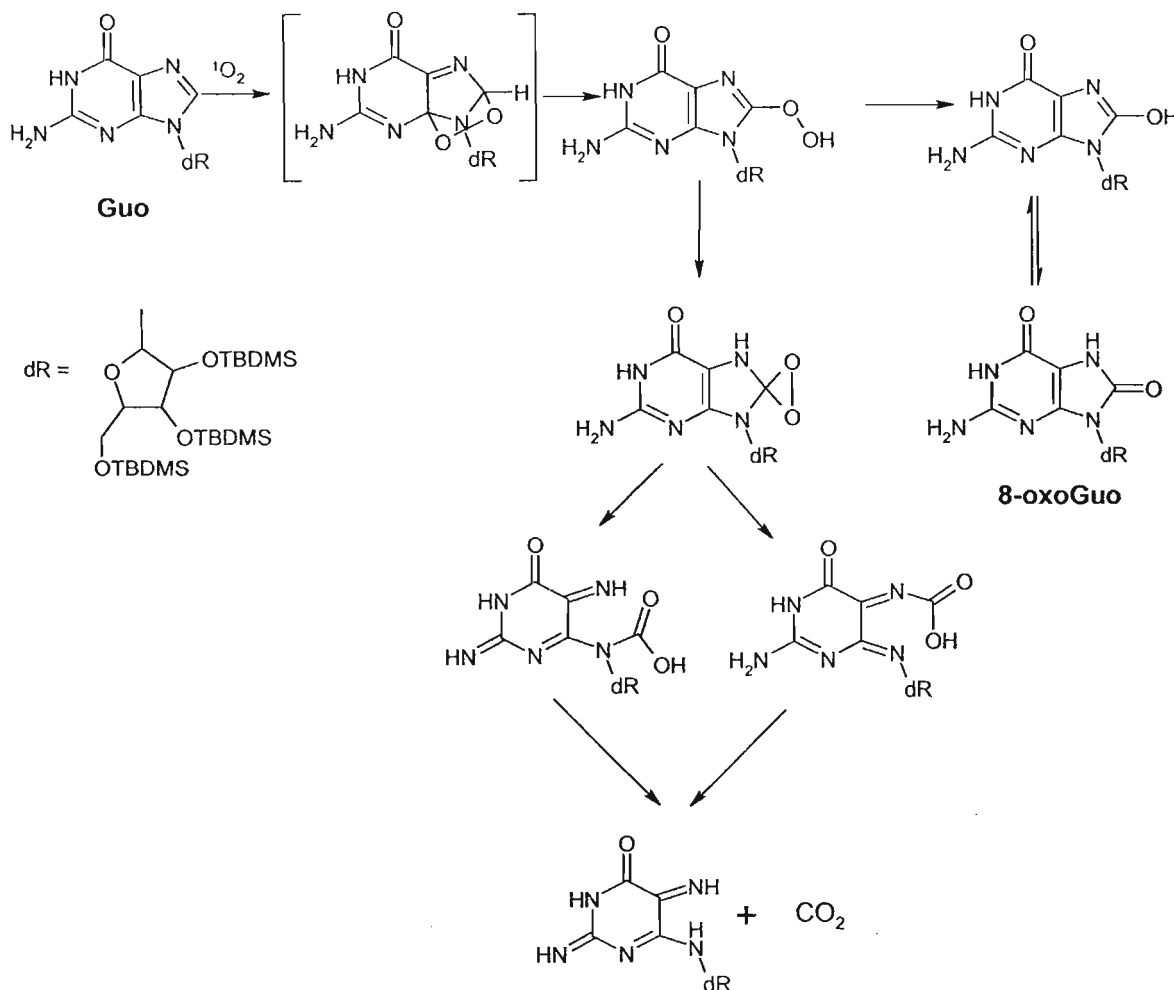


Figura 1.11 Esquema de foto-oxidação da guanosina por 1O_2 à baixa temperatura em meio apolar (Kang e Foote, 2002a).

Recentemente, em um trabalho sobre oxidação de derivados do imidazol marcados com ^{13}C e ^{15}N , Kang e Foote (2002b) propuseram um mecanismo alternativo para explicar a formação dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína com a 2'-desoxirribose (dSp) a partir da oxidação da dGuo por 1O_2 , onde o ataque da água em C4 ou C5 levaria à formação dos diferentes produtos, conforme está ilustrado no esquema da figura 1.12.

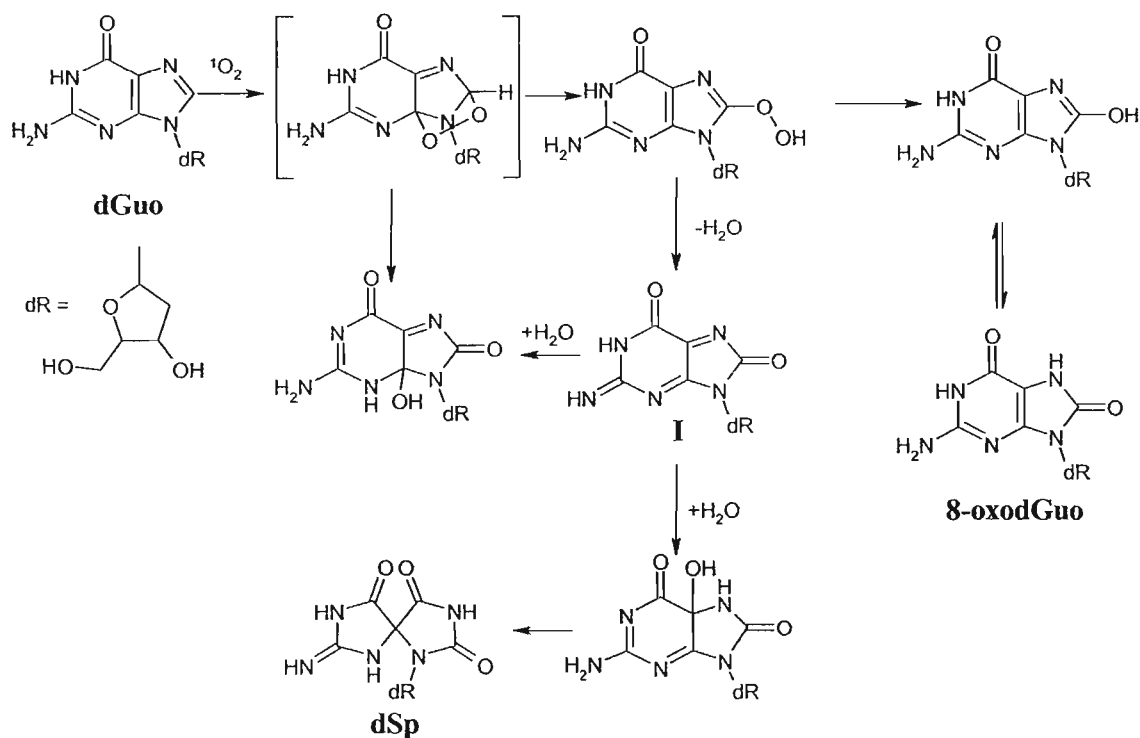


Figura 1.12 Esquema de oxidação da dGuo por 1O_2 em meio aquoso (Ravanat e Cadet, 1995 e Kang e Foote, 2002b).

É interessante observar que a 8-oxodGuo pode ser produzida por outros processos oxidativos e espécies reativas, incluindo oxidação por um elétron, radical hidroxila e peroxinitrito (Floyd *et al.*, 1988; Cadet *et al.*, 1997; Burrows and Muller, 1998). Por essa razão, a 8-oxodGuo tem sido usada como um biomarcador de estresse oxidativo e tem recebido considerável atenção nos últimos anos (Kasai *et al.*, 1992; Breen and Murphy, 1995; Spassky and Angelov, 1997; Helbock *et al.*, 1999).

Muitos estudos têm mostrado que a 8-oxodGuo é altamente reativa frente a processo oxidativos e espécies reativas incluindo oxidação por peroxinitrito e 1O_2 (Sheu and Foote, 1995a, 1995b; Adam *et al.*, 1996; Raoul and Cadet, 1996; Hickerson *et al.*, 1999; Niles *et al.*, 1999).

Foi mostrado que a 8-oxodGuo reage rapidamente com 1O_2 gerado por fotossensibilização com azul de metileno em solução aquosa, formando como produtos principais (Buchko *et al.*, 1995, Raoul e Cadet, 1996): o ácido 1-(-2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosil) cianúrico (ácido cianúrico), a 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi- β -D-eritro-pentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (oxazolona ou dOz),

sua precursora, a 2-amino-5-[(2-desoxi-β-D-eritro-pentafuranosil)-amino]-4H-imidazol-4-ona (imidazolona ou dlz) e os diastereoisômeros 4R* e 4S* da 4-OH-8-oxodGuo, mais provavelmente, os diastereoisômeros da dSp. A reação ocorre *via* um mecanismo que envolve a cicloadição [2+2] do $^1\text{O}_2$ com a ligação C4-C5 da 8-oxodGuo levando a formação de um intermediário 4,5-dioxetano que rearranja-se subseqüentemente nos derivados hidroperóxidos em C4 (Sheu e Foote, 1995b) e C5 (Raoul e Cadet, 1996). Além desses produtos, também foi relatada a presença de ácido parabânico e um produto com anel de sete membros para a oxidação do derivado sililado da 8-oxoGuo em solvente não aquoso (Sheu e Foote, 1995b). Esses compostos e o ácido oxalúrico também foram identificados entre os produtos formados pela oxidação de 3',5'-di-O-acetil-8-oxodGuo por peroxinitrito (Niles *et al.*, 1999).

O esquema da figura 1.13 mostra os principais produtos de oxidação da guanina e da 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) relatados nos estudos mencionados anteriormente.

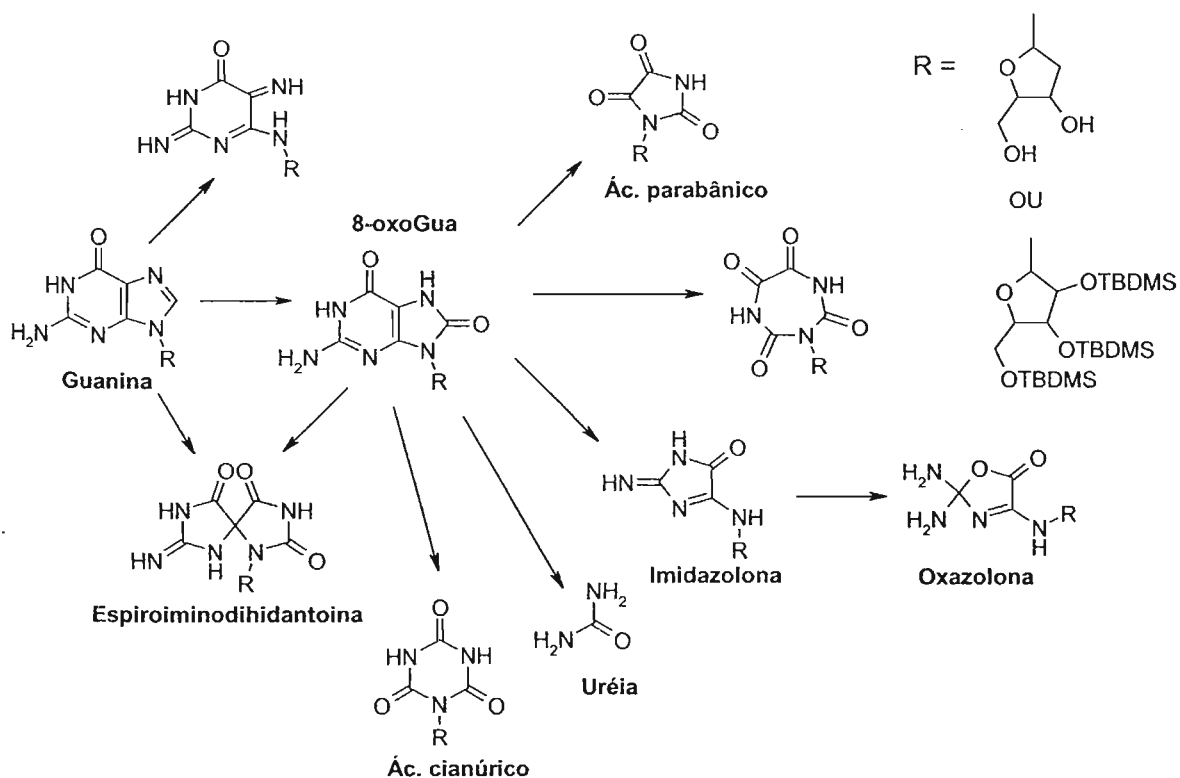


Figura 1.13 Produtos clássicos de oxidação da guanina e 8-oxoGua formados pela reação com $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização.

A oxidação eletroquímica por um elétron da 8-oxoGuo mostrou a formação do correspondente guanidinohidantoína nucleosídeo (Gh) (Goyal *et al.*, 1997). Na oxidação por um elétron da 8-oxoGuo em pH 7 a 25°C usando Ir(IV) há formação exclusiva dos diastereoisômeros da Sp (Figura 1.14), os quais também são produtos predominantes em oligonucleotídeos fita simples a 50°C (Luo *et al.*, 2000 e Leipold *et al.*, 2000). Por outro lado, a mistura em equilíbrio de Gh e iminoalantoína (Ia) é o produto predominante da oxidação da 8-oxoGuo por Ir(IV) em pH 4, em DNA fita dupla e também é o produto exclusivo em oligômeros fita simples a 4 °C (Luo *et al.*, 2001a; Leipold *et al.*, 2000). Segundo os autores (Luo *et al.*, 2001a), a formação da Sp em DNA fita dupla é altamente desfavorecida devido aos anéis heterocíclicos volumosos e, portanto, uma distribuição diferente de produtos já poderia ser esperada. Além disso, foi mostrado que a mistura Gh e Ia, pode sofrer subsequente oxidação gerando preferencialmente iminoalantoína oxidada (Ia^{ox}), que foi caracterizada por testes químicos, espectrometria de massas (MS) e NMR de ¹H.

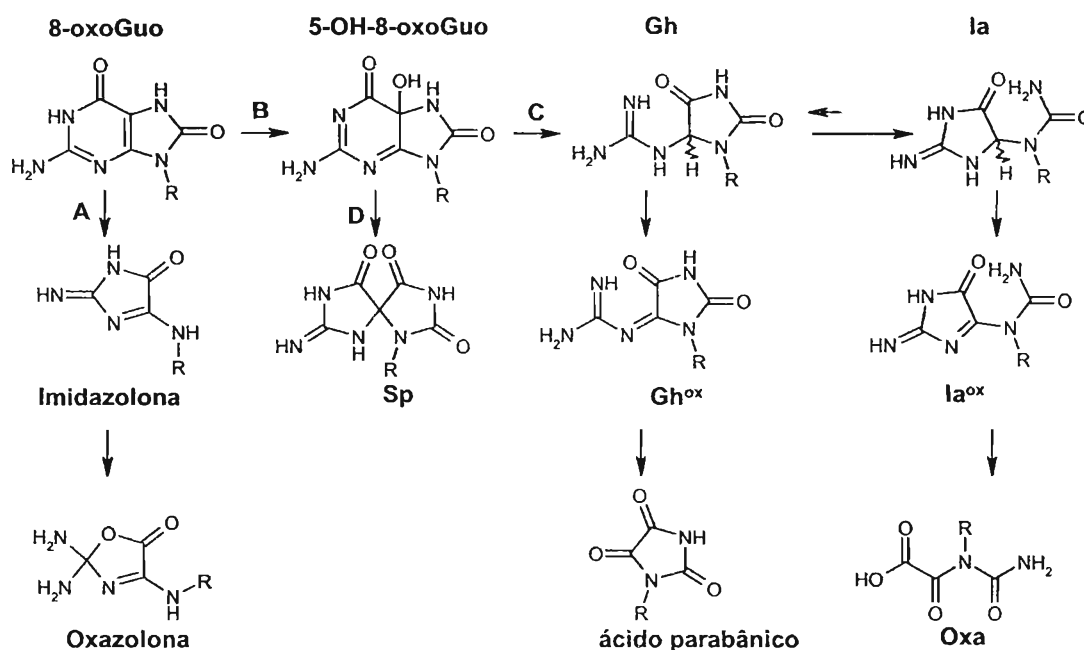


Figura 1.14 Produtos formados pela oxidação da 8-oxoGuo usando (A) Fotossensibilização com riboflavina ou (B) Ir(IV) como oxidante. (C) Via preferencial da oxidação da 8-oxoGuo nucleosídeo em pH 4, em DNA fita dupla e em oligômeros fita simples a 4 °C. (D) Via preferencial da oxidação da 8-oxoGuo nucleosídeo em pH 7 a 25 °C e em oligonucleotídeos fita simples a 50°C.

Na oxidação por dois elétrons da 8-oxodGuo (Figura 1.15), usando a porfirina diaqua-*meso*-tetrakis(4-*N*-metilpiridinimil) de manganês(III) e monopersulfato de potássio (Mn-TMPyP/KHSO₅) (Chworos *et al.*, 2001) num modelo de dinucleotídeo de guanina e timina, foi proposta a formação da dlz e da guanidinohidantoína oxidada (dGh^{ox}) como produtos principais, sendo que este último foi relatado como instável formando como produto final o ácido oxalúrico (dOxa). Além disso, para melhor caracterizar o produto dGh^{ox} foi feita uma redução do composto com NaBH₄ e o produto resultante, caracterizado pelos dados de NMR e MS, foi proposto como sendo os dois diastereoisômeros da guanidinohidantoína (dGh), nesse caso não é relatado o equilíbrio existente entre Gh e la proposto por Luo *et al.* (2001a).

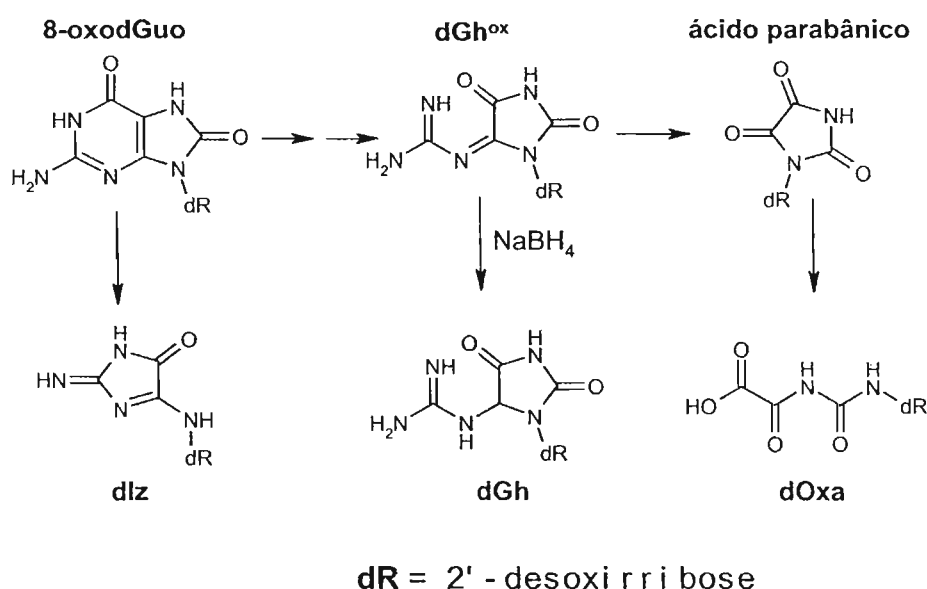


Figura 1.15 Produtos relatados para oxidação da 8-oxodGuo usando a porfirina Mn-TMPyP/KHSO₅ num modelo de dinucleotídeo. Formação da dlz e da dGh^{ox} como produtos principais. Redução do composto dGh^{ox} com NaBH₄ para caracterização.

Estudos sobre a subsequente oxidação da 8-oxodGuo por ¹O₂ em oligonucleotídeos mostraram que, ao contrário do que é observado para a 8-oxodGuo em solução, não há formação de 4-OH-8-oxodGuo ou dSp, nem ácido cianúrico. Nesse caso, o dOxa é o principal produto formado *via* um provável mecanismo que envolve a conversão do 4,5-dioxetano intermediário no

hidroperóxido em C5 e, após alguns passos que incluem a abertura do anel na ligação C5-C6 e descarboxilação, há formação de um produto relativamente estável, a dGh^{ox}. Após algumas etapas de hidrólise, a dGh^{ox} é convertida a dOxa. Esta proposta mecanística foi evidenciada com a utilização da fonte química de ¹O₂ isotopicamente marcada, DHPN¹⁸O₂ (Duarte *et al.*, 2000).

Essa diferença entre os produtos obtidos quando o estudo envolve a fita de DNA e não mais o nucleosídeo livre também é observada para os outros oxidantes. Na oxidação por um elétron de 8-oxodGuo em oligonucleotídeos com Ir(IV)⁻ forma Gh como produto majoritário e não os diastereoisômeros da Sp como se observa para o nucleosídeo livre (Duarte *et al.*, 1999).

No caso de oligonucleotídeos, simples e dupla fita, a natureza polianiónica do DNA e o pareamento das bases são fatores importantes que seriam capazes de afetar a cinética e o mecanismo de transformação dos intermediários formados (Vialas *et al.*, 2000).

1.3.1.2 Efeito mutagênico do oxigênio singlete e sistemas de reparo

A principal lesão formada em DNA pela ação do ¹O₂ é a 8-oxodGuo. Essa lesão tem um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com adenina levando a uma transversão G para T. Esse é o tipo de mutação mais observada em DNA tratado com o ¹O₂. Um segundo tipo de mutação, transversão G para C, também tem sido observada após a replicação de DNA lesado por ¹O₂ em bactéria ou em células de mamíferos, porém as lesões envolvidas com esse tipo de mutação ainda são desconhecidas (Costa de Oliveira *et al.*, 1992; Ribeiro *et al.*, 1994; Agnez-Lima *et al.*, 1999 e 2001).

As enzimas bacterianas envolvidas no reparo da 8-oxodGuo em DNA são a formamidopiridina-DNA-glicosilase (Fpg ou MutM) e MutY-glicosilase. A Fpg remove 8-oxodGuo quando pareada com citosina e reconhece diversas lesões em purinas com o anel imidazol aberto (Boiteux *et al.*, 1992). A MutY-glicosilase remove a adenina quando pareada com a 8-oxodGuo (Michaels *et al.*, 1992).

Oxidação da guanina também pode ocorrer na reserva de nucleotídeos celular. A 8-oxodGTP formada pode ser um potente substrato mutagênico para síntese de DNA uma vez que pode ser incorporada oposta à adenina ou citosina. Esse problema pode ser evitado pela ação de uma outra enzima chamada de

MutT que possui a propriedade de hidrolisar 8-oxodGTP em 8-oxodGMP (Maki e Sekiguchi, 1992). Além disso foi mostrado que a 8-oxodGMP não pode ser refosforilada e pela ação de uma fosfatase é convertida em 8-oxodGuo para posterior excreção da célula (Hayakawa *et al.*, 1995).

Estudos relacionados ao papel mutagênico dos produtos de oxidação da 8-oxodGuo em DNA têm sido feitos usando modelos de replicação e reparo *in vitro*. Com relação ao principal produto gerado pela oxidação por $^1\text{O}_2$ em oligonucleotídeos fita simples, o ácido oxalúrico, foi avaliada a inserção do nucleosídeo oposto à lesão. Observou-se que usando a polimerase β a presença da lesão inibiu a extensão do primer, usando polimerase Klenow exo- houve inserção exclusiva de adenina oposta ao ácido oxalúrico e com a Taq polimerase, além da adenina, também houve inserção da guanina. Nos estudos de reparo foi mostrado que a Fpg foi capaz de retirar o ácido oxalúrico, mas a eficiência é duas vezes menor quando comparada com a 8-oxodGuo como substrato. Além disso, o ácido oxalúrico também é substrato da endonuclease III e sua excisão é mais eficiente quando comparada com um substrato conhecido como a 5-hidroxicitosina (Duarte *et al.*, 2001).

1.3.2 Danos em lipídeos e proteínas

Os principais alvos do $^1\text{O}_2$ em lipídeos são os ácidos graxos insaturados, presentes nos fosfolipídeos e triacilgliceróis, e o colesterol. Esses compostos são os principais constituintes da membrana celular e de lipoproteínas.

A oxidação de ácidos graxos insaturados por $^1\text{O}_2$ forma hidroperóxidos lipídicos (LOOH), esses compostos formados apresentam um grupo polar na cadeia hidrofóbica, o qual tende a se associar com as cabeças polares dos fosfolipídeos, gerando assim uma perturbação no empacotamento da membrana celular. Dependendo da quantidade de LOOH formados durante um certo período e numa determinada localização da membrana celular pode haver uma propagação da peroxidação lipídica pelo fornecimento de um dos componentes de seu ciclo autocatalítico (LOOH) como também ocorrer lise celular. Além dos ácidos graxos insaturados, o colesterol pode também ser oxidado pelo $^1\text{O}_2$. Os produtos formados em lipoproteínas podem estar envolvidos no processo de aterosclerose.

A seguir são mostradas algumas constantes de velocidade de desativação do $^1\text{O}_2$ por ácidos graxos insaturados, seus derivados ésteres de metila e colesterol (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 Dados de constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) e constantes de reação (k_r) com o $^1\text{O}_2$ para ácidos graxos insaturados, seus derivados ésteres de metila e colesterol.

Composto	k_t ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)		k_r ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
	ácidos ^a	ésteres ^b	ésteres ^c
Oleico	0,053	0,017	0,074
Linoleico	0,073	0,042	0,130
Linolênico	0,104	0,080	0,190
Colesterol	0,057	-	-

^a em benzeno deuterado (Vever-Bizet *et al.*, 1989)

^b em tetracloreto de carbono (Kranovsky *et al.*, 1985)

^c em piridina (Doleiden *et al.*, 1974)

Esses hidroperóxidos lipídicos gerados podem ser reparados por peroxidases. Essas enzimas utilizam esses compostos como substratos e convertem o peróxido em álcool. Contudo, a eficiência desse processo vai depender do estado redox da célula, pois é necessária a presença de um redutor para que esse processo ocorra. Em membranas, o ácido graxo contendo o hidroperóxido é clivado pela fosfolipase A2 na presença de íons Ca^{2+} . A glutatona peroxidase que está nos fluidos dos arredores reduz o peróxido do ácido graxo liberado a álcool. O reparo é completado pela reacilação do fosfolipídeo pela acil-coenzima A (Halliwell e Gutteridge, 1999)

Em proteínas o $^1\text{O}_2$ reage preferencialmente nas cadeias laterais dos aminoácidos triptofano, histidina, tirosina, metionina e cisteína. A reação com esses resíduos pode gerar endoperóxidos e hidroperóxidos intermediários que, na presença de luz UV ou íons de metais como Fe^{2+} , podem formar outras espécies reativas.

As constantes de velocidade para reação química do $^1\text{O}_2$ com a cadeia lateral dos aminoácidos mencionados anteriormente são mostradas na tabela 1.5.

Tabela 1.5 Dados de constante de reação com o $^1\text{O}_2$ (k_r) das cadeias laterais de aminoácidos em pH 7 (Monroe, 1985; Rougee et al., 1988; Wilkinson et al., 1995).

Aminoácido	k_r ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Triptofano	30 20-70 ^a
Histidina	32-90 ^b
Tirosina	8,0
Cisteína	8,9
Metionina	16

^a supressão física (k_q)

^b depende do pH, sendo ca. $100 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH > 8 e $5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH baixo.

No caso do triptofano, como aminoácido livre ou em proteínas, os principais produtos formados são a *N*-formilkinurenina e seu produto de hidrólise, a kinurenina, sugerindo que mecanismos similares ocorram em ambos os casos (Balasubramanian et al., 1990). Para a tirosina como aminoácido livre, foi caracterizado o produto cíclico, o ácido 2-carboxílico-3 α -hidroperóxido-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahidro-1H-indol e quando a tirosina está presente em peptídeos observa-se a formação de um produto cujo anel fenólico foi transformado em dienona álcool (Wright et al., 2002).

Na oxidação de histidina livre por $^1\text{O}_2$ há formação de um endoperóxido intermediário, que após clivagem pode levar à formação de ácido aspártico, derivados de asparagina e uréia (Tomita et al., 1969).

A reação da metionina com $^1\text{O}_2$ forma uma espécie "peroxi" zwitteriônica que sofre reação subsequente com uma segunda molécula de metionina gerando dois mols de sulfóxido (Sysak et al., 1977). A reação em proteínas e peptídeos ainda não foi elucidada.

Para a cisteína, observou-se que dissulfeto e oxiácidos são formados por um mecanismo ainda não elucidado (Ando e Takata, 1985). O rendimento quantitativo dos produtos dos resíduos de cisteína em proteínas deve variar de

acordo com a estrutura da proteína devido a fatores estéricos ou barreiras eletrônicas à formação do dímero.

A formação de proteínas modificadas pela oxidação por $^1\text{O}_2$ pode resultar numa série de mudanças biofísicas e bioquímicas de suas propriedades e funções. Pode aumentar ou diminuir a susceptibilidade da proteína oxidada à enzimas proteolíticas, pode alterar suas propriedades mecânicas como no colágeno e pode ainda mudar o dobramento da proteína e alterar sua ligação com substratos e cofatores. Essas alterações podem levar à disfunção celular e progressão de doenças.

1.3.3 Efeito sinalizador do oxigênio singlete em sistemas biológicos

Apesar de todos os efeitos deletérios relacionados à presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, existem processos celulares nos quais a geração dessas espécies em quantidades controladas pode ser utilizada em processos fisiológicos e de sinalização celular.

Estudos relacionados ao efeito da radiação UVA (320-380 nm) têm mostrado que o $^1\text{O}_2$ é responsável por uma série de eventos que levam aos danos celulares (Ryter e Tyrrell, 1998). A inativação de fibroblastos humanos por irradiação UVA indicou que a geração de $^1\text{O}_2$ exerce um papel fundamental na citotoxicidade do UVA (Tyrrell and Pidoux, 1989).

A heme-oxigenase é uma enzima de regulação da *via* de degradação do heme. Essa enzima pode ser induzida *in vivo* e *in vitro* por diversos fatores e em fibroblastos de pele humana ela pode ser induzida pela radiação UVA. Nesse caso, foi mostrado que o $^1\text{O}_2$ é o efector primário da indução pela análise dos níveis de mRNA dessa enzima, os quais se mostraram aumentados na presença de D_2O e reduzidos na presença de azida de sódio e L-histidina. Por outro lado, DMSO e manitol, que seqüestram radical $^{\bullet}\text{OH}$, mostraram pouco ou nenhum efeito (Basu-Modak e Tyrrell, 1993).

Além disso, a radiação UVA provoca uma síntese desbalanceada de collagenase e seu inibidor TIMP-1, que são responsáveis pela manutenção da integridade da matriz extracelular da pele levando a um aumento na formação de rugas e dificuldades de cicatrização. Usando o gerador químico NDPO_2 foi estudada a regulação de mRNA de collagenase e TIMP-1, na presença de D_2O e

azida de sódio. Foi mostrado que o $^1\text{O}_2$ está diretamente envolvido no aumento dos níveis de mRNA de collagenase, porém a síntese de mRNA de TIMP-1 permaneceu inalterada (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993). Embora tenha sido mostrado que o $^1\text{O}_2$ está envolvido nesse processo, sua participação na cascata de sinalização pode ser mais complexa. A participação do $^1\text{O}_2$ foi mostrada em eventos iniciais na membrana celular que precedem a indução de interleucinas (IL-1 e IL-6), levando à degradação do tecido no foto-envelhecimento (Wlaschek *et al.*, 1997).

Foi relatado que o fator de transcrição AP-2, que está envolvido com a morfogênese em vertebrados, em particular, na diferenciação e desenvolvimento de queratinócitos na epiderme, está também envolvido na indução da síntese da molécula de adesão intracelular ICAM-1. Foi demonstrado que esse último processo é mediado por $^1\text{O}_2$ em queratinócitos humanos (Grether-Beck *et al.*, 1996). Além disso, foi proposto que o mecanismo desse processo envolve a geração não enzimática de ceramida a partir de esfingomiélin que causa a ativação de AP-2 (Grether-Beck *et al.*, 2000).

A radiação UVA e $^1\text{O}_2$ também estão envolvidos com a ativação do fator de transcrição AP-1 a qual é mediada pela ativação de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) consistindo na indução rápida e transiente de p38 e c-Jun-N-terminal quinase (JNK) (Klotz *et al.*, 1999).

Objetivos

2 Objetivos

O estudo sobre o papel do $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos é relevante, pois esta espécie é dotada de características interessantes, apresenta alta reatividade frente a diferentes compostos orgânicos e tempo de vida razoavelmente alto (μs), sendo capaz de agir em diferentes compartimentos celulares com os mais variados ambientes químicos levando a respostas particulares frente a cada situação.

A identificação e a caracterização de produtos de oxidação formados pela reação de biomoléculas com $^1\text{O}_2$ são importantes para elucidação desses processos nas células e suas implicações biológicas.

O principal foco desse trabalho foi contribuir no esclarecimento dos mecanismos de reação do $^1\text{O}_2$ com um alvo biológico importante, o DNA. Para atingir esse objetivo foram executadas as seguintes metas:

1. Síntese e utilização da decomposição térmica de endoperóxidos como uma fonte pura de $^1\text{O}_2$.
2. Preparação de um endoperóxido isotopicamente marcado com oxigênio-18 (DHPN $^{18}\text{O}_2$) para estudos mecanísticos envolvendo a reação de $^1\text{O}_2$.
3. Identificação por cromatografia líquida de alta pressão e análises por espectrometria de massas com ionização por electrospray dos produtos de oxidação gerados pela reação da 2'-desoxiguanosina e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com $^1\text{O}_2$.
4. Tratamento de células com DHPN $^{18}\text{O}_2$ visando identificar a formação de lesões em DNA devido à reação direta com $^1\text{O}_2$.
5. Esclarecimento sobre a possibilidade da decomposição do ONOO^- gerar quantidades estequiométricas de $^1\text{O}_2$.

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A seguir é apresentada a lista dos materiais utilizados nos procedimentos experimentais.

Merck (Rio de Janeiro, Brasil): tetracloreto de carbono, benzeno, ácido fosfórico, tolueno, ácido sulfúrico, acetona, azul de metileno, ácido fórmico, iodo, acetato de etila. (Darmstadt, Alemanha): etanol absoluto, éter etílico, clorofórmio, metanol, ácido clorídrico, triton X-100, sódio metálico, sílica gel para cromatografia em coluna aberta (63-200 μ m), placas de sílica para cromatografia em camada delgada (0,2 mm, fluorescência em 254 nm), acetonitrila e metanol para cromatografia.

Sigma (Missouri, Estados Unidos): 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiadenosina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxitimidina, 3-amino-1,2-propanodiol, 4-dimetilaminopiridina, acetato de sódio, ampicilina, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, Chelex[®] 100, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, desferroxamina, dimetilformamida, DNA de timo de bezerro, dodecil sulfato de sódio, Eagle modificado por Dulbecco, EDTA, formiato de amônio, fosfatase alcalina, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, hidróxido de sódio, iodeto de sódio, isopropanol, molibdato de sódio, nuclease P1, penicilina-estreptomicina, proteinase K, Rnase T1, Rnase A, sacarose, sulfato de estreptomicina, sulfato de magnésio anidro, sulfato de sódio anidro, e tripsina.

Aldrich (Wisconsin, Estados Unidos): éster malônico, 1,4-dimetilnaftaleno, Clorotrimetilsilano, anidrido do ácido isobutírico, clorodimetoxitritila, fosforamidita de *N,N*-diisopropiletilamina, 2-cianoetil-*N,N,N,N*-tetraisopropildiamidita, trietilamina água deuterada (99.9 %), dimetilsulfóxido deuterado (99.9 %), clorofórmio deuterado (100 %), tubos para NMR (standard e gold).

Isotec inc. (Ohio, Estados Unidos) Oxigênio-18 gasoso 99% (¹⁸O₂).

Supelco (Estados Unidos): colunas para HPLC *Supelcosil*, LC-18 (250 x 4,6 mm e 150 x 4,6 mm; tamanho de partícula 5 μ m), LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 μ m), coluna pra extração em fase sólida *Supelclean* LC-18 (6 mL, 1g).

Phenomenex (Califórnia, Estados Unidos): LC-18 (50 x 1 mm, tamanho de partícula 3 μ m) e LC-NH₂ (250 x 10 mm, tamanho de partícula 10 μ m).

Interchim (Montluçon, France): Hypersyl ODS column (250 x 4,6 mm, tamanho de partícula 5 µm e 250 x 2,1 mm, tamanho de partícula 5 µm).

Thermo Quest: coluna para HPLC LC-18-ODS *Hypersyl* (250 x 10 mm, tamanho de partícula 10 µm).

Hamilton (Nevada, Estados Unidos): seringas para injeção manual em sistema de HPLC de 25, 50, 250 e 500 µL.

Applied Biosystems (Estados Unidos): monômero de fosforamidita 3'-O-[(2-cianoetoxi) (diisopropilamino)fosfino]-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-desoxitimidina.

SDS (Peypin, França): Piridina, diclorometano.

Carlo Erba (Milão, Itália): éter dietílico, amônia 40 %, acetato de etila.

USB® (Áustria): brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium

Cultilab (São Paulo, Brasil): soro fetal bovino (SFB)

Peróxidos do Brasil (Paraná, Brasil): água oxigenada 35 %

A 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina foi cedida pelo nosso colaborador Dr. Jean Cadet (CEA, França). O sulfato mono- $\{2-[10-(2\text{-sulfoxi-etil})\text{-antracên-9-il}]\text{-etil}\}$ éster de sódio, disponível no laboratório, foi sintetizado conforme descrito em (McCall, 1984). O peroxinitro foi gentilmente cedido pela Prof. Ohara Augusto (IQ-USP). A água utilizada foi tratada pelo *Water System Nanopure* da marca Barnstead (Iowa, Estados Unidos).

3.2 Equipamentos

- Agitador *Thermomixer Confort* da *Eppendorf* (Hamburgo, Alemanha) modelo 5355.
- Autoclave vertical da *Fanem* (Brasil) modelo 415.
- Balanças da *Denver Instrument Company* (Estados Unidos) modelos XE-310 e AA-200.
- Bomba de infusão com seringa modelo 22 da *Harvard Apparatus, Inc.* (Massachusetts, Estados Unidos).
- Centrífuga da *Hitachi* (Tóquio, Japão) modelo SCR 20B.
- Cromatógrafo à gás *Shimadzu* (Tóquio, Japão) modelo GC-14A com detector FID.
- Detector Coulométrico da *ESA coulochem II 5021* (Massachusetts, Estados Unidos).

- Detector eletroquímico para HPLC *Antec Decade* (Holanda).
- Espectrofotômetro da *Hitachi* (Tóquio, Japão) modelo U-3000.
- Espectrômetros de NMR 300 MHz da *Varian* (Califórnia, Estados Unidos) modelo *Unity Inova* ou *Bruker* (Alemanha) *DPX 300* série *Avance* e *AC-200*.
- Injetor manual da *Rheodyne* (Califórnia, Estados Unidos).
- Liofilizador *E-C Micro Modulyo* e bomba da *Savant* (Nova Iorque, Estados Unidos) modelo VLP-20.
- pHmetro da *Corning* (Estados Unidos) modelo 320.
- Sintetizador de oligonucleotídeos: *Applied Biosystems* (Estados Unidos).
- *Speed Vac[®] Plus Savant* (Nova Iorque, Estados Unidos) e bomba da *Savant* (Nova Iorque, Estados Unidos) modelo VLP200.
- Sistema de HPLC da *Hewlett Packard* (Estados Unidos) modelo *Agilent 1100* e software *HP Chem Station for LC*.
- Sistema de HPLC da *Shimadzu* (Tóquio, Japão): 2 bombas *LC-10ADVP*, injetor automático *SIL-10ADVP*, detector de absorvância UV *SPD-10AVVP*, detector de fluorescência *RF-551*, detector de fotodiodos em série *SPD-M10AVVP*, controlador de Sistema *SCL-10AVP* conectado a um computador e software *CLASS-VP* versão 5.03.
- Sistema de MS composto por: espectrômetro de massas *Quattro II* da *Micromass* (Manchester, Reino Unido), software *Masslynx* versão 3.2, injetor *Rheodyne* (Califórnia, Estados Unidos).
- Sistema de MS: espectrômetro de massas *API3000* triplo quadrupolo da *Perkin-Elmer* (Paris, França) com fonte *turbospray* da *SCIEX* (Thornill, Canada).
- Sistema de MS: *LC-Q* (Mat-Finnigan) com analisador por captura de íons.
- Sistema para detecção de intensidade e espectro de emissão de luz do $^{1}O_2$ na região do infravermelho. Composto por um tubo fotomultiplicador (*R5509 PMT*, *Hamamatsu Photoniks KK*, *Shizuoka*, Japão), sistema de refrigeração por nitrogênio líquido (*S600 PHOTOCOOLTM*, *PC176TSCE005 cooler*, *Products for Research Inc.*, MA), fonte de alta tensão (*High Voltage DC Power Supply Model C3360*, *Hamamatsu Photoniks KK*, *Shizuoka*, Japão) e monocromador (*M300*, *Edinburgh Analytical Instruments*, UK). software *F-900 v. 6.22* (*Edinburgh Analytical Instruments*, *Livingston*, Reino Unido).

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Síntese do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico

O ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico (ANDP) é um produto intermediário na síntese de dois derivados de naftaleno solúveis em água: o NDP e a DHPN. A rota adotada foi baseada nos trabalhos de Lock e Walter (1942) e Marvel e Wilson (1958), sendo que, o primeiro passo, no qual ocorre a bromação do DMN para formar o 1,4-bis(bromometil)naftaleno (BBMN), foi modificado e não se usou *N*-bromosuccinamida. A figura 3.1 ilustra a rota e os principais reagentes envolvidos na síntese desse ácido. A descrição de cada etapa é feita a seguir.

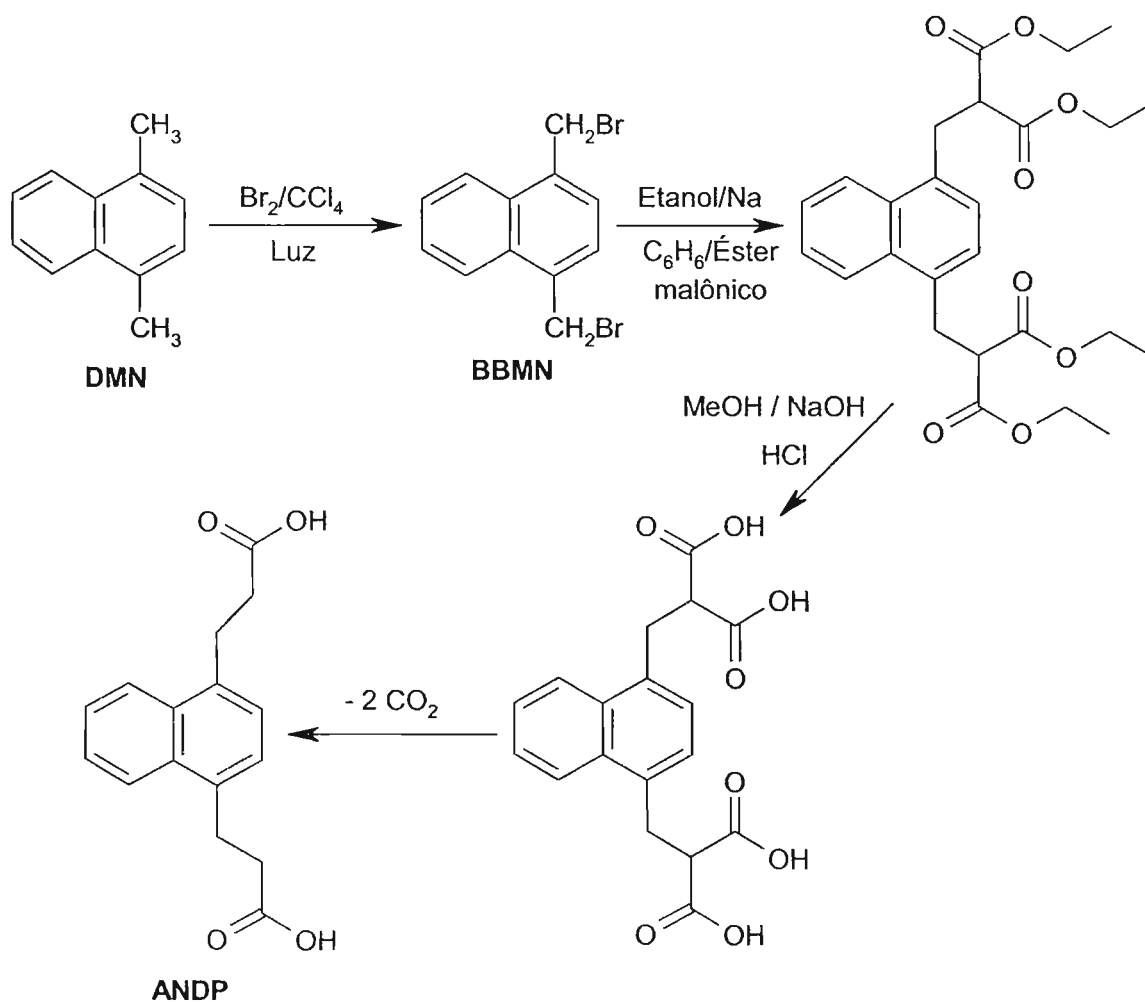


Figura 3.1 Rota de síntese do ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico.

3.3.1.1 Bromação radicalar do 1,4-dimetilnaftaleno

O DMN apresenta duas regiões susceptíveis ao ataque do bromo: a parte aromática e a cadeia lateral. A halogenação da cadeia lateral exige a formação de bromo radicalar. O passo limitante dessa reação é a formação do radical alquila, porém, uma vez formado, o radical converte-se rapidamente no haleto de alquila.

Em um balão de 1 L de fundo redondo e três bocas, equipado com condensador de refluxo, funil de adição e agitador mecânico, foram colocados 250 mL de CCl_4 e 25 mL de DMN (0,16 mol), previamente purificado por destilação à pressão reduzida (intervalo de ebulição a 751 mmHg: 262-264 °C).

Em seguida, adicionaram-se, muito lentamente (~2 h) e com agitação, 18 mL de Br_2 (0,35 mol), sendo que o sistema foi mantido irradiado com luz fornecida por uma lâmpada de 500 W e aquecido por uma manta.

Após o término da adição de Br_2 , o sistema permaneceu em refluxo, sob aquecimento, agitação e irradiação por 4 h. Depois desta fase, permaneceu em repouso à temperatura ambiente por uma noite.

Eliminou-se o solvente por roto-evaporação e procedeu-se uma recristalização do sólido obtido com CHCl_3 . Depois de permanecer em repouso por 6 h, o sólido referente ao BBMN foi recuperado em funil de Büchner.

Os rendimentos para as diversas preparações ficaram em torno de 52 a 75 % e os sinais obtidos no espectro de NMR de ^1H em clorofórmio deuterado estão de acordo com o esperado pela estrutura da molécula (Anexo I).

3.3.1.2 Síntese malônica

Por tratamento com etóxido de sódio em álcool absoluto, o éster malônico transforma-se num sal, o éster malônico sódico. A ação deste sal sobre o BBMN gera um éster malônico substituído. Esta reação consiste num ataque nucleofílico do carbânion $\text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2^-$ ao haleto de alquila. A eficiência dessa preparação depende do tratamento adequado dos solventes e da pureza do éster malônico, que foi verificada por cromatografia gasosa e estava acima de 98 % (procedimentos descritos no item 3.3.1.2.1).

Em um balão de 1L com três bocas, equipado com condensador de refluxo, agitador mecânico, funil de adição e tubo secante, foram colocados 250 mL de etanol absoluto seco e adicionados lentamente 8 g de sódio metálico (0,35 mol).

Quando todo o sódio havia reagido, 100 mL de éster malônico redistilado (0,66 mol) foram adicionados gota a gota na solução sob agitação por 2 h. Durante esta etapa, manteve-se o sistema aquecido (~50 °C) para prevenir a precipitação do éster de sódio malônico.

Depois de todo o éster ter sido adicionado, o sistema foi mantido em refluxo por 2 h. Adicionaram-se 400 mL de benzeno seco para facilitar a dissolução do BBMN, que foi adicionado na forma sólida (37 g; 0,12 mol) durante 45 min. A precipitação do NaBr começou logo após o início da adição do BBMN. O sistema permaneceu em refluxo por 4 h e sob temperatura ambiente durante uma noite.

A mistura resultante foi neutralizada com 100 mL de água e 100 mL de uma solução aquosa de HCl a 20 %. Houve separação das fases orgânica e aquosa, sendo que esta última foi lavada com éter etílico. As fases orgânicas foram combinadas e lavadas com solução 5 % de NaHCO₃ e água, sendo que no final a mistura foi seca sob Na₂SO₄ anidro. Os solventes e excesso de éster malônico foram removidos por roto-evaporação à pressão reduzida.

Uma amostra do produto foi dissolvida em clorofórmio deuterado para caracterização por espectroscopia de NMR de ¹H e os sinais obtidos estão de acordo pela estrutura da molécula (Anexo II).

3.3.1.2.1 Tratamento de solventes e do éster malônico

Etanol seco: Em um balão de 1L foram colocados 500 mL de etanol absoluto e foram adicionados 2,5 g de magnésio metálico e 0,5 g de iodo ressublimado. O sistema permaneceu em refluxo por 2 h e em seguida o etanol foi recuperado por destilação (adaptado de Becker *et al.*, 1997).

Benzeno seco: Em um balão de 1 L foram colocados 600 mL de benzeno e 3 g de sódio metálico na forma de fio, o sistema permaneceu em refluxo por 1 h e o benzeno foi recuperado por destilação. Essa operação foi repetida mais uma vez (Becker *et al.*, 1997).

Éster Malônico: Em um balão de 250 mL foram colocados 150 mL de éster malônico, que foi destilado à pressão reduzida e analisado por cromatografia gasosa (Solvente: acetato de etila, Temperatura do injetor 250 °C, Temperatura

do detector: 300 °C, Gradiente: 3 min a 60 °C, de 3 min a 13 min até atingir 200 °C e mais 2 min a 200 °C).

3.3.1.3 Hidrólise e Descarboxilação

Em um balão de 500 mL, equipado com condensador de refluxo, o líquido resultante da etapa anterior, o éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de dietila, foi dissolvido em 200 mL de solução 6 M de NaOH e 50 mL de metanol. O sistema foi aquecido sob refluxo por 2 h com agitação.

Foi realizada uma filtração a quente e acrescentou-se ao filtrado HCl até que a solução apresentasse pH ~ 1 e houvesse a formação de um precipitado. Após essa etapa, o sistema permaneceu em geladeira por uma noite.

O sólido, obtido por filtração em funil de Büchner, foi mantido em estufa a temperatura de 120°C durante cerca de 15 dias até descarboxilação total, verificada pela estabilização da massa do produto.

Os rendimentos obtidos para as diversas preparações ficaram em torno de 54 a 87 %. Uma amostra do produto final foi dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado para caracterização por espectroscopia de NMR de ^1H , ^{13}C e DEPT e os sinais obtidos estão de acordo com o esperado pela estrutura da molécula (Anexo III).

3.3.2 Síntese do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

A preparação do NDP foi feita conforme descrito por Di Mascio e Sies (1989). Dissolveram-se 1,5 g de sódio metálico em 100 mL de metanol seco (procedimento de tratamento descrito no item 3.3.2.1), adicionaram-se 3,5 g do ANDP (0,013 mol) e agitou-se por 2 h sem aquecimento. Após esse tempo, a agitação foi cessada e adicionaram-se 200 mL de éter para precipitar o sal obtido. O sistema permaneceu em geladeira por uma noite. Em seguida, o sólido foi separado por filtração e seco em estufa a 50 °C.

Os rendimentos obtidos para as diversas preparações ficaram em torno de 73 a 88 %. Uma amostra do produto dissolvida em água deuterada foi analisada por NMR de ^1H e ^{13}C , para análise por HPLC-MS no modo negativo de ionização por *electrospray* (ESI-) com temperatura da fonte em 120 °C; capilar em 3,5 kV; e cone em 10 V. Nesse caso, a amostra foi dissolvida em uma solução (1:1) de

água e acetonitrila (ACN). Os sinais obtidos no espectro de NMR de ^1H e ^{13}C e na análise por MS estão de acordo com o esperado pela estrutura da molécula (Anexo IV).

3.3.2.1 Tratamento de solvente para preparação do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

metanol seco: Em um balão de 250 mL foram adicionados 150 mL de metanol, 1 g de magnésio metálico e 0,2 g de iodo ressublimado, o sistema permaneceu em refluxo por 2 h e o metanol foi recuperado por destilação (adaptado de Becker et al., 1997).

3.3.3 Síntese da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

Para preparação da DHPN foi feita, inicialmente, a síntese de um intermediário mais reativo a partir do ANDP, o éster 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila (NDPE) e num passo posterior, foi feita a reação entre o NDPE e o 3-amino-1,2-propanodiol para obter a DHPN (Figura 3.2).

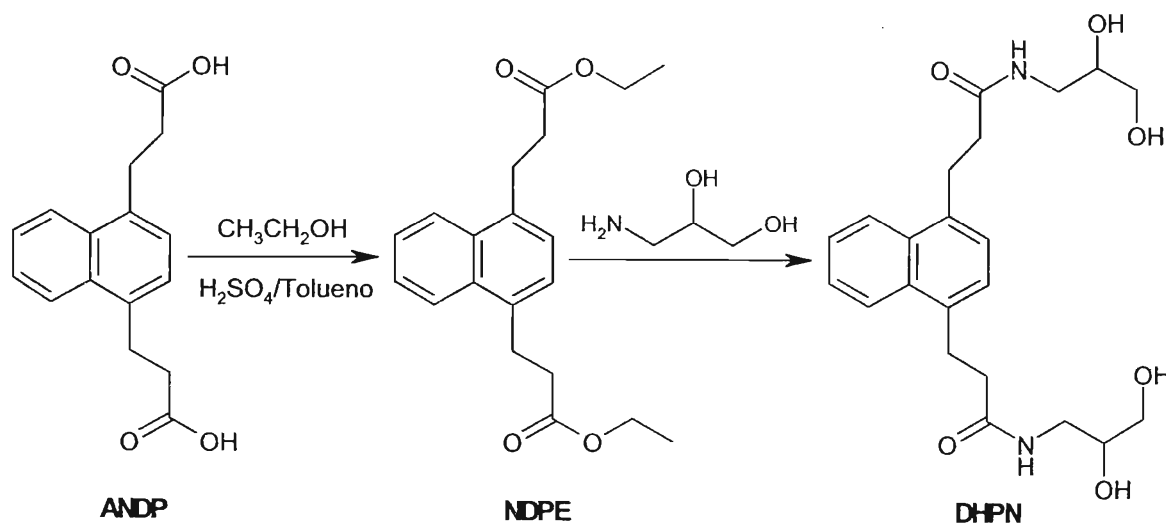


Figura 3.2 Rota de síntese da DHPN partindo do ANDP.

3.3.3.1 Esterificação

A etapa de esterificação foi feita como descrito em Vogel (1989) com algumas modificações. Em um balão de 250 mL equipado com condensador de

refluxo, foram colocados 21 g de ANDP (0,077 mol), 150 mL de álcool etílico absoluto e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Alguns pequenos pedaços de porcelana porosa foram adicionados e o sistema foi mantido sob refluxo por 2 h.

Adicionaram-se 40 mL de tolueno e o *dean-stark* foi acoplado ao sistema e teve sua parte lateral preenchida com tolueno. Esta aparelhagem serve para extrair a água da solução favorecendo a formação dos produtos e substitui as sucessivas destilações sugeridas na referência.

Após 4 h de aquecimento foi feita uma destilação simples para eliminar o álcool etílico e o excesso de tolueno, obtendo-se um líquido viscoso. Foi feita uma extração com 200 mL de uma solução 20 % de cloreto de sódio e para uma melhor separação foi acrescentado 50 mL de éter etílico. A fase apolar foi lavada com 200 mL de solução 5 % de bicarbonato de sódio e seca sob Na_2SO_4 anidro. Após filtração, o filtrado foi roto-evaporado para retirar o resíduo de tolueno e o éter etílico.

O rendimento dessa etapa foi de 87 %. Uma amostra do produto foi dissolvida em clorofórmio deuterado (100 %) e analisada por NMR de ^1H . Para análise por HPLC-MS, uma amostra foi dissolvida em ACN com 0,2 % de ácido fórmico e detectada no modo positivo de ionização por *electrospray* (ESI+), temperatura da fonte de 100 °C e cone em 20 V. Os sinais obtidos nos espectros de NMR de ^1H , ^{13}C e MS estão de acordo com o esperado pela estrutura da molécula (Anexo V).

3.3.3.2 Amidificação

Essa síntese foi realizada conforme descrito por Dewilde *et al.* (1998) com algumas modificações. Foram dissolvidos 5 g do NDPE (0,015 mol) em 100 mL de metanol em um balão de 250 mL, em seguida acrescentaram-se 10 g de 3-amino-1,2-propanodiol (0,11 mol). O sistema permaneceu em temperatura de refluxo por 24h.

Após essa etapa o metanol foi eliminado por roto-evaporação, o produto foi transferido para um béquer no qual foram adicionados 200 mL de acetona. O sistema permaneceu em geladeira por uma noite para melhor precipitação do produto. Após recuperação do sólido por filtração em funil de Büchner, foi feita sua recristalização em metanol.

Após a recristalização, o produto é um sólido levemente amarelo e com aspecto amorfo, não se formam cristais. Os rendimentos obtidos para as diversas preparações ficaram em torno de 47 a 51 %. O produto final foi caracterizado por NMR de ^1H e ^{13}C , sendo que nesse caso dois tipos de amostras foram preparadas para análise, uma dissolvida em água deuterada e uma dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado. Foi também caracterizado por HPLC-MS, sendo nesse caso dissolvida em água e ACN (1:1) com 0,2 % de ácido fórmico com as seguintes condições: modo ESI+, temperatura da fonte em $120\text{ }^\circ\text{C}$, capilar em 3,5 kV e cone em 10 V.

Os sinais obtidos no espectro de NMR de ^1H e ^{13}C e MS estão de acordo com o esperado pela estrutura da molécula (Anexo VI).

3.3.4 Preparação dos endoperóxidos dos derivados de naftaleno

3.3.4.1 Síntese do endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropionato de sódio

Uma vez obtido o derivado naftalênico, uma fonte primária de $^1\text{O}_2$ é necessária para preparar o endoperóxido correspondente. Nesse caso foi utilizado o método que emprega o desproporcionamento do peróxido de hidrogênio catalisado pelo molibdato (reação 9, seção 1.2.1.5.5.1):

Em um tubo para centrífuga contendo um agitador magnético foram colocados 10 mL de uma solução de 0,5 M de Na_2MoO_4 em tampão 0,1 M de $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ pH 10-11. Em seguida, foi acrescentado 1 g do NDP. O tubo permaneceu em banho de água com temperatura de $20\text{ }^\circ\text{C}$ durante todo o processo.

Sob agitação contínua, acrescentou-se 1 mL de H_2O_2 (35 % comercial) na solução, a qual ficou marrom avermelhada com liberação intensa de O_2 . Após 14 min a solução ficou amarelo-ouro e, então, acrescentou-se mais 1 mL de H_2O_2 . Essa operação foi repetida por mais quatro vezes, sendo que ao final da última adição a solução permaneceu agitando por 20 min, ao invés de 14 min como nas anteriores.

Após o término dos 20 minutos finais, o tubo foi resfriado em um banho de água e gelo, e 10 mL de H₃PO₄ 2 M foram acrescentados lentamente e sob agitação para precipitar a forma diácido do endoperóxido.

Em seguida, o sistema foi centrifugado a 7000 rpm, 4 °C, por 2 min. O sobrenadante, de coloração amarela, foi descartado. Acrescentaram-se 20 mL de água fria ao sólido, agitou-se por alguns minutos e centrifugou-se nas mesmas condições da anterior, descartando novamente o sobrenadante obtido. Seguiu-se o mesmo procedimento para lavar mais duas vezes o sólido com 20 mL de água fria.

O tubo, contendo o sólido obtido após todas as lavagens, foi colocado no gelo. Acrescentou-se lentamente e sob agitação NaOH 2 M até completa solubilização do precipitado. A solução obtida foi separada em frações que foram congeladas imediatamente a -80 °C.

Esse mesmo procedimento pode ser feito partindo-se diretamente do ANDP, porém nesse caso, deve-se adicionar uma quantidade estequiométrica de NaOH para possibilitar sua solubilização. O processo ocorre da mesma maneira e no final o endoperóxido é recuperado por precipitação com excesso de ácido.

3.3.4.2 Síntese do endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidropropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida

Para preparação do endoperóxido da DHPN foi utilizado o método fotoquímico convencional (reação 8, seção 1.2.1.5.5.1). Em 2 mL de água deuterada foram dissolvidos sob leve aquecimento 200 mg de DHPN. A reação se processou em um frasco com isolamento térmico que por meio de um banho, mantém a temperatura a 4 °C. Foram acrescentados 5 µL de uma solução de azul de metileno (10 mg/mL) e a solução foi irradiada com uma lâmpada de 500 W sob borbulho de oxigênio constante por 5 h.

Resina Chelex[®] 100 foi acrescentada e a solução foi agitada por 20 min a 4 °C até completa fixação do azul de metileno. A solução foi filtrada em uma membrana polimérica (0.45 µm) e estocada a -80 °C.

3.3.4.3 Preparação do endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidropropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida marcado com oxigênio-18

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram colocados 200 mg de DHPN, 3 mL de água deuterada, 300 μ L de uma solução de azul de metileno (5 mg/mL em D₂O) e uma barra para agitação magnética. Para completa dissolução da DHPN o sistema foi levemente aquecido, sendo em seguida resfriado em nitrogênio líquido e com uma bomba de sucção, o ar foi aspirado. Esse procedimento foi repetido 5 vezes. O ar dos dutos do sistema, como esquematizado na figura 3.3, também foi aspirado pela bomba.

A reação foi resfriada por um banho de gelo com temperatura sempre por volta de 4 °C e foi irradiada por uma lâmpada de 500 W sob pressão de 1,4 bar de ¹⁸O₂ por 4,5 h (Figura 3.3).

Após o período de reação, o sistema foi aberto e acrescentou-se resina Chelex[®] 100 suficiente para total absorção do azul de metileno. A solução foi agitada por 10 min a 4 °C e em seguida foi filtrada em uma membrana polimérica (0.45 μ m) e estocada a -80 °C.

Foram acrescentados mais 3 mL de D₂O à resina restante para recuperar possível quantidade de produto adsorvido na resina. As frações obtidas, após filtração, também foram estocadas a -80 °C.

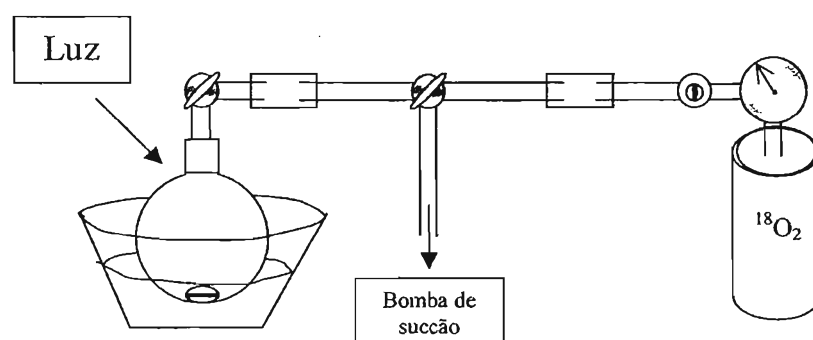


Figura 3.3 Esquema do sistema utilizado para síntese do DHPN¹⁸O₂

3.3.4.4 Análise dos endoperóxidos

A concentração dos endoperóxidos foi determinada por espectrofotometria no UV. Primeiramente, mediu-se a absorbância da solução a 288 nm, em seguida colocou-se a solução em um banho a 50 °C por duas horas e mediu-se novamente sua absorbância a 288 nm.

Esse comprimento de onda é o de absorção do anel naftalênico ($\epsilon=7780 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$). Portanto, no início espera-se que não haja absorção, pois teríamos 100 % de conversão em endoperóxido. Depois do tempo em banho aquecido, mede-se a absorção do anel naftalênico, pois o endoperóxido foi destruído (Pierlot *et al.*, 2000a).

Para análise dos endoperóxidos NDPO₂ e DHPNO₂ por HPLC-MS foi feita uma separação por HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 2,1 mm, 5 μm) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 0,18 mL/min e um gradiente partindo de 15 % de ACN em solução 10 mM de formiato de amônio, indo para 30 % ACN em 20 min, 60 % ACN em 25 min e voltando para 15 % em 30 min. Para o NDPO₂ a análise foi feita no modo ESI- e para o DHPNO₂ no modo ESI+, ambos usando cone em 10 V e temperatura da fonte de 120 °C.

Uma amostra do DHPN¹⁸O₂ foi separada por HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. A coluna usada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 0,8 mL/min de forma isocrática com fase móvel constituída por 15 % ACN e 85 % água. Após o detector UV, uma parte do fluxo (0,22 mL/min) era desviada para o espectrômetro de massas para análise no modo ESI+ com temperatura da fonte de 80 °C e diferentes potenciais do cone na faixa de 5 a 20 V.

3.3.5 Termólise de endoperóxidos e detecção de luminescência no infravermelho

Foi acompanhada a emissão de luz da transição monomolecular ($\lambda = 1270 \text{ nm}$) do ¹O₂ para as termólises dos endoperóxidos preparados. As cinéticas de termólise do NDPO₂ foram obtidas durante a incubação da solução 10 mM do endoperóxido a 30, 35, 45, 50 °C. As cinéticas de termólise do DHPNO₂ foram obtidas durante a incubação da solução 10 mM do endoperóxido a 40 °C. A supressão por azida foi obtida injetando-se 0,4 mL de uma solução 0,1M de NaN₃ no máximo de luminescência. O espectro do sistema de H₂O₂ e MoO₄²⁻ foi obtido após adição de 0,1 mL de uma solução 35 % de H₂O₂ em 2 mL de uma solução 0,25 M de MoO₄²⁻ em tampão 0,05 M Na₂CO₃ / NaHCO₃ pH 10-11 contendo 50 %

de D₂O. Os espectros de emissão de DHPNO₂ e NDPO₂ foram obtidos durante a incubação da solução 10 mM do endoperóxido a 40 °C.

3.3.6 Detecção do oxigênio singlete gerado por diferentes sistemas usando o captador químico EAS

3.3.6.1 Preparação do padrão de EASO₂

Como o produto de reação esperado para os diversos sistemas é o endoperóxido do EAS, foi preparado um padrão desse composto para ser utilizado nas análises. Para tanto, foram dissolvidos 10 mg de EAS em 6 mL de D₂O em banho de 5 °C, na presença de 15 µL de solução 10 mg/mL de azul de metileno e o sistema foi irradiado durante 2 h por uma lâmpada de 500 W e sob borbulho de oxigênio. O sensibilizador foi retirado com a utilização de resina Chelex[®] 100. A análise e purificação do EASO₂ obtido foram feitas usando HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 229 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco*, com fase móvel de 35 % metanol (MeOH) em solução 100 mM de formiato de amônio pH 7,3. O produto coletado foi seco, dissolvido em água e purificado novamente com fase móvel de 20 % MeOH e água.

3.3.6.2 Incubação do EAS com diversas fontes de oxigênio singlete

As incubações foram feitas em tampão fosfato 150 mM, pH 7,4 e em tampão acetato 150 mM, pH 5,4; usando para todos os sistemas a concentração inicial de EAS de 8 mM. A concentração de H₂O₂ foi determinada por medida de absorvância de luz UV usando o ϵ em $\lambda = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Radi *et al.*, 1991) e a concentração de hipoclorito foi determinada pelo método iodométrico.

3.3.6.2.1 Incubação com o DHPNO₂

DHPNO₂ foi adicionado para uma concentração final de 10 mM. Uma alíquota foi retirada e mantida em congelador e o sistema foi incubado por 2h a 40 °C. Como controle foram feitas incubações nas mesmas concentrações com DHPN proveniente da termólise do DHPNO₂.

3.3.6.2.2 Incubação com o DHPN¹⁸O₂

A incubação foi feita em água contendo 50 % de D₂O usando 5 mM DHPN¹⁸O₂ e 8 mM de EAS. O sistema foi aquecido por 2,5 h a 37 °C. Essa mesma incubação também foi feita borbulhando N₂ ou O₂ por 20 min no gelo antes do aquecimento a 37 °C por 2,5 h.

Para verificar o efeito da concentração do gerador de ¹⁸[¹O₂] foram preparadas soluções contendo 50 % de D₂O, 8 mM de EAS e diferentes concentrações do DHPN¹⁸O₂ (1; 5; 10; 15 e 20 mM).

Para verificar o efeito da D₂O foram preparadas soluções com 8 mM de EAS e 5 mM de DHPN¹⁸O₂ contendo 15, 30, 60, 90 ou 100 % de D₂O.

3.3.6.2.3 Incubação com o sistema H₂O₂ e OCl⁻

Nesse sistema, 6 alíquotas de 10 µL de cada uma das soluções 10 mM de OCl⁻ e 10 mM de H₂O₂ eram acrescentadas à solução tampão já contendo EAS de forma que a concentração final ficasse em 1 mM dos respectivos reagentes adicionados. Foram feitos controles com OCl⁻ e H₂O₂ separadamente usando as mesmas quantidades de forma que fossem mantidas as condições utilizadas anteriormente.

3.3.6.2.4 Incubação com o sistema ONOO⁻ e H₂O₂

Para esse experimento, uma solução de 138 mM de ONOO⁻ foi adicionada com um fluxo de 8 µL/min, controlado por uma bomba de infusão com seringa, à uma solução tampão contendo o EAS e 100 mM de H₂O₂, para concentração final de 1 ou 15 mM de ONOO⁻. Foram feitos os respectivos controles com (i) ONOO⁻, (ii) ONOO⁻ previamente decomposto na solução tampão e (iii) H₂O₂.

3.3.6.3 Detecção do EASO₂ gerado pelos diferentes sistemas

O EASO₂ gerado pelos diferentes sistemas foi separado e detectado usando o equipamento de HPLC com o detector de fotodiodos em série (PDA) e injetor automático. As amostras eram diluídas 1:10 e 30 µL eram injetados. A coluna usada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 1 mL/min por um gradiente linear partindo de 15 % ACN em solução 25 mM de formiato de amônio, indo a 17 % ACN em 8 min, permanecendo a 17 %

ACN até 12 min, retorno para 15 % ACN até 15 min e mais 5 min a 15 % ACN para estabilização da coluna, totalizando um tempo de corrida de 20 min.

3.3.6.4 Análise por espectrometria de massas do EAS, EASO₂ e EAS¹⁸O₂

Amostras do EAS, EASO₂ e EAS¹⁸O₂ foram analisadas por HPLC-MS usando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. As amostras eram diluídas 1:10 e 30 µL eram injetados. A coluna usada foi a LC-18-S (250 x 2,1 mm, 5 µm) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 0,15 mL/min por um gradiente linear partindo de 15 % ACN em solução 10 mM de formiato de amônio, indo a 17 % ACN em 8 min, permanecendo a 17 % ACN até 12 min, indo a 70 % ACN em 14 min, retorno para 15 % ACN até 18 min e mais 7 min a 15 % ACN para estabilização da coluna, totalizando um tempo de corrida de 25 min. As análises por MS foram feitas no modo ESI- com temperatura da fonte de 100 °C e potencial do capilar em 3,0 kV. O potencial do cone foi variado entre 10 e 20 V.

3.3.7 Incubação dos endoperóxidos com 2'-desoxiguanosina

Para quantificação dos produtos de oxidação foram preparadas soluções contendo 1 mM de dGuo e diferentes concentrações dos endoperóxidos (0,5; 1; 5; 10 mM). Foram preparados dois tipos de controle: soluções que continham 1 mM de dGuo e 30 mM dos endoperóxidos dos derivados de naftaleno de NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos e uma solução contendo apenas 1 mM de dGuo. Todas soluções foram incubadas a 37 °C por 2,5 h.

Para caracterização dos produtos por espectrometria de massas foram preparadas soluções contendo 5 mM de dGuo e incubadas com 20 mM de DHPNO₂ termodecomposto, DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂ a 37 °C por 2,5 h.

3.3.7.1 Quantificação dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados na incubação com os endoperóxidos NDPO₂ e DHPNO₂

3.3.7.1.1 Detecção da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo foram feitas por HPLC como descrito por Shigenaga (1990) usando o detector eletroquímico Antec Decade a

um potencial de +600 mV, acoplado ao equipamento de HPLC com o injetor automático e detector UV programado para detecção da dGuo em comprimento de onda de 254 nm.

A coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) da *Supelco*. A separação foi feita com fluxo de 1 mL/min de forma isocrática para os padrões (tempo total de corrida de 15 min) com fase móvel constituída por 10 % MeOH em solução 50 mM de fosfato de potássio monobásico pH 5,5. Para as amostras da incubação, a separação foi feita por um gradiente: 10 % MeOH em solução 50 mM de fosfato de potássio monobásico pH 5,5 por 12 min, indo a 60 % de MeOH até 20 min e retorno para 10 % de MeOH em 10 min, totalizando um tempo de corrida de 30 min para cada amostra. Esse gradiente deve ser usado para que o NDP e a DHPN não fiquem retidos na coluna e passem a eluir nas corridas subseqüentes.

Soluções de 8-oxodGuo e dGuo tiveram suas concentrações aferidas por medida no espectrofotômetro (ϵ da 8-oxodGuo em $\lambda = 293$ nm: $9700 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ e ϵ da dGuo em $\lambda = 254$ nm: $13000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$) e foram preparadas as soluções para serem utilizadas na curva de calibração. Foram injetadas amostras de 20 μ L de cada solução da incubação de dGuo com os endoperóxidos sem nenhum tratamento prévio.

3.3.7.1.2 Detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína

A detecção e quantificação dos diastereoisômeros da dSp foram feitas por HPLC como descrito por Ravanat *et al.* (1993) para os diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo usando o equipamento de HPLC com o injetor automático e detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 230 nm. A coluna usada foi a LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μ m) da *Supelco*. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 1 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 70 % de ACN em uma solução 25 mM de formiato de amônio.

A solução padrão dos diastereoisômeros da dSp foi obtida pela fotossensibilização da dGuo com azul de metileno (Ravanat e Cadet, 1995; Niles *et al.*, 2001). A reação se processou em um frasco com isolamento térmico que por meio de um banho, mantém a temperatura a 15 °C. Nesse frasco, 10 mL de solução 10 mM de dGuo contendo 15 μ L de uma solução 10 mg/mL de azul de

metileno foi irradiada com uma lâmpada de 500 W com filtro "cut-off" 590 nm, sob borbulho de oxigênio constante por 2 h.

A purificação dos diastereoisômeros da dSp foi feita por HPLC com o detector UV programado para detecção em 230 nm e coluna LC-NH₂ (250 x 10 mm, 10µm) da *Phenomenex*. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 4 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 70 % de ACN em uma solução 25 mM de formiato de amônio.

As frações coletadas, correspondentes aos diastereoisômeros da dSp, foram reunidas, liofilizadas e dissolvidas na fase móvel usada para sua separação. A concentração foi aferida por medida no espectrofotômetro usando, nesse caso, o coeficiente de extinção em $\lambda = 230 \text{ nm}$ ($5240 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$) publicado para os diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo (Ravanat e Cadet, 1995). Foram injetadas amostras de 20 µL de cada solução preparada como indicado a seguir: 100µL de cada solução da incubação da dGuo com os endoperóxidos foram liofilizadas e dissolvidas em 50 µL da fase móvel constituída por 70 % ACN em solução 25 mM de formiato de amônio.

3.3.7.2 Purificação e caracterização por espectrometria de massas dos produtos de oxidação gerados na incubação da 2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂

3.3.7.2.1 Purificação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por HPLC

O produto 8-oxodGuo foi purificado por HPLC com o detector PDA programado para detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm e coluna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco*. A separação foi feita usando fluxo de 0,8 mL/min com um gradiente linear partindo de 5 % MeOH em solução 25 mM de formiato de amônio e indo a 20 % MeOH em 20 min, depois para 50 % MeOH até 25 min e retorno para 5 % MeOH até 40 min.

3.3.7.2.2 Purificação dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína por HPLC

Os diastereoisômeros da dSp foram purificados por HPLC com o detector PDA programado para detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400

nm e coluna LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Supelco*. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 0,8 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 85 % de ACN em uma solução 25 mM de formiato de amônio.

3.3.7.2.3 Caracterização por espectrometria de massas dos produtos de oxidação gerados na incubação da 2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂

As frações coletadas de 8-oxodGuo ou dos diastereoisômeros da dSp foram analisadas no espectrômetro de massas no modo de ESI+, com as seguintes especificações: coluna LC-18 (50 x 1 mm, 3 μm) da *Phenomenex* e fase móvel constituída de 20 % ACN em solução aquosa 0,1 % de ácido fórmico para os diastereoisômeros da dSp e 50 % de ACN em solução aquosa 0,1 % de ácido fórmico para a 8-oxodGuo com fluxo de 15 μL/min, temperatura da fonte de 100 °C, potencial do cone em 15 e 30 V.

Para as amostras dos diastereoisômeros da dSp também foram feitas análises no modo ESI+ com detecção em *tandem* (MS/MS) na função de íons filhos, sendo que no primeiro analisador (MS1) foi selecionado o íon de interesse ($m/z = 184, 186$ ou 188) sob as mesmas condições de ionização, descritas acima. Na câmara de colisão a energia foi acertada para 26 eV e a pressão de argônio em $5,5 \cdot 10^{-4}$ mBar e os espectros foram adquiridos no segundo analisador (MS2).

3.3.8 Incubação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO₂ e DHPN¹⁸O₂

Foram preparadas soluções contendo 2 mM de 8-oxodGuo e o 10 mM do endoperóxido DHPNO₂, DHPNO₂ termodecomposto ou DHPN¹⁸O₂ em água deuterada e incubadas a 37 °C por 2,5 h.

3.3.8.1 Separação por HPLC e caracterização por espectrometria de massas dos produtos gerados na incubação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina com os endoperóxidos DHPNO₂ e DHPN¹⁸O₂

Os produtos foram separados por HPLC com detecção por UV em comprimento de onda de 230 nm e coluna LC-18-S (250 x 2,1 mm, 5 μm) da *Supelco* com fluxo de 0,18 mL/min. A separação foi feita com um gradiente linear

partindo de 1 % ACN e 99 % água e indo a 5 % ACN em 15 min e 5 a 60 % ACN até 25 min e retorno para 1 % ACN até 35 min. As análises no espectrômetro de massas foram feitas no modo ESI+ com temperatura da fonte em 120 °C. O potencial do cone foi fixado em 60 V e foram adquiridos espectros no MS1 na faixa de 50 a 400 m/z. Uma outra função foi utilizada, conhecida como perda neutra, possui a característica de detectar íons que sofreram perda de um fragmento sem carga. Nesse caso, utilizou-se a câmara de colisão com pressão de argônio em torno de $6 \cdot 10^{-4}$ mBar e energia de colisão de 10 eV para detectar íons que sofreram perda de um fragmento sem carga de 116 u.m.a., espectros foram adquiridos no MS2 na faixa de 117 a 400 m/z.

3.3.8.2 Purificação e caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína

Os diastereoisômeros da dSp foram purificados por HPLC com o detector PDA programado para detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm e coluna LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco*. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 0,8 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 85 % de ACN em uma solução 25 mM de formiato de amônio.

As amostras purificadas foram injetadas numa coluna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco* com fase móvel constituída de 10% ACN em água com fluxo de 0,6 mL/min. Após o detector UV, uma parte do fluxo (75 µL/min) era desviada para o espectrômetro de massas para análise no modo ESI+ com temperatura da fonte de 120 °C, potencial do cone em 60 V, com detecção em *tandem* (MS/MS) na função de íons filhos, sendo que no primeiro analisador (MS1) foi selecionado o íon de interesse ($m/z = 184$ ou 186), na câmara de colisão a energia foi acertada para 26 eV e a pressão de argônio em $2 \cdot 10^{-4}$ mBar e os espectros foram adquiridos no segundo analisador (MS2).

3.3.8.3 Purificação e caracterização da guanidinohidantoína oxidada

O produto dGh^{ox} foi purificado por HPLC com o detector PDA programado para detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm. Na primeira etapa da purificação, a coluna usada foi a LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco* com fluxo de 0,6 mL/min. A separação foi feita com um gradiente linear partindo

de 1 % ACN e 99 % água a 5 % ACN em 15 min e indo a 60 % ACN até 25 min e retorno para 1 % ACN até 35 min. Foi coletado o eluente do intervalo de tempo entre 7 e 15 min. Em seguida, as frações coletadas foram reunidas e liofilizadas. Então, a segunda separação foi feita usando a coluna LC-NH₂ (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Supelco*. A separação foi feita de forma isocrática com fluxo de 0,8 mL/min, sendo a fase móvel constituída por 85 % de ACN em uma solução 25 mM formiato de amônio.

As frações coletadas de dGh^{ox} foram reunidas, liofilizadas, dissolvidas em água e injetadas no equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 230 nm. A detecção no espectrômetro de massas foi feita no modo ESI+ e ESI-, com temperatura da fonte em 120 °C e potencial do cone fixado em 60 V. Para as análises no modo MS/MS, foi selecionado o íon de interesse no MS1 e utilizou-se pressão de argônio em 7.10⁻⁴ mBar na câmara de colisão e energia de colisão de 30 eV.

Para separação foi usada a coluna LC-18-S (250 x 2,1 mm, 5 μm) da *Supelco* e um gradiente linear partindo de 1 % ACN e 99 % água a 5 % ACN em 15 min e indo a 60 % ACN até 25 min e retorno para 1 % ACN até 35 min.

Em particular, para análise no modo positivo foi usado fluxo de fase móvel de 0,18 mL/min e o potencial do capilar em 3,5 kV; e para o modo negativo as análises foram feitas com fluxo de fase móvel de 0,2 mL/min e o potencial do capilar em 3,0 kV.

3.3.9 Síntese da 8-bromo-2'-desoxiguanosina

A 8-bromo-2'-desoxiguanosina (8-BrdGuo) é um produto intermediário para a síntese da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina (8-MeOdGuo) conforme ilustrado na figura 3.4.

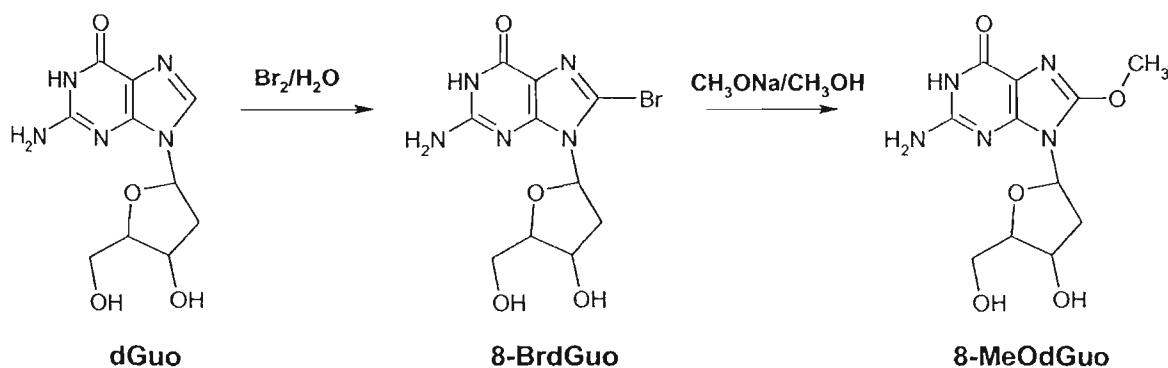


Figura 3.4 Rota adotada para síntese da 8-MeOdGuo.

O procedimento adotado foi baseado nos trabalhos de Sheu e Foote (1995b) e Ravanat (1992) com algumas modificações. Dissolveram-se 3 g de dGuo (0,0112 mol) em 80 mL de água, em seguida foram adicionados 20 mL de água saturada de Br_2 em alíquotas de 2 mL sob agitação, foi feita checagem do pH, uma vez que este deveria ficar em torno de 7. A seguir foram adicionados 800 μL de Br_2 em alíquotas de 100 μL , após 15 min de cada adição o pH era neutralizado com NaOH 2,5 M e aguardavam-se mais 15 min para a próxima adição. Ao término das adições foi acrescentado 2,5 mL de uma solução 2 M de bissulfito de sódio. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com água fria e acetona fria.

Partindo-se de dGuo, obteve-se 8-BrdGuo com rendimento de 51 %. O produto obtido foi analisado usando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 260 nm. A coluna usada foi a LC-18-S (250 x 2,1 mm 5 μm) da *Supelco* com fluxo de 0,15 mL/min. A separação foi feita de modo isocrático com fase móvel constituída de 10 % ACN e 90 % água. As análises de MS foram feitas no modo ESI+, com temperatura da fonte em 100 °C e potencial do cone em 30 V.

Os resultados obtidos para as análises confirmam a estrutura esperada (Anexo VII).

3.3.10 Síntese da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina

O procedimento adotado foi baseado no trabalho de Luo *et al.* (2001b) com algumas modificações. Em um balão de 500 mL com 3 bocas equipado com

condensador de refluxo e funil de adição, dissolveram-se 2,2 g da 8-BrdGuo (6,34 mmol) em 50 mL de metanol seco, e sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados, gota a gota, 30 mL de uma solução 3,5 M de metanolato de sódio em metanol. O sistema foi mantido em refluxo sob atmosfera de nitrogênio por 26 h. A mistura foi resfriada em banho de gelo e água e foi adicionada uma solução 2 M de HCl até a neutralização. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o material foi dissolvido em 100 mL de água para purificação.

A solução obtida foi analisada usando o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 260 nm. A coluna usada foi a LC-18-S (250 x 2,1 mm, 5 μ m) da Supelco com fluxo de 0,15 mL/min. A separação foi feita de modo isocrático com fase móvel constituída de 8 % ACN e 92 % água. As análises de MS foram feitas no modo ESI+, com temperatura da fonte em 100 °C e potencial do cone em 20 V.

A purificação foi feita utilizando-se colunas de extração em fase sólida LC-18 da *Supelco*. Para tal, um volume 700 μ L de amostra foram aplicados na coluna e a eluição dos produtos foi feita com a seguinte seqüência de solventes: 5 mL de água, 5 mL de MeOH 5 %, 12 mL de MeOH 10 %, 5 mL de ACN 7 % duas vezes, 5 mL de MeOH 100 %, 5 mL de água. As frações eluidas com 7 % de ACN foram liofilizadas.

Partindo-se de 8-BrdGuo com pureza aproximada de 90 % (HPLC, λ = 260 nm) obteve-se a 8-MeOdGuo com rendimento de 40 %. Após purificação obteve-se pureza aproximada de 98 % (HPLC, λ = 260 nm). Além disso, os resultados obtidos para as análises confirmam a estrutura esperada (Anexo VIII).

3.3.11 Incubação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂

Uma solução 10 mM de 8-MeOdGuo foi incubada com 30 mM de DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂ em água a 37 °C por 2,5 h. Em ambos os casos foram feitos os controles com 10 mM do DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂ termodecompostos.

3.3.11.1 Separação por HPLC e caracterização por MS dos produtos gerados na incubação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO₂ e DHPN¹⁸O₂

As amostras foram injetadas no equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 260 nm. A detecção no

espectrômetro de massas foi feita no modo ESI+, com temperatura da fonte em 120 °C, potencial do cone em 20 V e energia de colisão em 20 eV. Para separação foi usada a coluna LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco* e um gradiente linear partindo de 2 % ACN em solução 10 mM de formiato de amônio por 5 min e indo a 20 % ACN até 30 min, 60 % até 32 min, permanecendo nessa concentração até 35 min e retorno para 2 % ACN até 37 min com fluxo de fase móvel de 0,6 mL/min, sendo que após o detector UV uma parte do fluxo (0,3 mL/min) era desviado para o espectrômetro de massas.

3.3.12 Preparação de oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina

3.3.12.1 Princípios gerais da síntese de oligonucleotídeos

A preparação de oligonucleotídeos contendo lesões específicas em posições pré-determinadas pode ser feita pela síntese química.

A síntese de um fragmento de DNA envolve a ligação da função álcool secundária (3'-OH) da 2'-desoxirribose do primeiro nucleosídeo e a função álcool primária (5'-OH) da 2'-desoxirribose do segundo nucleosídeo, os quais devem ser introduzidos seguindo a seqüência correta e desejada. Para tanto, os demais grupos presentes nos nucleosídeos devem estar devidamente protegidos, pois caso contrário, os grupos aminoexocíclicos presentes nas bases A, C e G poderiam reagir com as hidroxilas da 2'-desoxirribose ou com os grupamentos fosfato, produzindo ramificações na cadeia de DNA e conseqüentemente estruturas não-naturais e indesejadas.

Em geral, o monômero do nucleosídeo a ser utilizado na síntese de oligonucleotídeos apresenta três grupos protetores, P1 na posição 5'-OH, P2 na posição 3'-OH e P3 no grupo aminoexocíclico a base.

A proteção P1 é destinada a evitar uma autopolimerização dos monômeros durante a etapa de condensação. Essa proteção deve ser eliminada a cada ciclo permitindo o acréscimo de uma nova unidade nucleotídica. A estratégia de proteção (Schaller *et al.*, 1963) da função álcool primária 5'-OH é sob a forma de éter de um derivado tritílico, o 4,4'-dimetoxitritil (DMTr). Esse grupo é lábil em meio ácido, enquanto os demais grupos protetores, P2 e P3, são lábeis em meio

alcalino, sendo possível removê-lo unicamente e preparando o oligonucleotídeo para o recebimento do próximo monômero. Além disso, esse grupo possui outras características interessantes: seu alto impedimento estérico o torna seletivo sobre a função álcool primária 5'-OH e confere lipofilicidade ao nucleosídeo, permitindo sua solubilização em solventes orgânicos utilizados na síntese. Além disso, o cátion DMTr⁺ liberado a cada ciclo de condensação durante a hidrólise ácida permite a monitoração do rendimento de acoplamento internucleotídica através de detecção condutométrica ou colorimétrica a 500 nm.

A proteção P2 é destinada a possibilitar o acoplamento do grupo 3'-OH ao grupo 5'-OH de outro nucleosídeo através da formação da ponte diéster fosfato. Para tal finalidade, derivados de fosforamidita têm sido empregados (Adams *et al.*, 1983; McBride *et al.*, 1983; Sinha *et al.*, 1983).

Na reação de acoplamento, o fósforo trivalente, previamente ativado por um ácido fraco como tetrazol, reage com a função 5'-OH do nucleosídeo precedente produzindo uma ligação do tipo fosfito-triéster. A forma trivalente do fósforo é instável e então ele é oxidado à forma triéster fosfato pentavalente. Durante a oxidação o grupo diisopropilamino é perdido, mas o grupo β-cianoetila permanece, sendo necessária sua desproteção após a síntese (Figura 3.5).

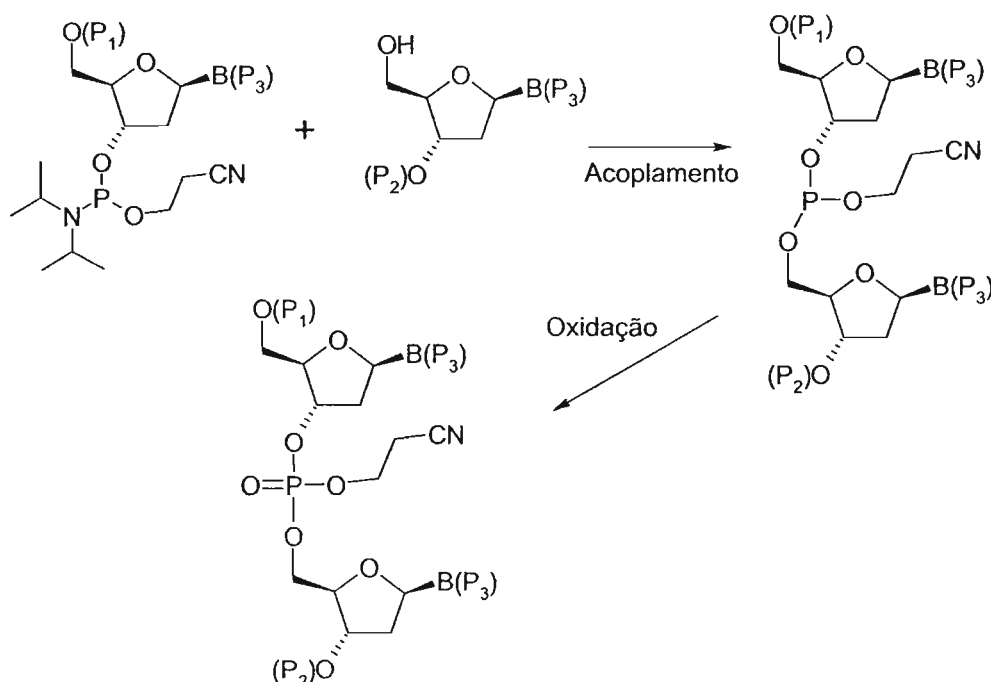


Figura 3.5 Reação de acoplamento utilizando monômero de fosforamidita.

As bases A, C e G requerem uma proteção que permaneça durante todo o processo da síntese dos oligonucleotídeos. A maioria dos grupos protetores utilizados para bloquear as funções aminoexocíclicas é do tipo amida. O derivados do ácido benzóico e do ácido isobutírico são os mais amplamente empregados.

O primeiro nucleosídeo é imobilizado em suporte sólido insolúvel. Os nucleosídeos seguintes são adicionados seqüencialmente e a cada ciclo são feitas lavagens para eliminar o excesso dos reagentes utilizados. Essa técnica dispensa purificações intermediárias e possibilita a síntese em pequena escala, com rapidez e facilidade de manipulação.

As microesferas de vidro são os suportes mais utilizados. Existem vários tamanhos de poros e tipos de espaçadores, os quais são longas cadeias bifuncionalizadas com ligações amida e éster entre o suporte e a função 3'-OH do nucleosídeo terminal que podem ser clivadas em pHs altos.

O ciclo completo para a adição de cada novo nucleotídeo ao oligonucleotídeo compreende quatro etapas: detritilação, condensação, *capping* e oxidação. O nucleosídeo terminal da seqüência é fixado por seu grupo 3'-OH ao suporte sólido através de um espaçador. O grupo DMTr desse nucleosídeo terminal é retirado pelo tratamento com ácido, liberando sua função álcool primária 5'-OH. Em seguida é adicionado o segundo nucleosídeo previamente ativado por tetrazol e ocorre a reação de acoplamento. Como a reação não é quantitativa, para evitar que sejam formadas seqüências truncadas, os grupos hidroxilas livres remanescentes são acetilados na etapa conhecida por *capping* por um forte agente acetilante, o *N*-acetildimetilaminopiridínio. E para completar o ciclo é feita a oxidação do grupo triéster fosfito por meio de uma solução de iodo em tetrafurano com água como doadora de oxigênio (Figura 3.6).

A condição padrão para a desproteção dos oligonucleotídeos é um tratamento com amônia concentrada à temperatura ambiente ou com aquecimento, dependendo da estabilidade dos grupos protetores dos grupos aminoexocíclicos. O grupo DMTr terminal é geralmente conservado no fim da síntese (modo *trityl-on*), pois a hidrofobicidade que ele confere ao oligonucleotídeo, facilita sua purificação por HPLC. Após purificação o grupo tritila pode ser removido por tratamento ácido.

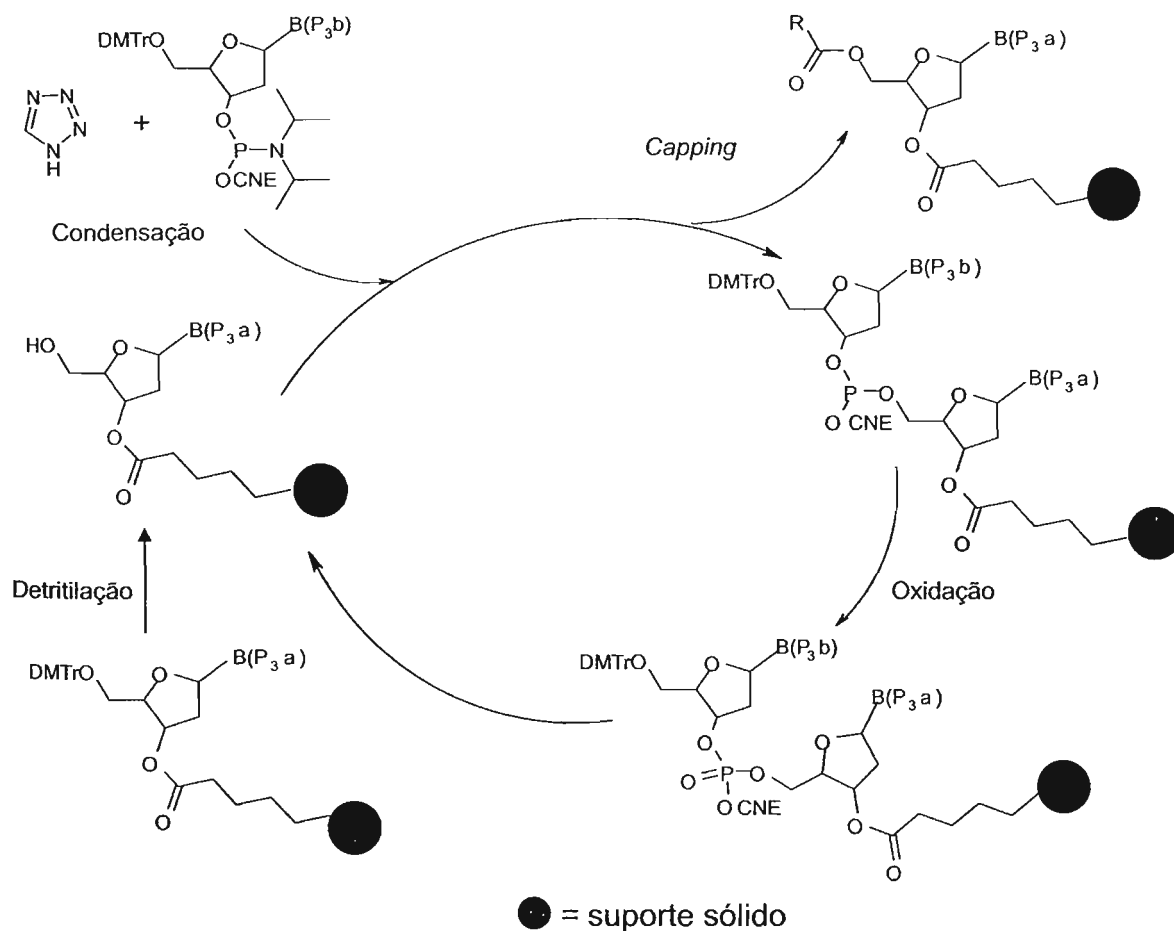


Figura 3.6 Ciclo de condensação pelo método da fosforamidita.

3.3.12.2 Preparação do sinton fosforamidita da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina para síntese de oligonucleotídeo

Os procedimentos de síntese dos intermediários foram feitos conforme descrito por Kohda *et al.* (1996) e Gasparutto *et al.* (2000a) com pequenas modificações. Um esquema da rota adotada está ilustrado na figura 3.7.

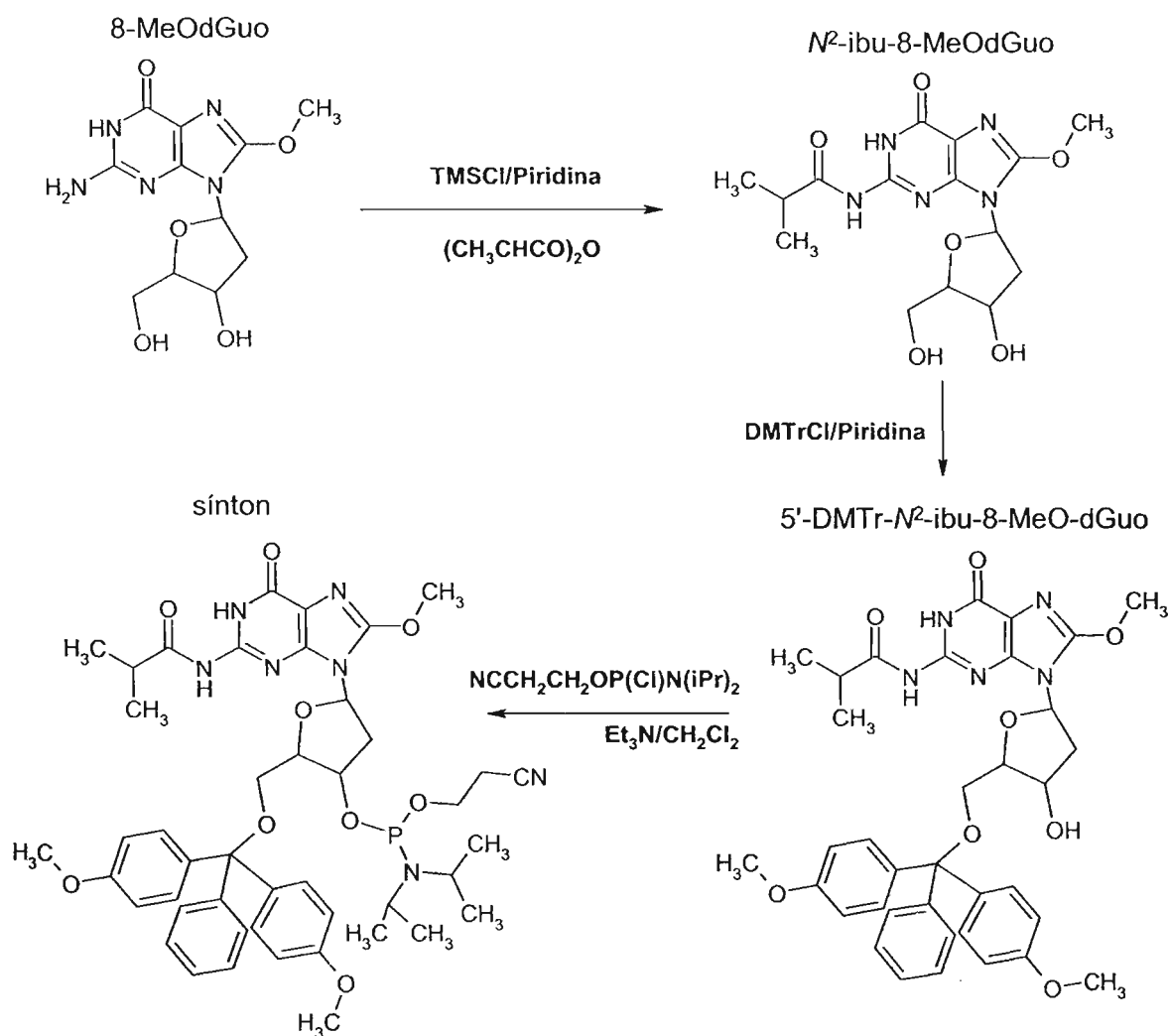


Figura 3.7 Rota de preparação do sínton fosforamidita da 8-MeOdGuo.

3.3.12.2.1 Síntese da N^2 -isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina

Depois de coevaporar 100 mg de 8-MeOdGuo (0,337 mmol) em piridina seca por duas vezes, o sólido foi dissolvido em 3,6 mL de piridina seca sob atmosfera de argônio. Então, sob agitação e em um banho de gelo e água foi adicionado 0,25 mL de clorotrimetilsilano (1,98 mmol) e a mistura foi mantida sob essas condições por 30 min. Após esse tempo, foi adicionado 0,3 mL de anidrido do ácido isobutírico (1,77 mmol) e a mistura permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 2 h. Depois a mistura foi resfriada novamente por um banho de gelo e água e foram adicionados 0,75 mL de água e 0,75 mL de solução de amônia 40 %, a mistura permaneceu sob agitação por 30 min. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido resultante foi dissolvido em 5 mL de

água, e lavado três vezes com 10 mL de éter etílico. A fração aquosa foi reduzida pela metade e permaneceu a 4 °C por uma noite. O precipitado obtido foi recuperado e foram feitas análises de UV, HPLC, MS e NMR.

Para análise de HPLC utilizou-se o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 260 nm. A coluna usada foi a Hypersyl LC-18 (250 x 4 mm, 5 µm) da *Interchim* com fluxo de 1 mL/min. A separação foi feita com um gradiente linear de 0 a 20 % ACN e água em 35 minutos. As análises de MS foram feitas no modo ESI+ e ESI-, com analisador por captura de íons.

O rendimento dessa etapa ficou em torno de 90 % para as diversas vezes que foi efetuada. No cromatograma do sólido obtido praticamente havia somente o produto (*N*²-ibu-8-MeOdGuo) e os resultados das análises por MS e NMR confirmaram a estrutura esperada (Anexo IX).

3.3.12.2 Síntese da 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-*N*²-isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina

Depois de coevaporar 320 mg de *N*²-ibu-8-MeOdGuo (0,872 mmol) em 6 mL de piridina seca por duas vezes, o sólido foi dissolvido em 6 mL de piridina seca sob atmosfera de argônio. Então, sob agitação e à temperatura ambiente foram adicionados: 373 mg de cloro-4-4'-dimetoxitritila (1,05 mmol), 170 µL de trietilamina (1,22 mmol) e 5,4 mg de 4-dimetilaminopiridina (0,044 mmol) e a mistura foi mantida sob essas condições por 20 h. Após esse tempo foram adicionados 5 mL de metanol e 5 mL de água. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o sólido resultante foi dissolvido em 15 mL de água, e lavado três vezes com 30 mL de acetato de etila. A fração orgânica foi seca sob pressão reduzida e o sólido foi purificado por coluna de sílica.

Para purificação, o sólido foi dissolvido em diclorometano contendo 0,5 % de trietilamina utilizou-se uma coluna de 4 x 30 cm e 50 g de sílica, de granulometria de 63-200 µm foi feito um gradiente de 0 a 5 % de metanol em diclorometano contendo 0,5 % de trietilamina passando um volume de 400 mL de cada e aumentando a concentração de 1 %. A separação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (TLC), utilizando-se fase CH₂Cl₂:MeOH (19:1),

a fração principal foi seca e o precipitado obtido foi analisado por UV, HPLC, MS e NMR.

Para análise de HPLC utilizou-se o equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda de 260 nm. A coluna usada foi a Hypersyl LC-18 (250 x 4 mm, 5 μ m) da *Interchim* com fluxo de 1 mL/min. A separação foi feita com um gradiente linear de 5 a 70 % de ACN em água em 35 minutos. As análises de MS foram feitas no modo ESI+ e ESI-, com analisador por captura de íons.

O rendimento dessa etapa ficou em torno de 60 % para as diversas vezes que foi efetuada. No cromatograma da fração obtida após purificação na coluna de sílica havia praticamente o produto esperado (5'-DMTr-*N*²-ibu-8-MeO-dGuo) e os resultados das análises por MS e NMR confirmaram a estrutura esperada (Anexo X).

3.3.12.2.3 Síntese da 3'-O-[(2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino]-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-*N*²-isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina

Depois de coevaporar 276 mg de 5'-DMTr-*N*²-ibu-8-MeO-dGuo (0,413 mmol) em 6 mL de diclorometano seco contendo 0,5 % de trietilamina por duas vezes, o sólido foi dissolvido em 2,6 mL de diclorometano seco contendo 0,5 % de trietilamina sob atmosfera de argônio. Então, sob agitação e à temperatura ambiente foram adicionados: 52 mg de *N,N*-diisopropilamina (0,403 mmol) e 136 μ L de 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita (0,61 mmol) e a mistura foi mantida sob essas condições por 1 h. A reação foi monitorada por TLC, utilizando-se fase CH₂Cl₂:MeOH (19:1). Após esse tempo foram adicionados 5 mL de metanol e 5 mL de água. Foi feita uma extração lavando três vezes com 30 mL de acetato de etila e uma solução de bicarbonato de sódio 5 %. A fração orgânica foi seca sob pressão reduzida. Para purificação utilizou-se uma coluna de 2 x 15 cm e 25 g de sílica, de granulometria de 63-200 μ m, que foi eluída com 4 volumes de 200 mL de uma mistura metanol e diclorometano de 0 a 3% como incremento de 1% em cada volume. A separação foi monitorada por TLC, utilizando-se fase CH₂Cl₂:MeOH (19:1).

O sinton da 8-MeOdGuo obtido era imediatamente dissolvido em acetonitrila e introduzido no sintetizador. O rendimento de acoplamento na síntese

do oligonucleotídeo usando o sinton preparado como descrito acima foi muito baixo (6 %), e a análise por espectrometria de massas não mostrou a presença de um íon correspondente ao produto esperado (embora na TLC se observava um produto com tempo de retenção maior que o material de partida).

Foi então feita uma nova preparação usando o seguinte procedimento: depois de coevaporar 160 mg de 5'-DMTr- N^2 -ibu-8-MeO-dGuo (0,24 mmol) em 6 mL de piridina seca por duas vezes, o sólido foi dissolvido em 6 mL de diclorometano seco sob atmosfera de argônio. Então, sob agitação e à temperatura ambiente foram adicionados: 21 mg de tetrazolato de diisopropilamônio (0,122 mmol) e 80 μ L de 2-cianoetil-*N,N,N,N*-tetraisopropildiamidita (0,27 mmol) e a mistura foi mantida sob essas condições por 2 h. A reação foi monitorada por TLC, utilizando-se fase CH_2Cl_2 :MeOH (19:1). Após esse tempo, foi adicionado acetato de etila e foi feita uma extração lavando três vezes com 30 mL de acetato de etila e uma solução de bicarbonato de sódio 5 %. A fração orgânica foi lavada com água, seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada sob pressão reduzida.

O acompanhamento por TLC antes e após a extração em acetato de etila e água, comparando com o sinton preparado anteriormente, mostrou que após a extração uma parte do produto era degradada. Esse resultado pode ser explicado pelo pH muito ácido (5,5) da água usada na extração que provocou a destruição de grande parte do primeiro sinton preparado. Naquele caso, ao término da reação, foi adicionada uma pequena quantidade de água diretamente do balão de reação, antes mesmo da extração com acetato de etila e solução de bicarbonato de sódio.

A banda correspondente ao produto na placa de TLC foi dissolvida em ACN para análise por MS no modo ESI+, com analisador por captura de íons e os sinais obtidos estão de acordo com a estrutura esperada (Anexo XI).

3.3.12.3 Síntese do oligonucleotídeo

A síntese foi feita em um sintetizador de DNA/RNA utilizando-se um ciclo de condensação adaptado à escala de 1 μ mol com uma única modificação, o tempo de reação de acoplamento na etapa referente à incorporação da base modificada foi estendido e, além disso, era feita uma dupla adição nesse passo.

Os rendimentos de acoplamento foram obtidos através da medição condutométrica do cátion DMTr⁺ liberado. O sinton de fosforamidita da timina foi dissolvido em acetonitrila e usado na concentração de 0,1 M.

Foi preparado o oligonucleotídeo contendo três nucleosídeos com a seqüência 5'→3', 2'-desoxitimidina:8-MeOdGuo:2'-desoxitimidina.

Ao final da síntese, as colunas foram secas com fluxo de argônio, seu conteúdo foi transferido para tubos de 1,5 mL e 1 mL de uma solução 40 % de amônia foi adicionado, as amostras foram mantidas a 50 °C por uma noite. Os solventes eram removidos sob pressão reduzida.

3.3.12.4 Análise e purificação do oligonucleotídeo preparado

O oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo (T_8-MeO_T) foi analisado e purificado usando o equipamento de HPLC com o detector PDA programado para detecção em comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm. A coluna usada foi a LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) da *Supelco* com fluxo de 1 mL/min. A separação foi feita com um gradiente linear de 0 a 13 % ACN em solução 10 mM de formiato de amônio por 20 min e retorno para condição inicial até 23 min. Foi coletado o eluente do intervalo de tempo entre 18 e 19 min. Em seguida, as frações coletadas foram reunidas e liofilizadas. A amostra do produto purificado foi injetada sob as mesmas condições de análise para verificar se restaram contaminantes, além disso foi feita análise por MS no modo ESI-, com temperatura da fonte de 100 °C e potencial do cone em 20 V.

3.3.13 Incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo com DHPNO₂

Uma solução de T_8-MeO_T (apresentando absorbância 0,65 AU em λ = 260 nm) foi incubada com 15 mM de DHPNO₂ em água a 37 °C por 2,5 h. Foram feitos os controles contendo o DHPNO₂ termodecomposto ou o oligonucleotídeo isolado.

3.3.13.1 Separação por HPLC e detecção por MS/MS dos produtos gerados na incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo com DHPNO₂

As amostras foram injetadas no equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção em comprimento de onda em 260 nm. Para separação

foi usada a coluna LC-18S (250 x 2,1 mm, 5 μ m) da *Supelco* e um gradiente linear de 0 a 13 % ACN em solução 10 mM de formiato de amônio por 20 min, 13-60 % até 22 min, permanecendo nessa condição até 27 min e retorno para condição inicial até 30 min com fluxo de fase móvel de 0,2 mL/min. A detecção no espectrômetro de massas foi feita no modo ESI- com temperatura da fonte de 120 °C e potencial do cone em 20 V ou 60 V.

3.3.14 Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete

Para a determinação das constantes de desativação total do $^1\text{O}_2$ (k_t) foi acompanhado o decaimento da luminescência da transição monomolecular do $^1\text{O}_2$ em função do tempo por um sistema que detecta diretamente sua presença. Nesse caso, foi utilizada a fotomultiplicadora de resposta rápida sensível na região do infravermelho com o monocromador em 1270 nm descrita na seção 3.2. O $^1\text{O}_2$ é gerado pela fotossensibilização da fenalenona com um laser de Nd:YAG com pulsos em 355 nm.

O método é baseado na relação de Stern-Volmer, a qual descreve o aumento da constante de velocidade de pseudo-primeira ordem ($k_{\text{obs}}=1/\tau_d$) pela adição de um supressor em um sistema homogêneo. Na prática, pelo decaimento exponencial da luminescência calcula-se o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ gerado pela fotossensibilização na ausência (τ) e na presença (τ_d) de diferentes concentrações do supressor e pelo coeficiente angular do gráfico de k_{obs} em função da concentração do supressor obtém-se o valor de k_t .

Todas as soluções foram preparadas em água deuterada e continham o fotossensibilizador fenalenona com absorbância 0,1 em $\lambda = 355$ nm. As concentrações dos supressores estudados variaram dentro de uma faixa na qual se observava a redução do tempo de vida do $^1\text{O}_2$, sendo que para supressores mais potentes são usadas concentrações baixas, e para supressores menos potentes concentrações maiores são necessárias para provocar a mesma redução no tempo de vida. Em todos os casos foram utilizadas pelo menos cinco concentrações diferentes em duplicata.

Foi escolhida a fenalenona por se tratar de um sensibilizador razoavelmente solúvel na maioria dos solventes e por apresentar um rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ próximo de 1 (Nonell e Braslavsky, 2000).

3.3.15 Incubação de DNA de timo de bezerro com os endoperóxidos NDPO₂ e DHPNO₂

Foram preparadas soluções contendo 1 mg/mL de DNA de timo de bezerro (DNA-TB) em água e diferentes concentrações dos endoperóxidos NDPO₂ ou DHPNO₂ (1; 5; 10 e 20 mM). Foram usados dois tipos de controle: uma solução que continha apenas DNA-TB e outra com DNA-TB e 30 mM do NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos. Todas soluções foram incubadas a 37 °C por 2,5 h.

3.3.16 Tratamento das células com os endoperóxidos

3.3.16.1 Avaliação da citotoxicidade dos derivados de naftaleno e respectivos endoperóxidos

Para realização desse ensaio foram utilizadas células de fibroblastos renais de macaco verde africano, linhagem CV1-P. Cerca de $5 \cdot 10^5$ células/mL (contagem realizada em câmara de Neubauer) foram colocadas em cada divisão de placas contendo 24 orifícios circulares com 15 mm de diâmetro. Em algumas divisões foram colocadas outras quantidades de células para construção de uma curva de calibração. As células foram incubadas por uma noite para aderência em meio modificado por Dulbecco (DME).

O meio foi retirado, as células foram lavadas com 500 µL de PBS-A (tampão fosfato salina - 137 mM NaCl, 1,68 mM KCl, 47 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) e foi acrescentado 1 mL de meio sem soro e NDP, DHPN, NDPO₂ ou DHPNO₂ para concentrações finais de 1 ou 5 mM. As células foram incubadas por 2, 3 e 5h. Após esse período, o meio com os compostos foi retirado e as células foram lavadas com PBS-A.

Em seguida, adicionou-se 1 mL de meio sem soro e 0,333 mL de solução 5 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) em PBS-A (método modificado de Hansen *et al.*, 1989). Após 3 h de incubação, 500 µL de meio foi retirado e foi adicionado 1 mL de solução 10 % de SDS em

dimetilformamida (DMF) e água (1:1) com pH 4,8. As células foram ressuspendidas e a absorbância foi medida no espectrofotômetro em 595 nm a 50°C. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.3.16.2 Tratamento das células com DHPNO₂ e NDPO₂

Células de fibroblastos CV1-P eram cultivadas em meio DME 10 g/L com adição de 1,2 g/L de NaHCO₃ e 10 % de soro fetal bovino. O meio de cultura continha 0,2 g/L de penicilina e 0,094 g/L de sulfato de estreptomicina. As culturas eram mantidas em atmosfera com 5 % de CO₂, a 37 °C, no escuro. Essas células crescem aderidas à superfície de garrafas plásticas de cultura e são repicadas quando ficam confluentes.

Para realização desse ensaio as células foram cultivadas em placas com 15 cm de diâmetro. Após ficarem confluentes (10⁶-10⁷ células), as células foram lavadas com PBS-A e foram acrescentados 15 mL de meio sem soro e quantidades dos endoperóxidos de modo a obter-se uma concentração final de 5 mM em cada placa. Como controles foram feitas incubações com NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos. O tempo de incubação foi de 2 h. Após o tempo de incubação, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS-A e raspadas das placas. O conteúdo de três placas foi reunido e ressuspendido em 2 mL de PBS-A, homogeneizado e centrifugado a 1500g x 10 min. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.3.16.3 Tratamento das células com DHPN¹⁸O₂

Foram utilizadas células de monócitos humanos, linhagem THP1 obtidas conforme descrito por Pouget *et al.* (1999). Antes do tratamento com o endoperóxido, as células eram recuperadas por centrifugação (250 g, 4 min) e lavadas duas vezes com PBS-A. Então cerca de 3.10⁷ células eram suspensas em 200 ou 400 µL de tampão PBS-A ao qual eram adicionadas diferentes quantidades de DHPN¹⁸O₂ (130 mM). Como controle era usado DHPN obtido pela termólise do endoperóxido por 40 min a 70 °C. A suspensão de células era incubada a 4 °C ou 37 °C por 1 h. Após incubação, as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas com 5 mL de tampão PBS-A para remover o excesso

de endoperóxido antes de fazer a extração do DNA. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.3.16.4 Extração do DNA das células

O método utilizado na extração de DNA foi o Nal-caotrópico modificado de Wang *et al.* (1994). Para $3 \cdot 10^7$ células foram adicionados 2 mL de tampão A (Sacarose 320 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris HCl 10 mM, desferroxamina 0,1m M, Triton X-100 1 %, pH 7,5), o sistema foi homogeneizado e centrifugado a $1500g \times 10$ min. Ao pellet coletado foram adicionados 600 μ L do tampão B (Tris HCl 10 mM, EDTA 5 mM, Desferroxamina 0,15 mM, pH 8), 35 μ L de SDS 10 %, 30 μ L de RNase A (1 mg/mL em tampão C – Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, desferroxamina 2,5 mM, pH 7,4) e 8 μ L de RNase T1 (1 U/ μ L em tampão C) e foi feita uma incubação a 37 °C por 1 h para digestão do RNA.

Posteriormente foram adicionados 40 μ L de proteinase K (20 mg/mL em água) e as amostras foram incubadas a 37 °C por 2 h para hidrólise das proteínas. As amostras foram centrifugadas a 5000 g por 15 min e ao sobrenadante coletado adicionou-se 1,2 mL de solução de Nal (Nal 7,6 M, Tris HCl 40 mM, EDTA 20 mM, desferroxamina 0,3 mM, pH 8,0) e 2 mL de isopropanol 100 % para a precipitação do DNA. Em seguida, o DNA foi submetido a lavagens sucessivas com isopropanol 60 % e etanol 70 % para retirada do excesso de Nal, centrifugando-se a 5000 g por 15 min em cada lavagem. Ao final, o DNA foi diluído em desferroxamina 0,1 mM.

A medida da concentração e pureza do DNA foi feita por espectrofotometria UV. A pureza foi calculada pela razão entre as absorbâncias em $\lambda = 260$ e 280 nm e a concentração calculada considerando a relação: 1 densidade óptica em $\lambda = 260$ nm equivale a 50 μ g de DNA/mL.

3.3.17 Digestão do DNA

Para cada 100 μ g de DNA-TB ou DNA extraído das células em cultura, adicionou-se tampão acetato de sódio 1 M pH 4,8 para concentração final de 20 mM e 10 U de Nuclease P1. O DNA foi incubado por 2 h a 37 °C. Para cada 1 mL de amostra, adicionaram-se 100 μ L de Tris.HCl 1 M pH 7,4 e 0,5 U de fosfatase alcalina e incubou-se novamente por 2 h a 37 °C. As amostras foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado cuidadosamente (modificado de Fiala *et al.*, 1989).

3.3.18 Quantificação da 8-oxodGuo gerada por $^1\text{O}_2$ em DNA de timo de bezerro ou em DNA de células em cultura

3.3.18.1 Análise de 8-oxodGuo gerada por $^1\text{O}_2$ em DNA de timo de bezerro e DNA de células de fibroblastos (detecção eletroquímica)

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo foram feitas por HPLC como descrito por Shigenaga (1990) usando o detector coulométrico ESA com potenciais de 0,12 e 0,28 V para os eletrodos 1 e 2, respectivamente, o qual era acoplado ao equipamento de HPLC com o detector UV programado para detecção da dGuo em comprimento de onda de 254 nm e coluna LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) da *Supelco* com fluxo de 0,8 mL/min.

Para as amostras de DNA extraído das células e para os padrões de 8-oxodGuo e dGuo a separação foi feita de forma isocrática, com fase móvel constituída por 8 % MeOH em solução 50 mM de fosfato de potássio monobásico pH 5,5 e para as amostras da incubação com DNA-TB, a separação foi feita por um gradiente: 8 % MeOH em solução 50 mM de fosfato de potássio monobásico pH 5,5 por 25 min, indo a 60 % de MeOH até 40 min, permanecendo em 60 % até 45 min e retorno para 8 % de MeOH em 10 min, totalizando um tempo de corrida de 55 min para cada amostra. Este gradiente deve ser usado para que o NDP e a DHPN não fiquem retidos na coluna e passem a eluir nas corridas subseqüentes. Foram injetadas amostras contendo cerca de 200 μg de DNA.

3.3.18.2 Análise de 8-oxodGuo gerada por $^1\text{O}_2$ em DNA de células de monócitos (detecção por HPLC-MS/MS)

As análises de 8-oxodGuo e ^{18}O -8-oxodGuo em DNA celular usando HPLC-MS/MS foram executadas pelo nosso colaborador Dr. Jean-Luc Ravanat do CEA-Grenoble (França). Para quantificação adicionou-se uma quantidade conhecida de 1,5 pmol de padrão interno, a 8-oxodGuo (M+5) isotopicamente marcada com os nitrogênios ^{15}N (Figura 3.8), antes de submeter a amostra à digestão enzimática. As amostras foram analisadas pelo equipamento de HPLC

com o detector UV programado para detecção dos nucleosídeos em comprimento de onda de 260 nm. A coluna usada foi a LC-18 (250 x 2 mm, 5 μ m) da *Interchim* com fluxo de 0,2 mL/min. A detecção no espectrômetro de massas foi feita no modo ESI+ monitorando as transições em m/z 284 \rightarrow 168, 286 \rightarrow 170 e 289 \rightarrow 173 para detecção de 8-oxodGuo (M), ^{18}O -8-oxodGuo (M+2) e 8-oxodGuo (M+5), respectivamente (Figura 3.8).

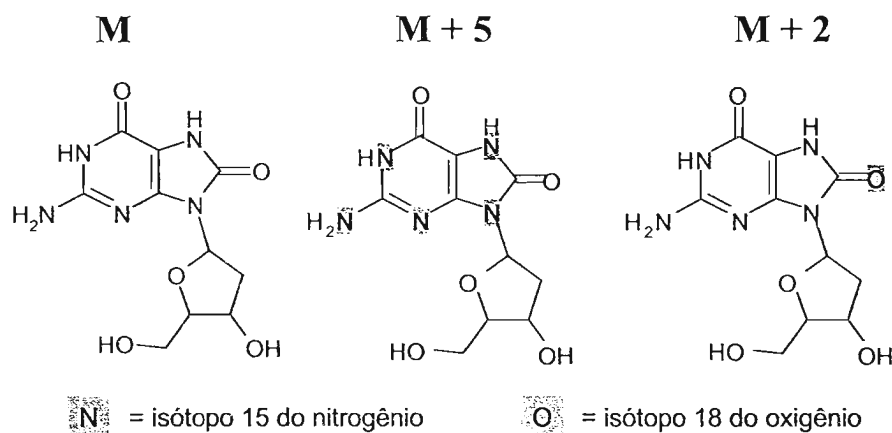


Figura 3.8 Estrutura da 8-oxodGuo (M), 8-oxodGuo (M+5) e ^{18}O -8-oxodGuo (M+2).

Resultados

4 Resultados

4.1 Caracterização dos endoperóxidos dos derivados do naftaleno

4.1.1 Endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio

Nessa preparação foi utilizado o desproporcionamento do H_2O_2 catalisado pelo molibdato como fonte de $^1\text{O}_2$ para reagir com o NDP. Uma etapa fundamental é a lavagem do produto com água para retirar completamente qualquer resíduo de água oxigenada e molibdato. Em geral, são obtidas soluções com concentração de 0,1 a 0,5 M contendo de 75 a 95% em endoperóxido independente se o composto de partida é o NDP ou o ANDP.

O espectro de massas obtido em modo ESI- (Figura 4.1) apresenta um sinal mais intenso e majoritário de valor 303 m/z , correspondendo à molécula de NDPO_2 sem os dois átomos de sódio e com um próton, e um sinal de valor 151 m/z , correspondendo à molécula de NDPO_2 sem os dois átomos de sódio, logo duplamente carregada.

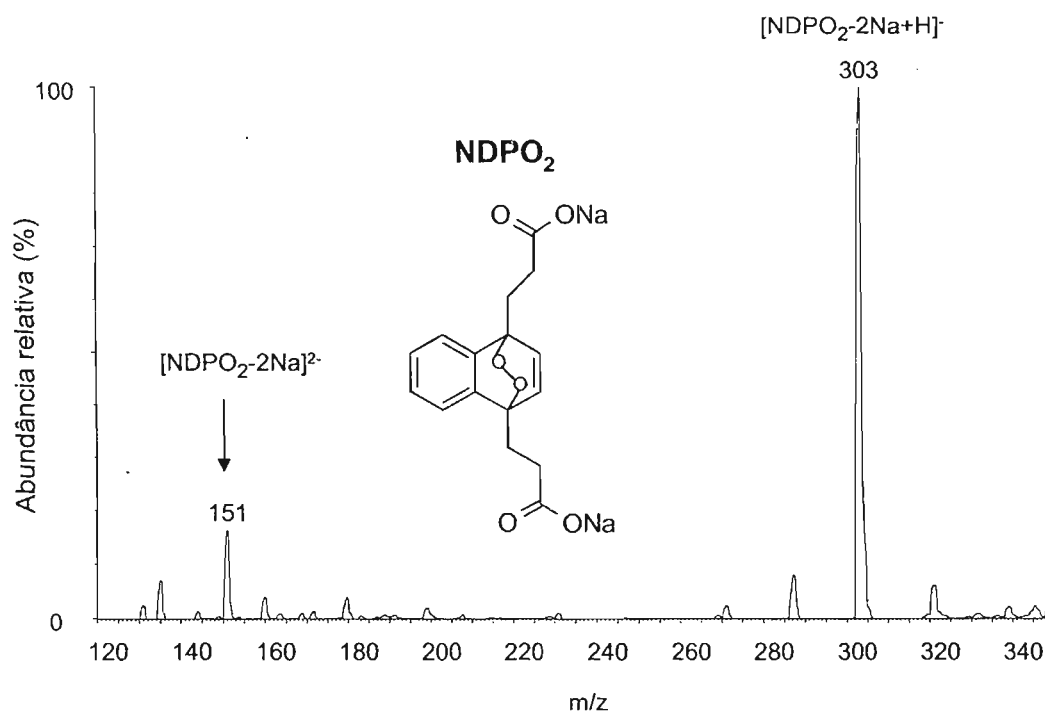


Figura 4.1 Espectro de massas do NDPO_2 dissolvido em água e detecção feita no modo ESI- com voltagem do cone de 10V.

4.1.2 Endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida

Para preparação do endoperóxido da DHPN foi utilizado o método fotoquímico convencional. Um cuidado especial nessa preparação é a retirada do azul de metileno pela resina, pois a temperatura deve ser mantida baixa para que o endoperóxido não seja destruído

A figura 4.2 mostra a cinética da termólise do endoperóxido DHPNO₂ a 37°C pelo monitoramento da absorção em 288 nm. A figura 4.3 mostra a sobreposição de espectros tirados ao longo do tempo, mostrando o surgimento da banda em 288 nm à medida que o endoperóxido é destruído.

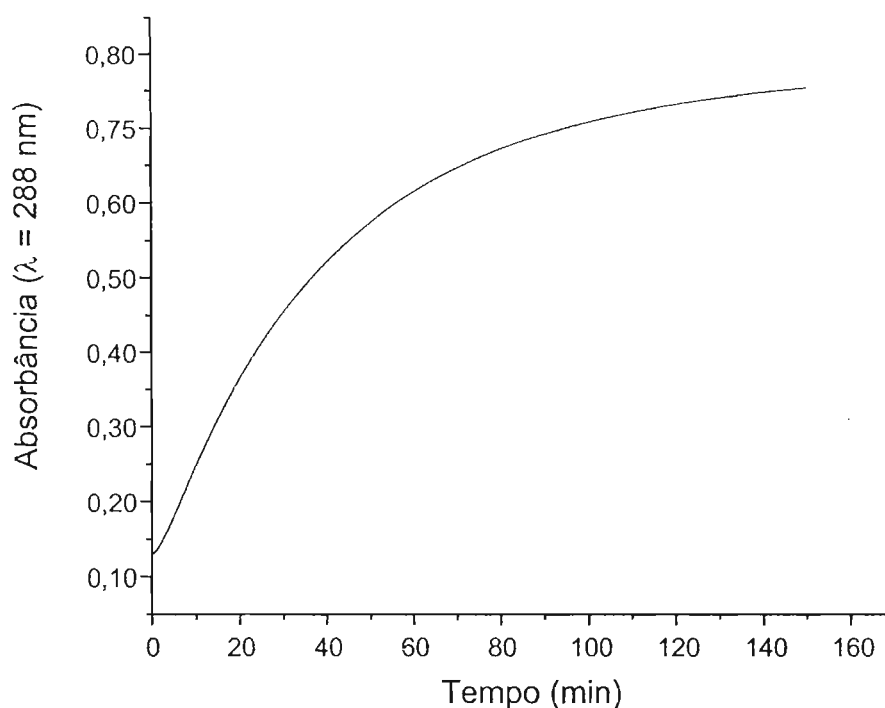


Figura 4.2 Cinética da termólise do endoperóxido DHPNO₂ a 37 °C monitorando a absorção em 288nm.

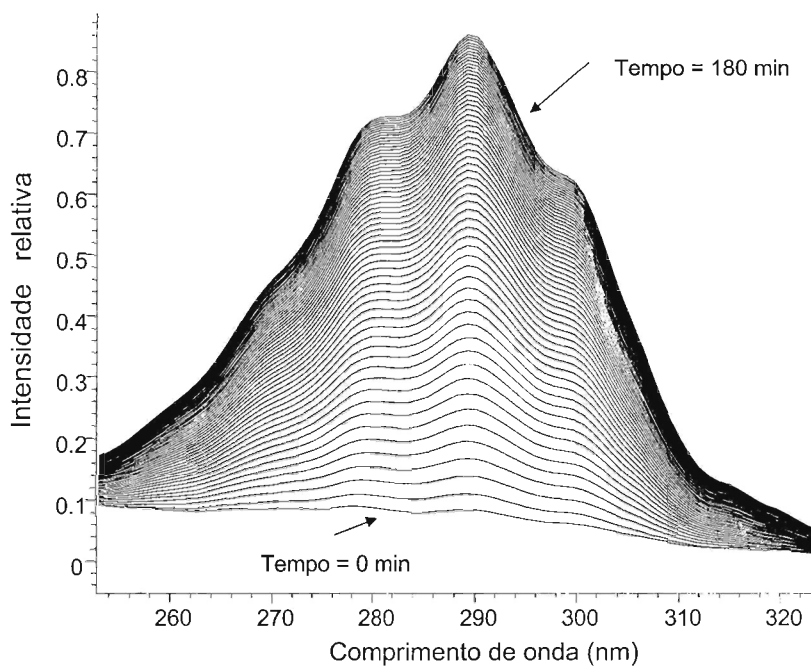


Figura 4.3 Sobreposição de espectros mostrando o surgimento da banda em 288nm à medida que o endoperóxido é destruído.

O espectro de massas obtido em modo ESI+ (Figura 4.4) apresenta dois sinais característicos, sendo o sinal em 451 m/z correspondente ao DHPNO₂ com um próton e o sinal 468 m/z correspondente ao DHPNO₂ com um íon amônio.

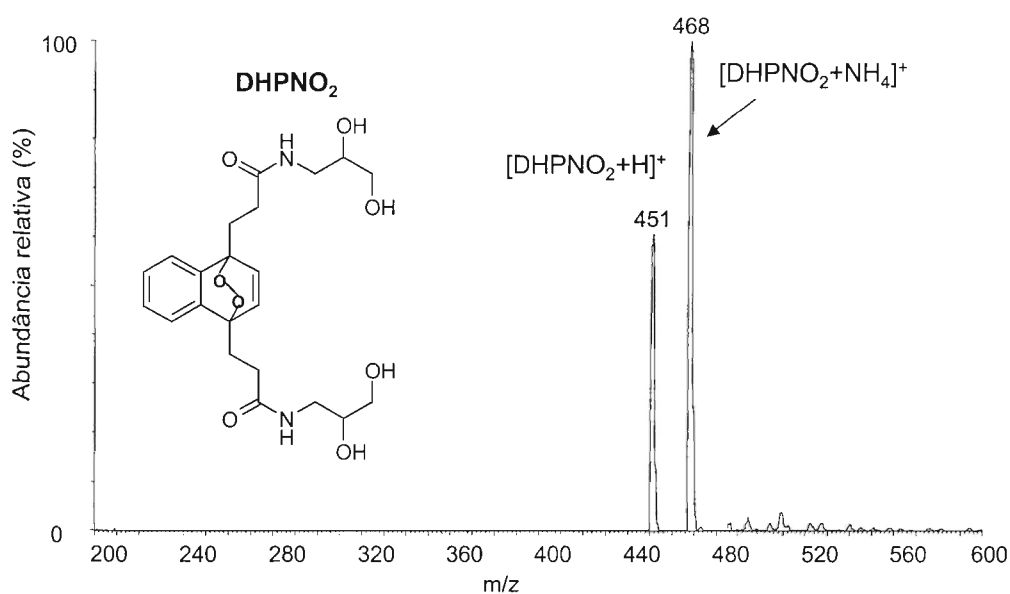


Figura 4.4 Espectro de massas do DHPNO₂ dissolvido em água e detecção feita no modo ESI+ com voltagem do cone de 10V.

4.1.3 Endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida marcada com oxigênio-18

Os espectros de massas para o $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ obtidos em modo ESI+ (Figura 4.5) apresentam alguns sinais característicos descritos na tabela 4.1. Além disso, os adutos formados com os diferentes íons confirmam a massa esperada pela incorporação de dois átomos de oxigênio-18.

Tabela 4.1 Principais informações sobre o espectro de massas do $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$

Valor m/z	Íon correspondente
455	$\text{DHPN}^{18}\text{O}_2 + \text{H}^+$
472	$\text{DHPN}^{18}\text{O}_2 + \text{NH}_4^+$
477	$\text{DHPN}^{18}\text{O}_2 + \text{Na}^+$
493	$\text{DHPN}^{18}\text{O}_2 + \text{K}^+$

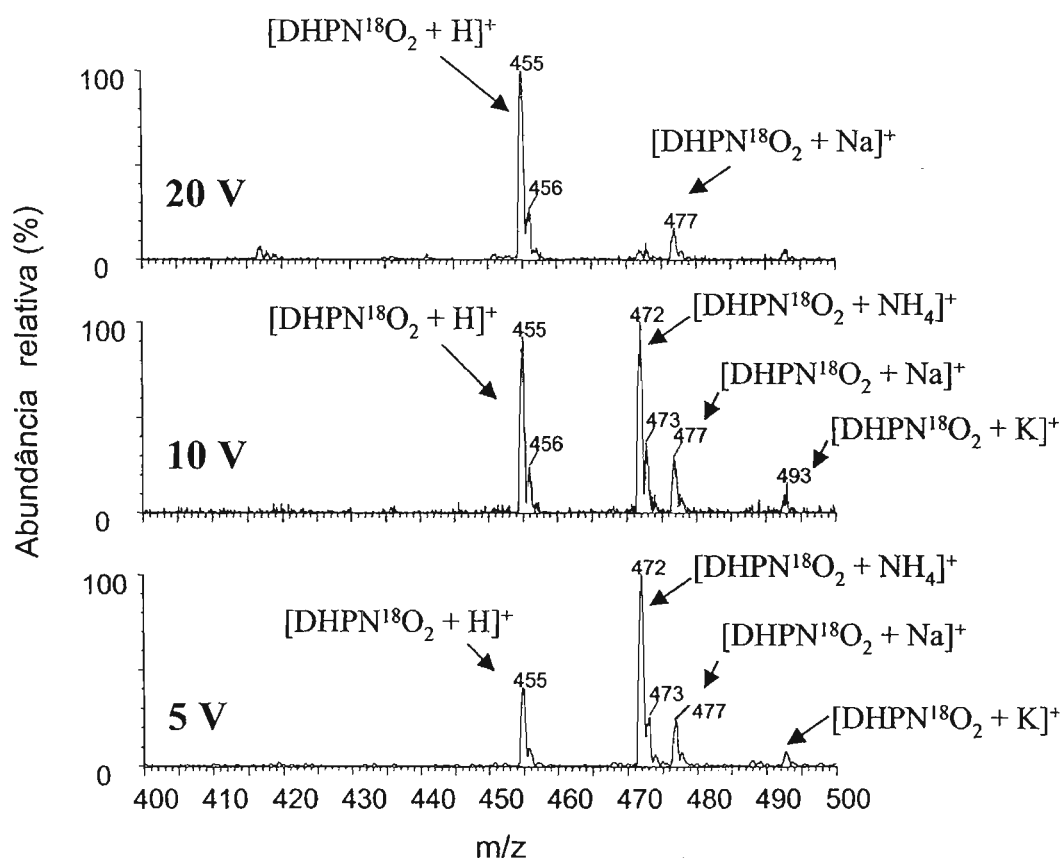


Figura 4.5 Espectros de massas do $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ obtidos no modo ESI+ em diferentes voltagens de cone 5, 10 e 20V.

4.2 Estudos da quimiluminescência da transição monomolecular do $^1\text{O}_2$ produzido pela termodecomposição de endoperóxidos

Foram feitas medidas de quimiluminescência no infravermelho relativas à transição monomolecular ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) do $^1\text{O}_2$ quando este é gerado na termólise de endoperóxidos. Para medidas da intensidade de emissão de luz em comprimento de onda específico e espectro de emissão na região do infravermelho utilizou-se uma fotomultiplicadora especialmente projetada para realizar varreduras de emissão nessa região (seção 3.2). A figura 4.6 compara a quimiluminescência produzida em diferentes temperaturas de termólise do endoperóxido NDPO₂.

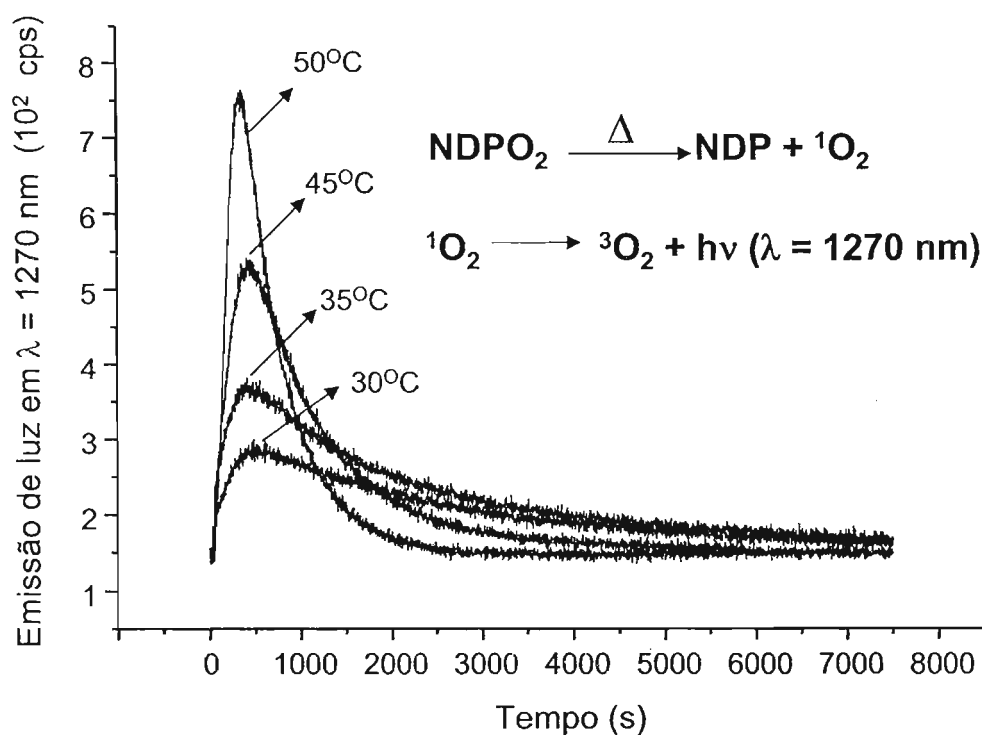


Figura 4.6 Efeito da temperatura na intensidade de quimiluminescência do $^1\text{O}_2$ em $\lambda = 1270 \text{ nm}$ na termólise do NDPO₂.

Para fins de comparação, foram feitos os espectros de emissão de luz dos seguintes sistemas: (A) sistema H₂O₂/MoO₄⁻ (Figura 4.7A), conhecido gerador de $^1\text{O}_2$ e (B) endoperóxido DHPNO₂ (Figura 4.7B). O efeito do solvente H₂O/D₂O foi observado no espectro de emissão da transição monomolecular na termólise do NDPO₂ (Figura 4.7 C e D).

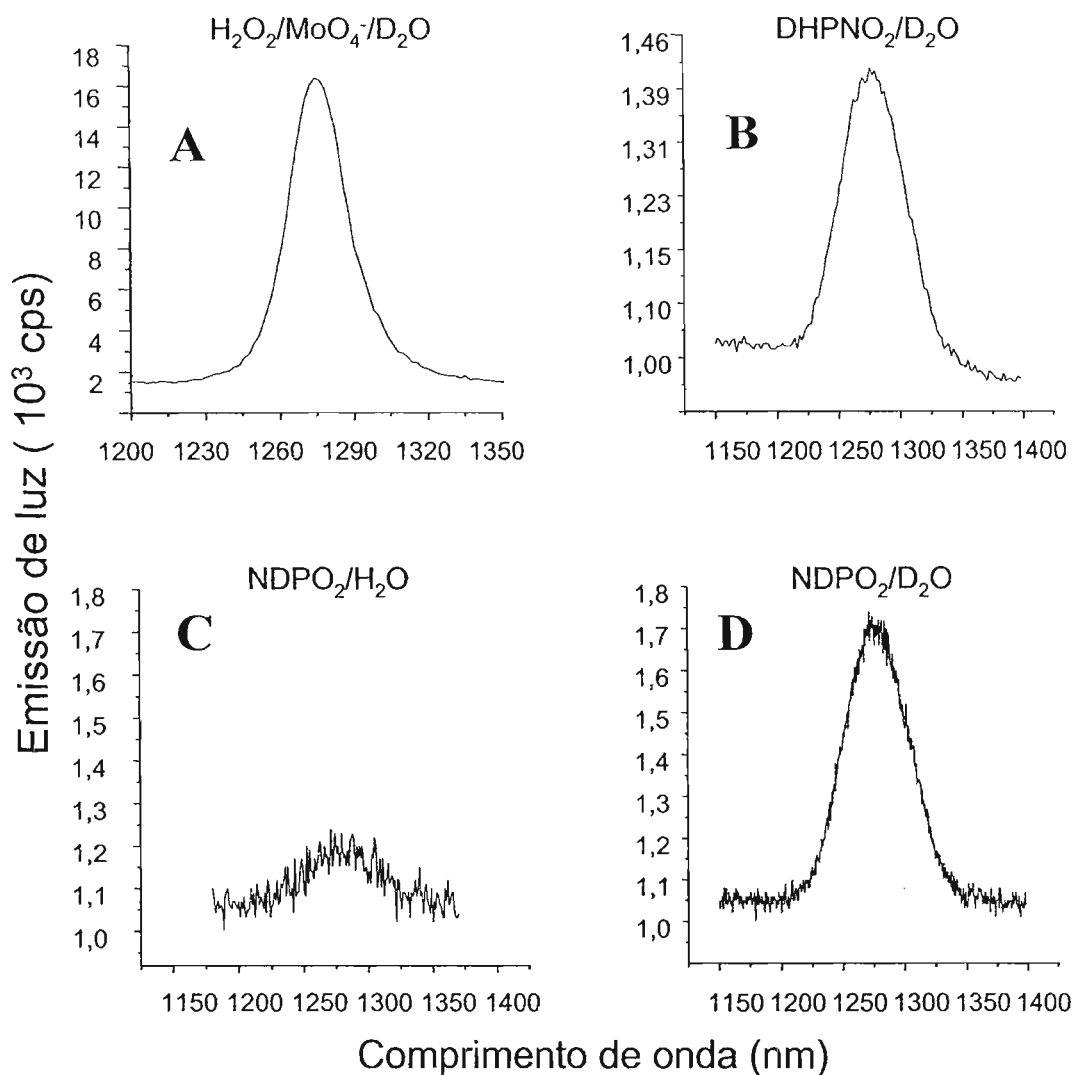


Figura 4.7 Espectro de quimiluminescência do $^1\text{O}_2$ no infravermelho. **(A)** Reação entre H_2O_2 e MoO_4^{2-} em 50% D_2O . **(B)** Termólise do DHPNO_2 10 mM a 40 °C em D_2O . **(C)** Termólise de NDPO_2 10 mM a 40 °C em H_2O . **(D)** Termólise do NDPO_2 10 mM a 40 °C em D_2O .

Além disso, foi observado o efeito da adição de NaN_3 , um forte supressor de $^1\text{O}_2$, sobre a emissão de luz. Como esperado, a adição de NaN_3 , causou uma brusca diminuição do sinal de emissão (Figura 4.8).

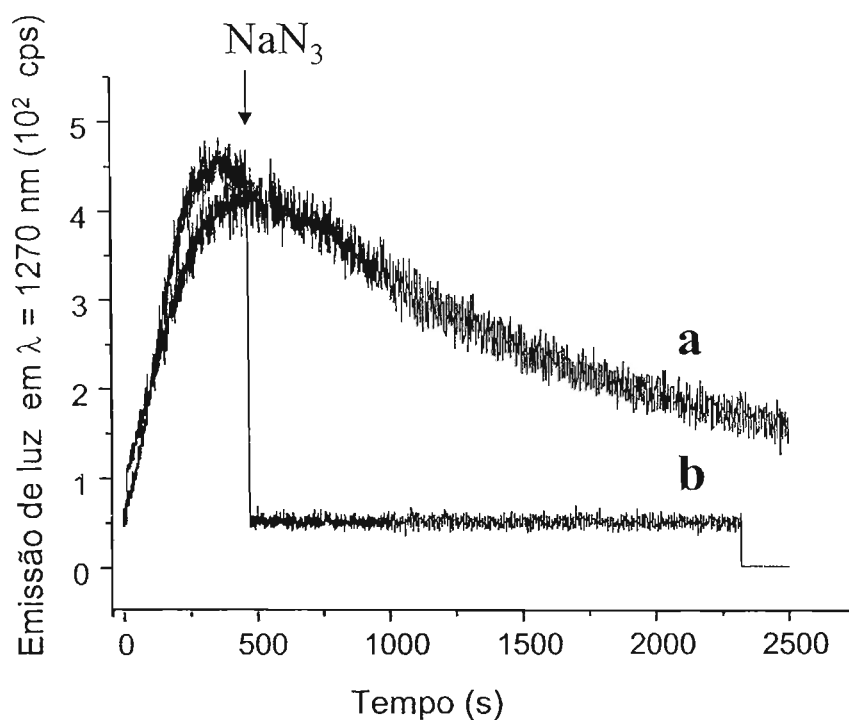


Figura 4.8 Efeito de supressor da NaN_3 na intensidade de quimiluminescência do $^1\text{O}_2$ monitorada em $\lambda = 1270 \text{ nm}$. **(a)** Termólise de DHPNO_2 10 mM em D_2O a 40°C . **(b)** Termólise de DHPNO_2 10 mM em D_2O a 40°C com injeção de 0,4 mL de uma solução 0,1 M de NaN_3 no máximo de emissão de luz.

4.3 Detecção de $^1\text{O}_2$ gerado por diferentes sistemas

4.3.1 Separação e identificação de EAS e EASO_2 por HPLC

Amostras do captador EAS (0,09 mM) e seu produto de reação com $^1\text{O}_2$, EASO_2 (0,033 mM) foram injetadas nas condições de análise descritas na seção 3.3.6.3. Nos cromatogramas apresentados na figura 4.9, os sinais relativos ao EASO_2 e EAS foram observados nos tempos 7 e 11, respectivamente.

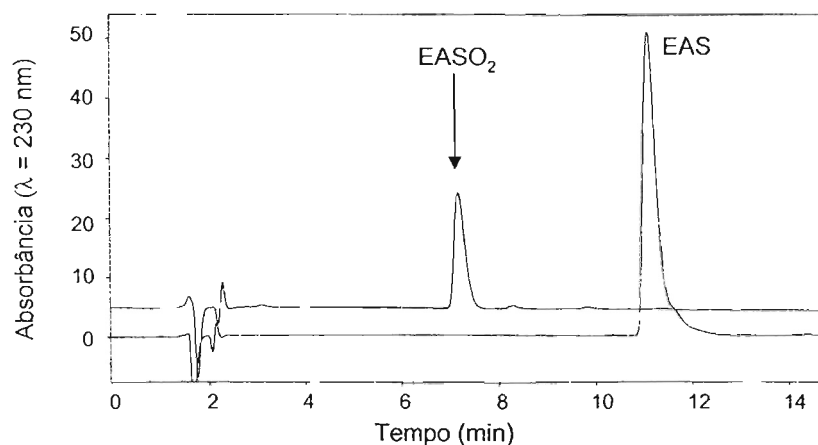


Figura 4.9 Cromatogramas obtidos com injeção de amostra de EAS ou EASO₂.

4.3.2 Detecção de EASO₂ gerado na incubação com DHPNO₂

Para evidenciar a presença de ¹O₂ gerado na termólise do DHPNO₂, o gerador foi incubado com o captador EAS. A mistura de reação foi analisada por HPLC. A figura 4.10 mostra que no controle com DHPNO₂ termodecomposto e no início da incubação não existe EASO₂ em quantidades detectáveis (cromatogramas a e b, respectivamente), porém, após o período de incubação, nota-se a presença do sinal no tempo de retenção correspondente ao produto EASO₂ (cromatograma c).

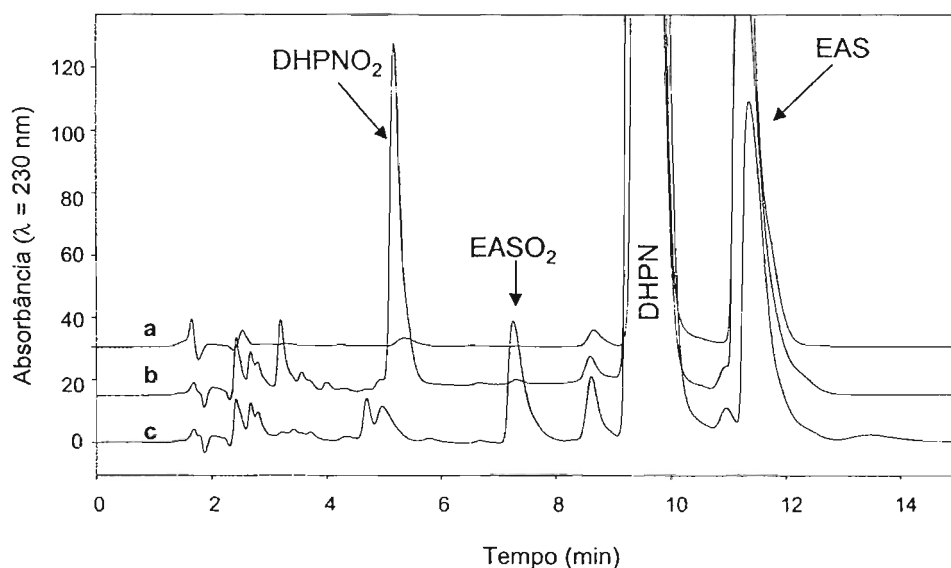


Figura 4.10 Cromatogramas das incubações de DHPNO₂ com EAS em pH 7,4. (a) DHPNO₂ termodecomposto e EAS após incubação por 2 h a 40°C. (b) DHPNO₂ e EAS antes da incubação (tempo = 0). (c) DHPNO₂ e EAS após incubação por 2 h a 40°C.

4.3.3 Detecção de EASO_2 gerado na incubação do H_2O_2 com OCI^-

Esse sistema é conhecido como gerador de $^1\text{O}_2$ em fase aquosa. Quando incubado na presença de EAS, a análise por HPLC mostrou um sinal no tempo de retenção correspondente ao produto EASO_2 . Um outro produto com tempo de retenção menor (4,5 min), formado provavelmente pela interação do EAS com outras espécies geradas no processo de oxidação do H_2O_2 pelo OCI^- também foi observado (Figura 4.11, cromatograma c). Ressaltamos que nos cromatogramas dos controles contendo somente OCI^- ou H_2O_2 não se observa a formação de EASO_2 ou desse produto (Figura 4.11, cromatogramas a e b, respectivamente).

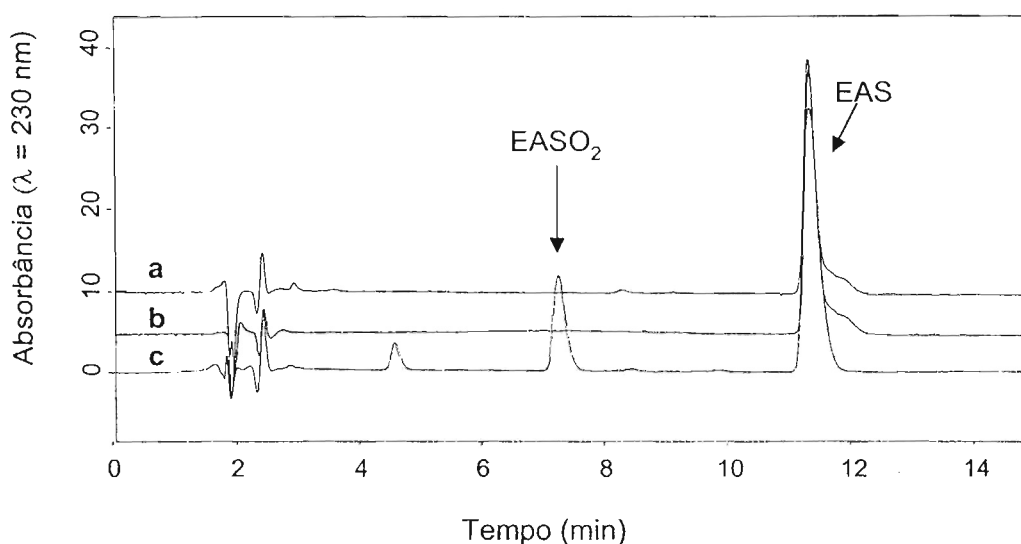


Figura 4.11 Cromatogramas das incubações de EAS com o sistema H_2O_2 e OCI^- em pH 7,4. (a) Controle OCI^- e EAS. (b) Controle H_2O_2 e EAS. (c) incubação OCI^- , H_2O_2 e EAS.

4.3.4 Detecção de EASO_2 gerado na incubação do ONOO^- com H_2O_2

A formação de $^1\text{O}_2$ gerado na incubação de ONOO^- com H_2O_2 também foi evidenciada com experimentos utilizando o captador EAS. Em todos os sistemas descritos a seguir, para as incubações em pH 5,4 foram obtidos os mesmos resultados das incubações em pH 7,4.

Os experimentos realizados mostraram que não há formação de EASO_2 em quantidades detectáveis pela decomposição de ONOO^- quando H_2O_2 está ausente, tanto para concentração de 1 ou 15 mM (Figura 4.12, cromatogramas 1a

e 1b). Este fato que foi comprovado pela co-injeção de EASO_2 previamente purificado adicionado à amostra referente ao ensaio com ONOO^- 15 mM (Figura 4.12, cromatograma 1c). A formação de EASO_2 foi somente observada quando a decomposição de ONOO^- ocorre na presença H_2O_2 (Figura 4.12, cromatograma 2).

Por outro lado, observa-se em todos os cromatogramas da Figura 4.12 que existe a formação de um produto com um tempo de retenção maior que o EASO_2 gerado, inclusive, pela decomposição do ONOO^- na ausência de H_2O_2 . Esse dado indica que, possivelmente, outras espécies que foram formadas pela sua decomposição reagiram com o EAS, gerando um produto que não é o EASO_2 .

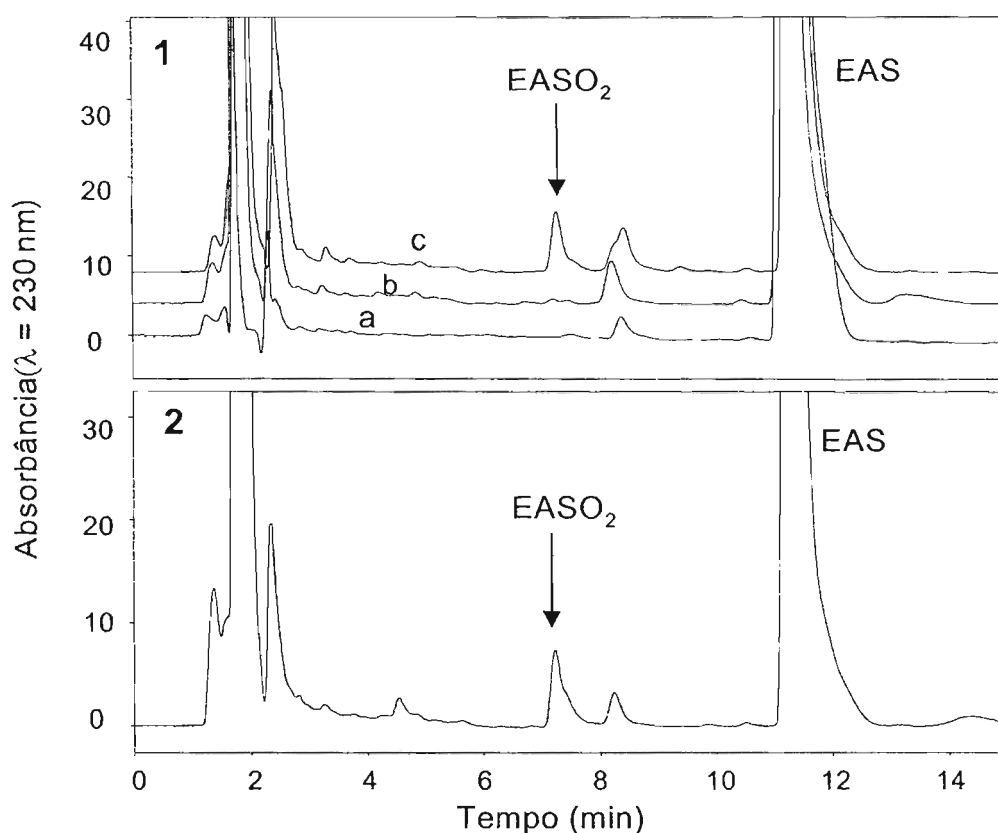


Figura 4.12 Cromatogramas das incubações de ONOO^- com EAS em pH 7,4. (1) (a) 1 mM de ONOO^- com 8 mM de EAS, (b) 15 mM de ONOO^- com 8 mM de EAS e (c) 15 mM de ONOO^- com 8 mM de EAS, co-injeção de EASO_2 . (2) Incubação 15 mM de ONOO^- e 100 mM de H_2O_2 com 8 mM de EAS.

4.4 Análise de EAS e EASO₂ por espectrometria de massas

A formação do EASO₂ foi também confirmada por espectrometria de massas. O espectro de massa do captador EAS adquirido no modo ESI- (Figura 4.13) exibe um íon majoritário em $m/z = 212$ correspondente à molécula sem os dois átomos de sódio, portanto, duplamente carregada. O íon em $m/z = 442$ refere-se à molécula sem os dois átomos de sódio e com o íon amônio. Somente para o espectro adquirido com cone em 20V, observa-se o íon em $m/z = 425$ referente à molécula sem os dois átomos de sódio e com um próton.

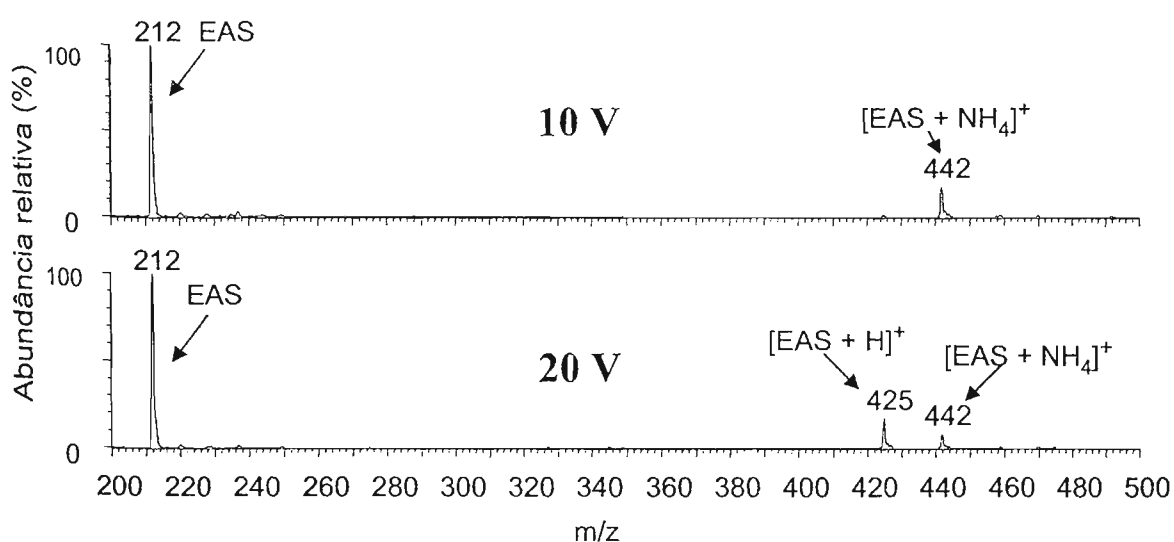


Figura 4.13 Espectros de massas do EAS adquirido no modo ESI- obtidos em diferentes voltagens de cone 10 e 20V.

No espectro do EASO₂ (Figura 4.14), observa-se um íon intenso em $m/z = 228$ correspondente à molécula sem os dois átomos de sódio, portanto duplamente carregada. O íon em $m/z = 474$ referente à molécula sem os dois átomos de sódio e com o íon amônio, e novamente, somente para o espectro adquirido com cone em 20V, observa-se o íon em $m/z = 457$ referente à molécula sem os dois átomos de sódio e com um próton.

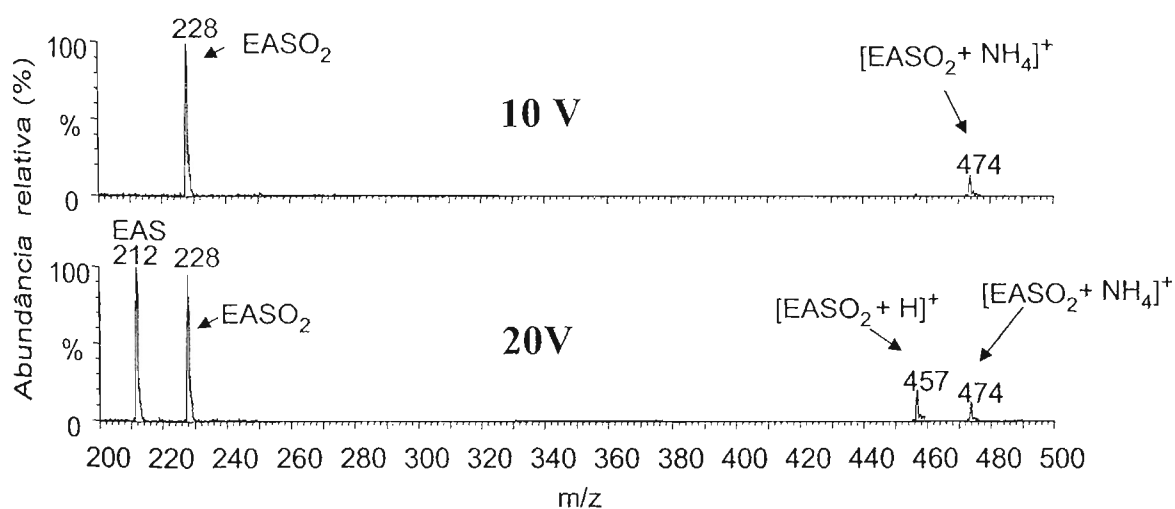


Figura 4.14 Espectros de massas do EASO_2 adquirido no modo ESI- obtidos em diferentes voltagens de cone 10 e 20V.

4.5 Caracterização do $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$ gerado pela incubação de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ com EAS

A figura 4.15 mostra a formação de $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$ na reação com $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ gerado pelo $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. A análise por HPLC-MS do $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$ adquirido no modo ESI- exibe um íon majoritário em $m/z = 230$ correspondente à molécula marcada isotopicamente com oxigênio-18 e duplamente carregada (Figura 4.15A). Observa-se ainda um sinal referente ao íon do EASO_2 em $m/z = 228$. Quando N_2 é borbulhado na solução antes da incubação, mantendo a temperatura baixa com banho de gelo e protegido da luz, o sinal referente ao íon do EASO_2 em $m/z = 228$ diminui praticamente pela metade comparado ao resultado da incubação sem borbulho de N_2 (Figura 4.15B). Quando O_2 é borbulhado na solução antes da incubação, nas mesmas condições, o sinal referente ao íon do $\text{EAS}^{18}\text{O}_2$ em $m/z = 230$ diminui pela metade comparado ao resultado da incubação sem borbulho de N_2 (Figura 4.15C).

A razão entre os produtos marcados e não-marcados ($\text{EAS}^{18}\text{O}_2/\text{EASO}_2$), nessas três condições, está mostrada na figura 4.16A. Observa-se claramente o efeito do O_2 dissolvido na solução sobre a proporção dos produtos.

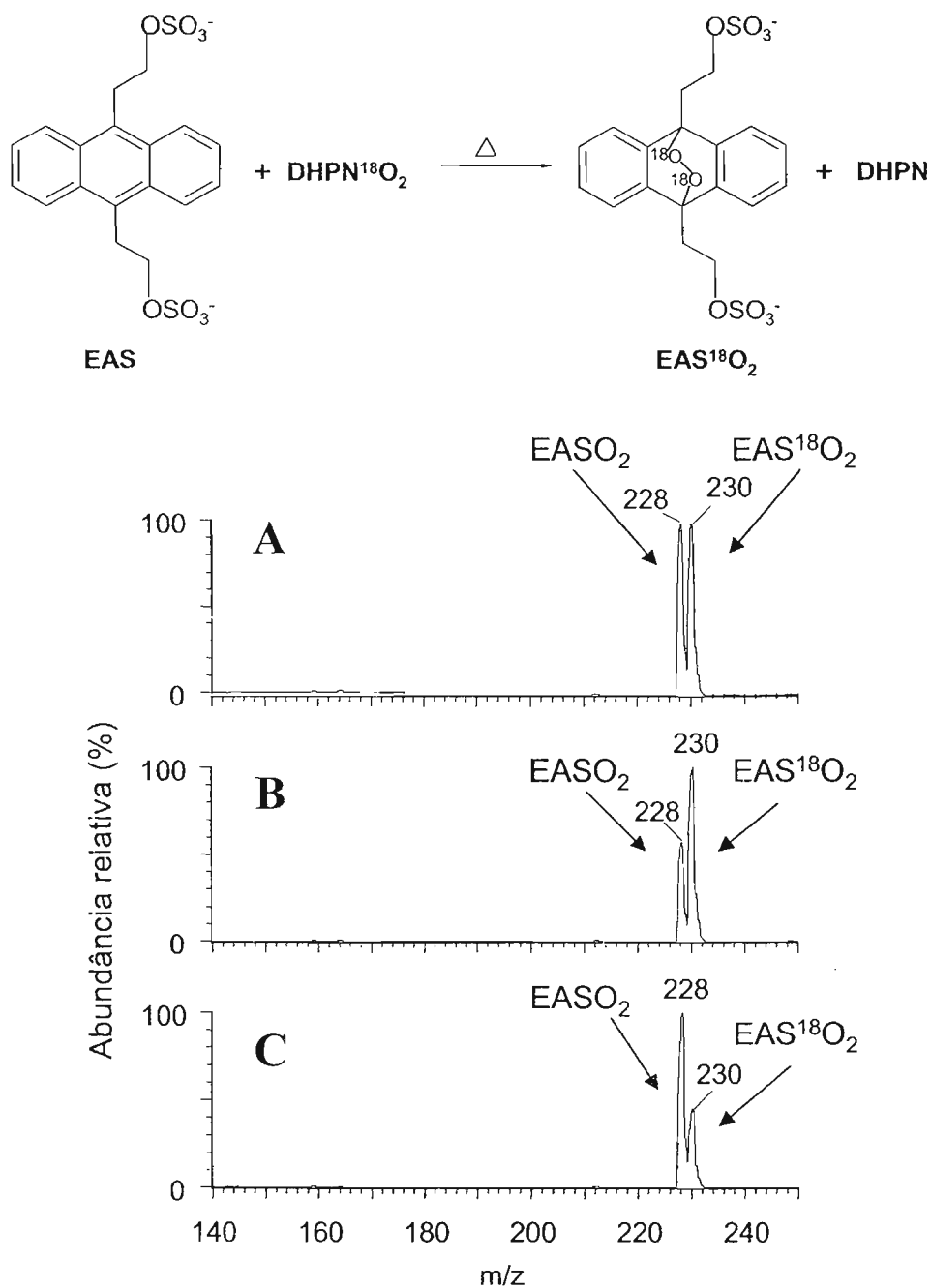


Figura 4.15 Reação de formação do EAS¹⁸O₂ pela termólise do DHPN¹⁸O₂ e espectros de massas adquiridos no modo ESI⁻. **(A)** Sem borbulhar N₂ antes da incubação. **(B)** Com borbulho de N₂ antes da incubação. **(C)** Com borbulho de O₂ antes da incubação.

A razão EAS¹⁸O₂/EASO₂ foi também avaliada em função da concentração de DHPN¹⁸O₂ e da proporção de D₂O na solução (Figura 4.16B e C, respectivamente).

Observa-se que a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$ aumenta proporcionalmente com a concentração do gerador $DHPN^{18}O_2$ e diminui com quantidades crescentes de D_2O .

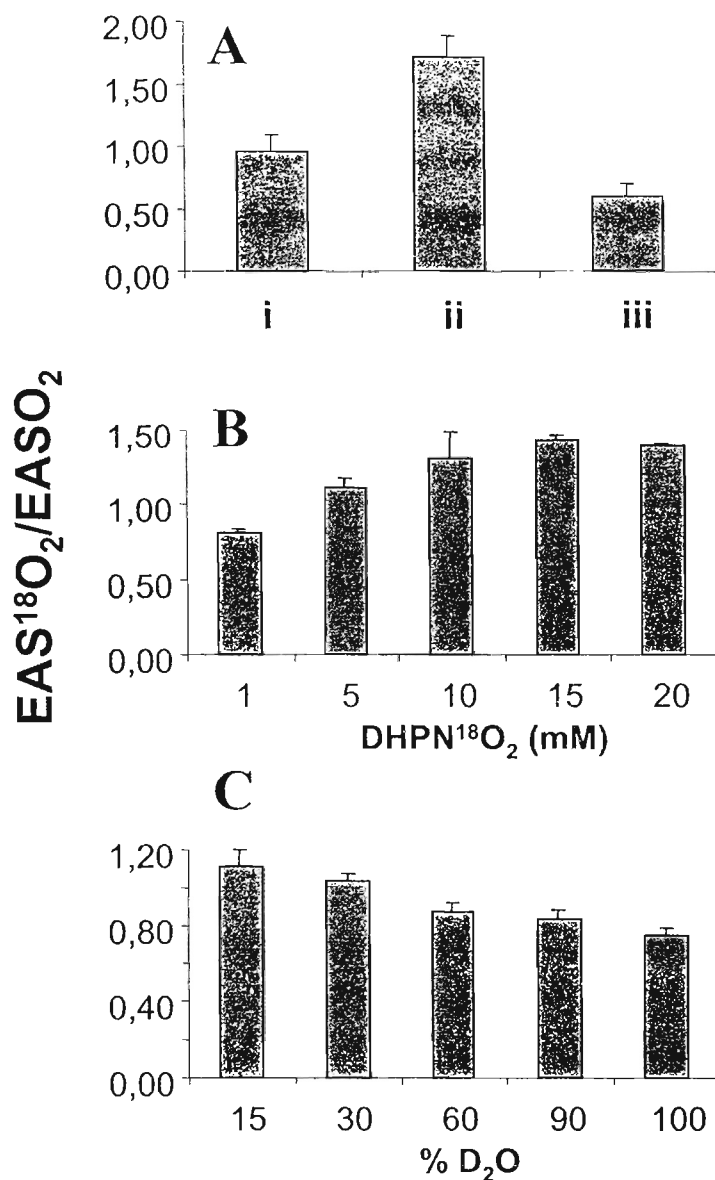


Figura 4.16 Razão dos produtos $EAS^{18}O_2$ e $EASO_2$ formados na incubação com $DHPN^{18}O_2$ sob diversas condições. **(A)** Efeito do O_2 dissolvido sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$: **(i)** sem borbulhar N_2 antes da incubação; **(ii)** com borbulho de N_2 antes da incubação; **(iii)** com borbulho de O_2 antes da incubação. **(B)** Efeito da concentração de $DHPN^{18}O_2$ sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$. **(C)** Efeito da quantidade de D_2O na solução sobre a razão $EAS^{18}O_2/EASO_2$.

4.6 Oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

4.6.1 Análise dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados pela reação com $^1\text{O}_2$ gerado pelos endoperóxidos NDPO₂ e DHPNO₂.

Os principais produtos esperados para a reação entre o $^1\text{O}_2$ e a dGuo são os dois diastereoisômeros da dSp (Niles *et al.*, 2001) e em quantidade bem menor, a 8-oxodGuo (Buchko *et al.*, 1995; Ravanat e Cadet, 1995).

A detecção e quantificação da 8-oxodGuo foram feitas por HPLC com detecção eletroquímica conforme descrito em Materiais e Métodos (3.3.7.1.1). A figura 4.17 mostra um cromatograma típico referente a um padrão de 8-oxodGuo.

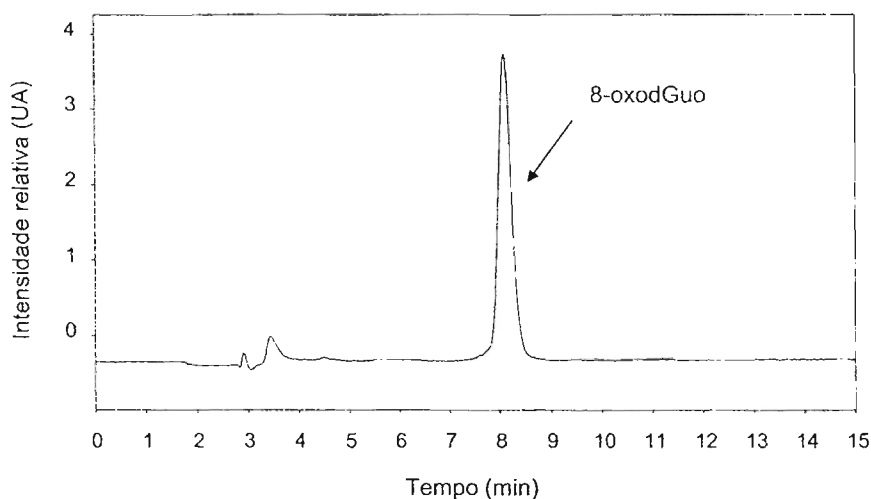


Figura 4.17 Cromatograma do padrão de 0,5 μM de 8-oxodGuo, detector eletroquímico.

A detecção e quantificação dos diastereoisômeros da dSp foram feitas por HPLC com detecção no UV conforme descrito em Materiais e Métodos (3.3.7.1.2). A figura 4.18 mostra um cromatograma típico referente a um padrão de dSp que foi preparado pela fotossensibilização da dGuo na presença de azul de metileno.

O resultado da quantificação dos produtos formados está representado na figura 4.19. Observa-se que a formação de produtos é proporcional à concentração de endoperóxido e as quantidades formadas dos nucleosídeos oxidados foram similares para os dois endoperóxidos utilizados. Além disso, os diastereoisômeros da dSp são formados em maior quantidade com relação à 8-oxodGuo, cerca de 5 a 30 vezes, dependendo da concentração do endoperóxido.

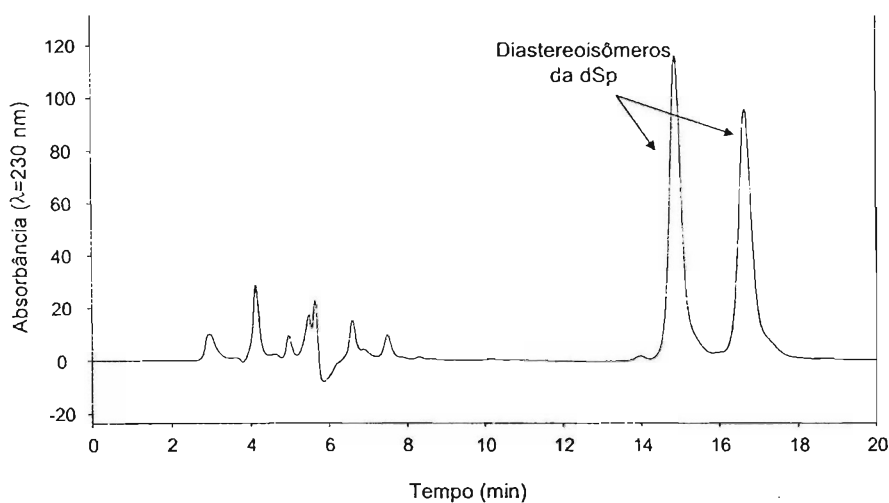


Figura 4.18 Cromatograma da solução padrão de 0,52 mM de dSp.

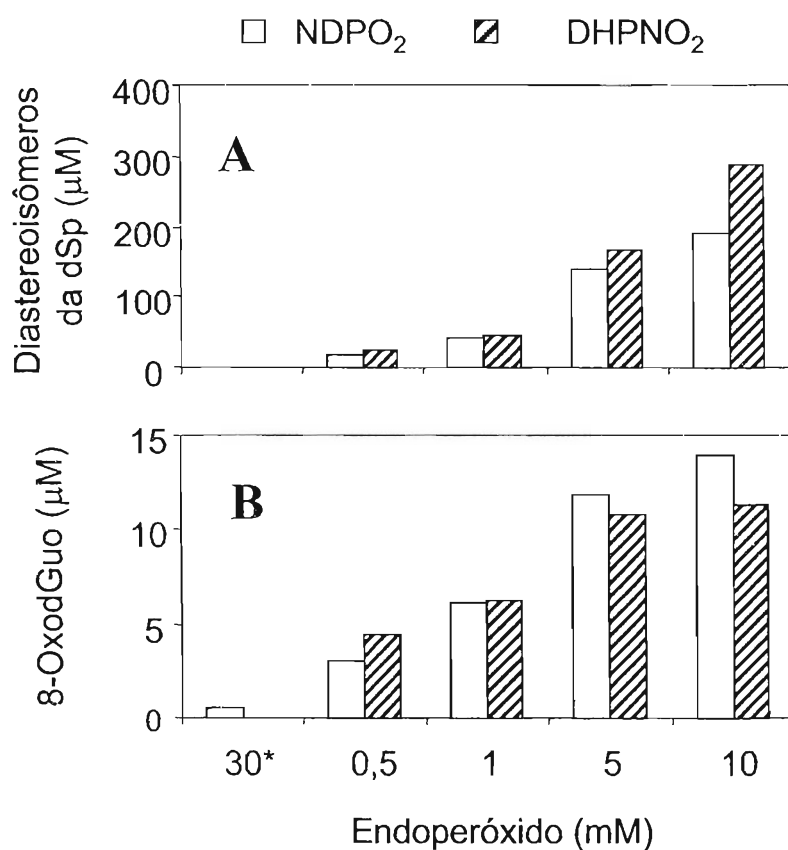


Figura 4.19 Comparação entre as quantidades de produtos formados pela oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$ gerado pelos endoperoxidos. **(A)** Níveis de dSp (μM). **(B)** Níveis de 8-oxidGuo (μM). O símbolo 30* refere-se à incubação da dGuo com 30 mM de NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos.

4.6.2 Análise por espectrometria de massas dos produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina formados na incubação com os endoperóxidos DHPNO₂ e DHPN¹⁸O₂

Para melhor caracterização dos produtos formados, foram feitas análises por espectrometria de massas para os produtos gerados na oxidação da dGuo por ¹O₂ gerado pelos endoperóxidos DHPNO₂ e DHPN¹⁸O₂.

4.6.2.1 Caracterização da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

Observa-se no espectro de massas para amostra de 8-oxodGuo isolada por HPLC (Figura 4.20) que, para voltagem de cone em 15V, praticamente não há fragmentação e o principal íon é de $m/z = 284$ referente à molécula protonada $[M+H]^+$. Usando uma voltagem de cone maior, 30V, o íon resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose pode ser claramente observado em $m/z = 168$ referente à base protonada $[BH+H]^+$.

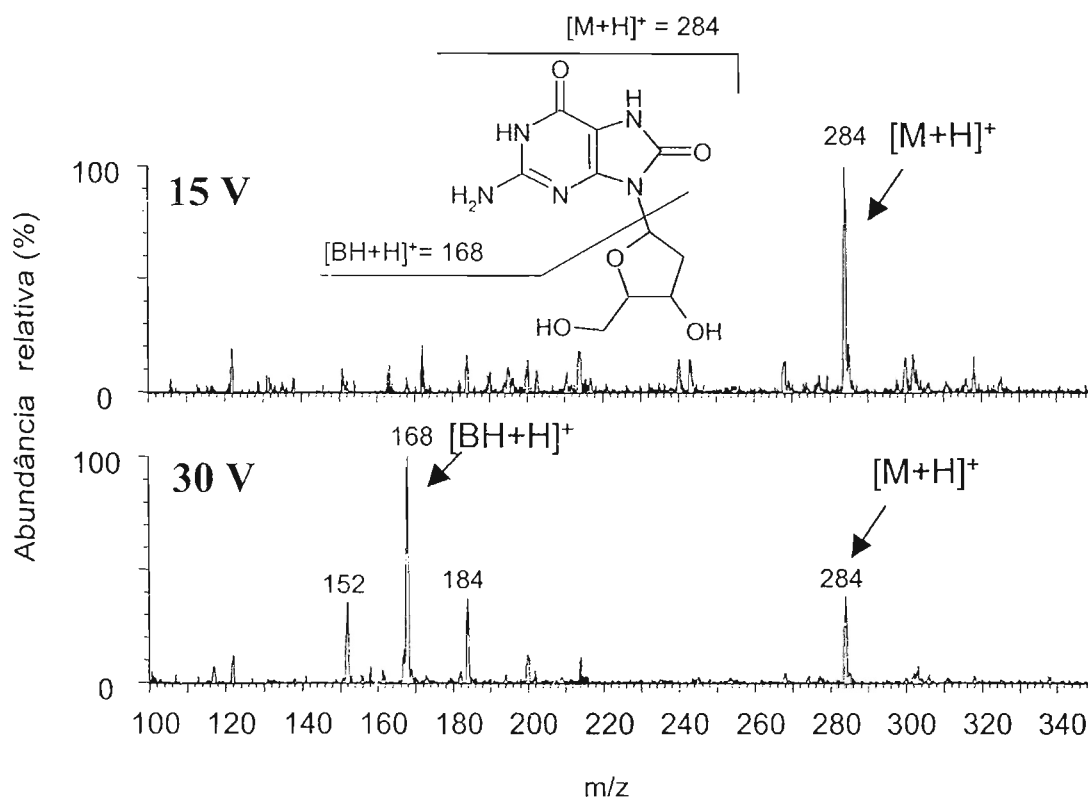


Figura 4.20 Espectro de massas obtido no modo ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da 8-oxodGuo formada na incubação de dGuo com ¹O₂ gerado pelo DHPNO₂.

Uma vez que a 8-oxodGuo é um produto minoritário e foi obtida por coleta em HPLC, existe a possibilidade de dGuo (reagente) e dSp (produto principal) estarem presentes como contaminantes dessa fração. Desta forma, os sinais em $m/z = 152$ e 184 observados com a voltagem do cone em 30V correspondem, provavelmente, à presença desses compostos.

Para o produto isolado, resultante da reação da dGuo com $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ gerado pelo $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$, pode-se observar a presença dos sinais em $m/z = 170$ e 286 , que são referentes à incorporação de um átomo do isótopo 18 do oxigênio na molécula (Figura 4.21).

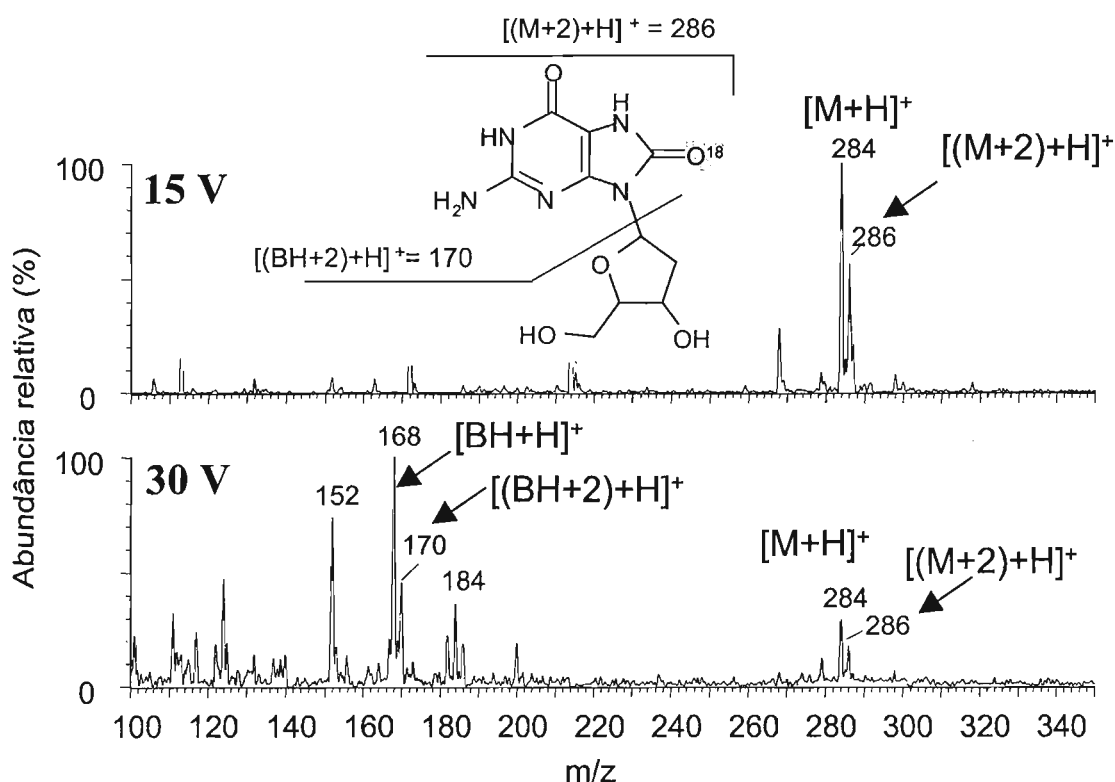


Figura 4.21 Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI⁺ com potencial do cone em 15 e 30 V da 8-oxodGuo formada na incubação de dGuo com $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ gerado pelo $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$.

4.6.2.2 Caracterização dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína

Observa-se no espectro de massas (Figura 4.22), em voltagem de cone de 15 V, apenas o íon principal em $m/z = 300$ referente à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. Quando as condições de ionização são alteradas e a voltagem de cone é

aumentada para 30 V, observa-se o íon resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose em $m/z = 184$ referente à base protonada $[BH+H]^+$.

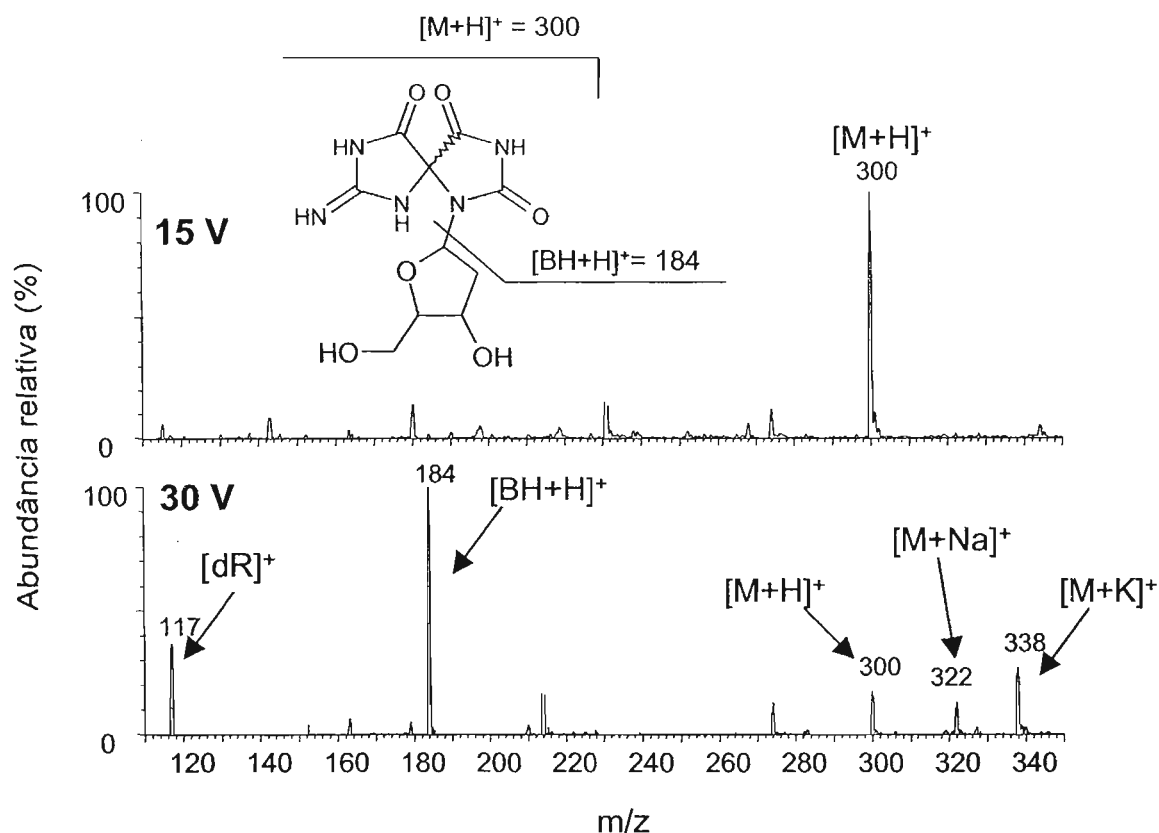


Figura 4.22 Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da dSp formada na incubação de dGuo com 1O_2 gerado pelo DHPNO₂.

Para o produto isolado, resultante da reação da dGuo com $^{18}[^1O_2]$ gerado pelo DHPN¹⁸O₂, pode-se observar a presença dos sinais em $m/z = 186$, 188, 302 e 304, que são referentes à incorporação de um ou dois átomos do isótopo 18 do oxigênio na molécula (Figura 4.23).

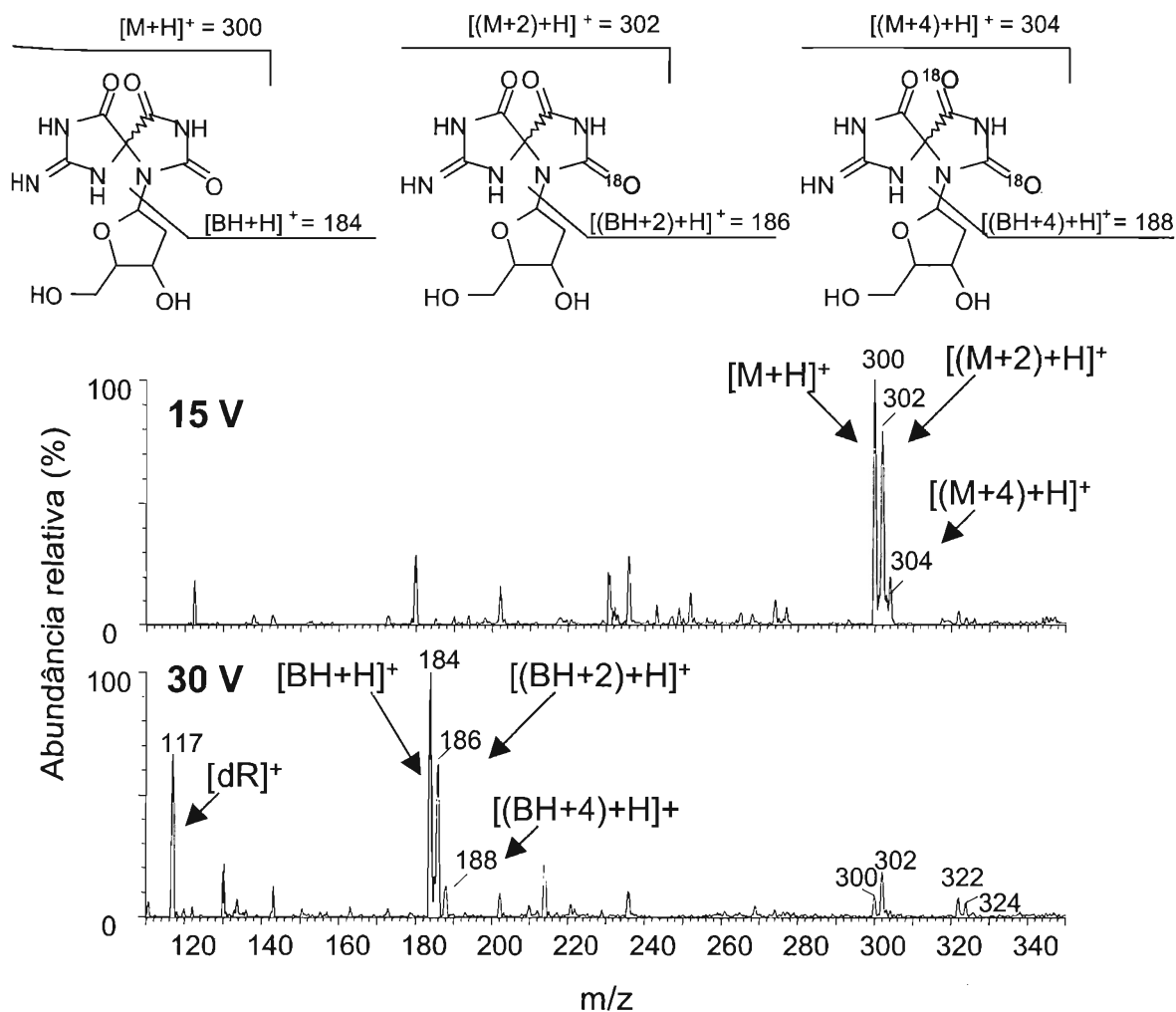


Figura 4.23 Espectro de massas obtido no modo de ionização ESI+ com potencial do cone em 15 e 30 V da dSp formada na incubação de dGuo com $^{18}[^1O_2]$ gerado pelo DHPN $^{18}O_2$.

A intensidade dos sinais referentes à incorporação de dois átomos de oxigênio-18 é bem menor em relação àqueles correspondentes à incorporação de apenas um átomo do oxigênio-18. Kang e Foote (2002b) propuseram recentemente a adição de água num intermediário (I) da rota de formação da dSp pela reação da dGuo por 1O_2 (Figura 1.12). Os dados mostrados na figura 4.23 indicam que essa é a rota provável e está esquematizada na Figura 4.24.

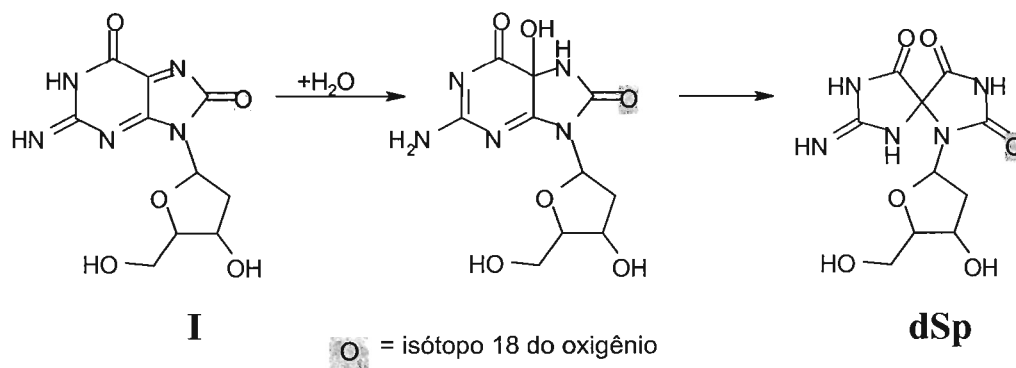


Figura 4.24 Possível mecanismo para formação da dSp com a incorporação de apenas um átomo de oxigênio-18 devido ao ataque da água no intermediário (I).

Por sua vez, a formação do produto contendo a dupla marcação poderia ser explicada pelo ataque de uma outra molécula de $^{18}\text{O}_2$ sobre a ^{18}O -8-oxodGuo o que levaria à formação da espiro duplamente marcada. Esta proposta está esquematizada na figura 4.25.

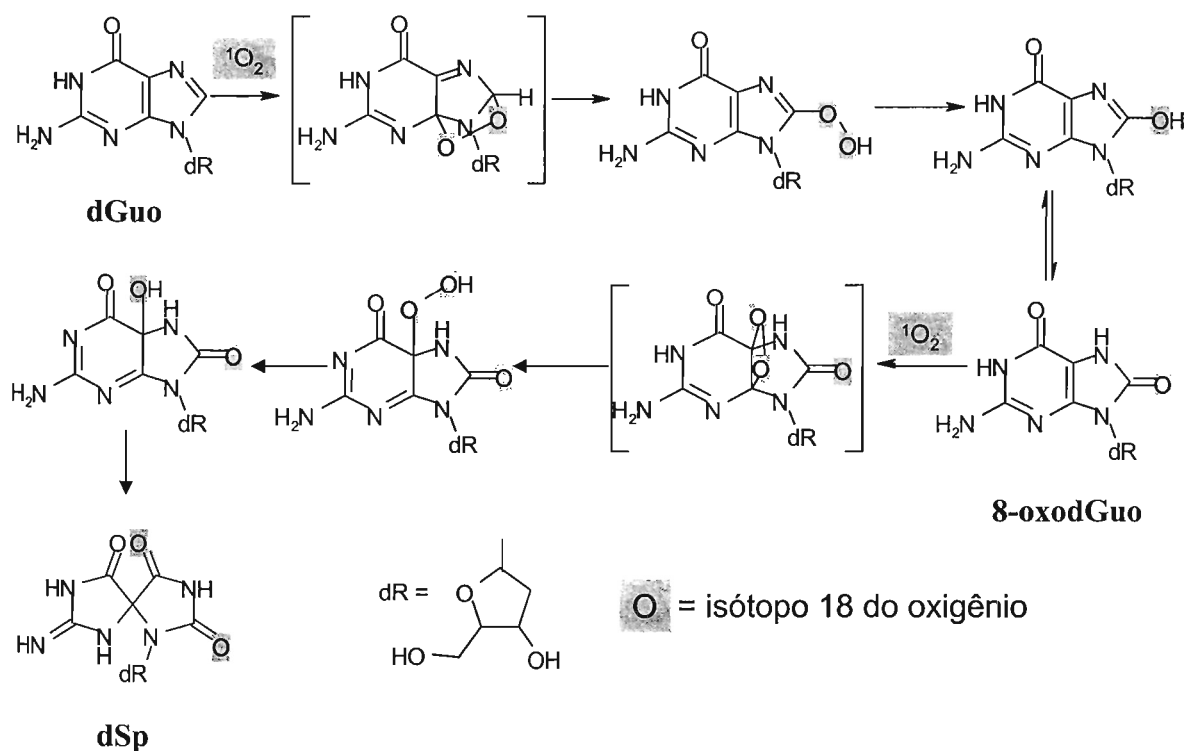


Figura 4.25 Possível mecanismo para formação da dSp com a incorporação de dois átomos de oxigênio-18.

Pelo espectro de fragmentação observam-se os íons característicos dos diastereoisômeros da dSp anteriormente descritos por Luo *et al.* (2000), inclusive com os incrementos de massa esperados pela incorporação dos átomos de oxigênio-18 (Figura 4.26).

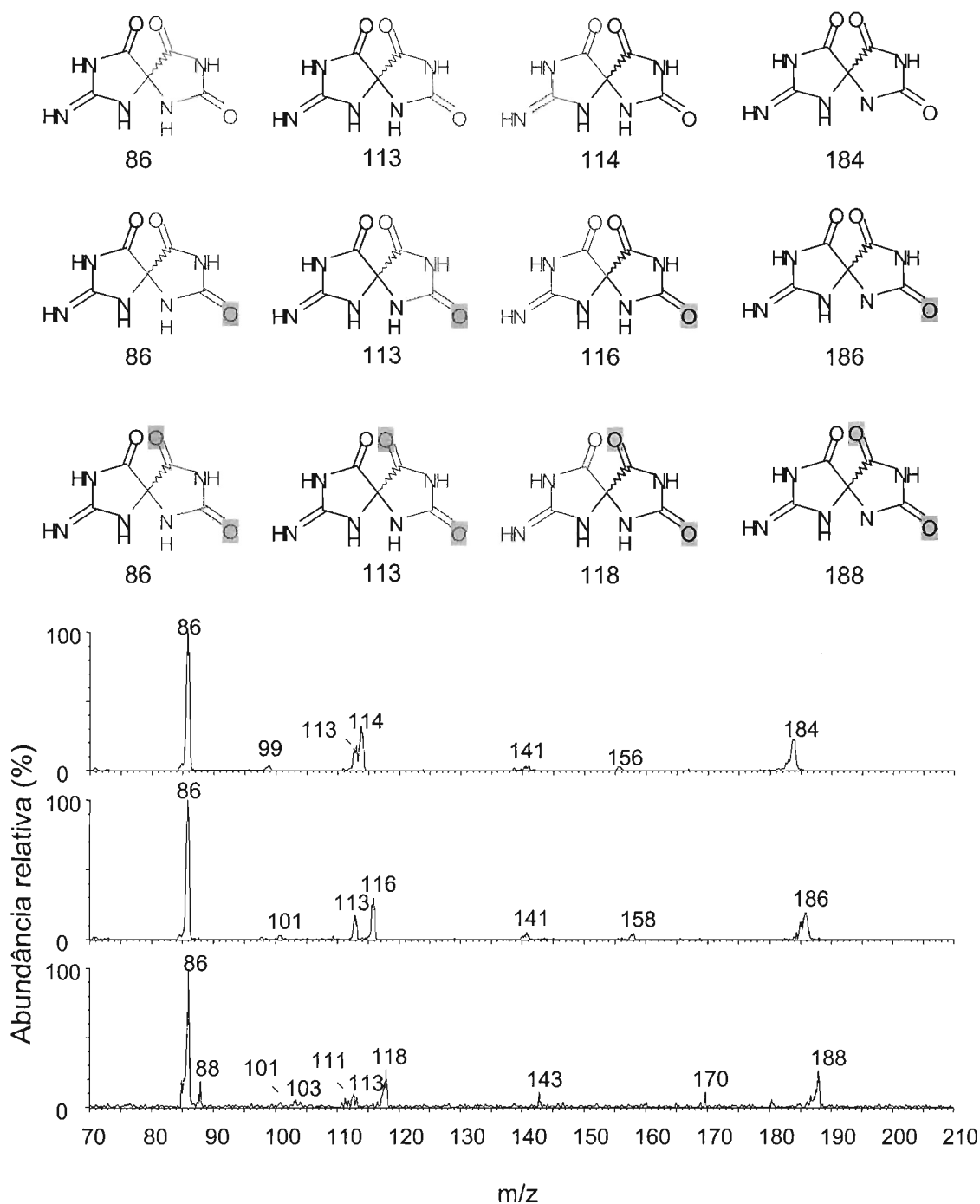


Figura 4.26 Espectro de íons filhos obtido para a dSp formada pela reação de dGuo com $^{18}\text{O}_2$ no modo ESI+ selecionando os íons de m/z 184, 186 e 188 no MS1 com potencial do cone em 30 V e energia de colisão em 26 eV.

4.7 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

4.7.1 Separação por HPLC e detecção da imidazolona e oxazolona

A oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ mostrou a formação de dOz e sua precursora, a dlz. As análises de HPLC-MS mostraram que a dlz elui em 18 min (Figura 4.27A), enquanto a dOz exibe um tempo de retenção de 5 min (Figura 4.27C). Este padrão de eluição está de acordo com os cromatogramas publicados para esses produtos de oxidação da 8-oxodGuo obtidos anteriormente utilizando fotossensibilização com azul de metileno (Buchko *et al.*, 1995).

Os correspondentes compostos isotopicamente marcados, ambos contendo um átomo de oxigênio-18, também foram detectados quando a oxidação da 8-oxodGuo foi feita com a fonte química de $^{18}\text{O}_2$ (Figuras 4.27D e 4.27B), e exibem tempos de retenção similares aos dos padrões não-marcados.

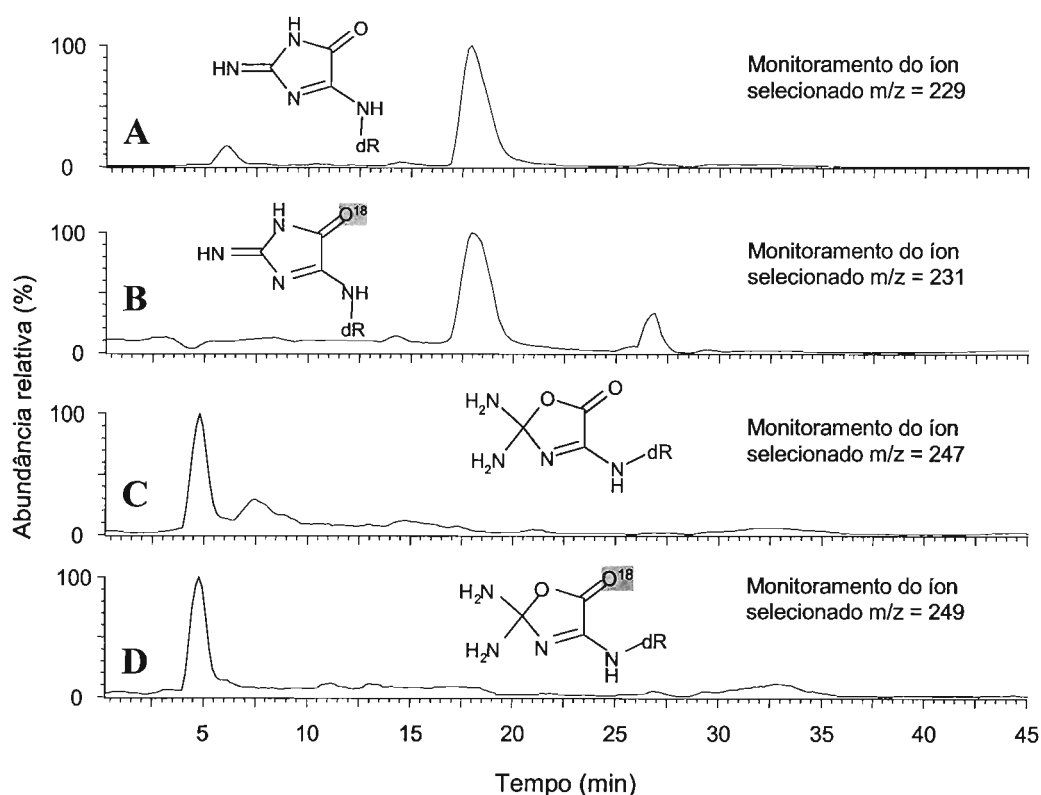


Figura 4.27 (A) Cromatograma obtido selecionando o íon em $m/z = 229$ correspondente à dlz. (B) Cromatograma obtido selecionando o íon em $m/z = 247$ correspondente à dOz. (C) Cromatograma obtido selecionando o íon em $m/z = 231$ correspondente à dlz marcada com oxigênio-18. (D) Cromatograma obtido selecionando o íon em $m/z = 249$ correspondente à dOz marcada com oxigênio-18.

O espectro de massas adquirido no modo de ionização ESI+ da dlz (Figura 4.27A) exibe um sinal majoritário correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ em $m/z = 229$. Um outro sinal característico da molécula referente à quebra ligação *N*-glicosídica do íon molecular, que ocorre no processo de ionização, resulta no fragmento característico em $m/z = 113$ correspondente à base protonada $[BH+H]^+$. Esse padrão de fragmentação no espectro de massas foi anteriormente relatado (Ravanat *et al.*, 2000b).

Como esperado, os correspondentes sinais do produto isotopicamente marcado apresentam os sinais característicos em $m/z = 231$ e $m/z = 115$ referentes ao íon molecular $[(M+2)+H]^+$ e a base protonada $[(BH+2)+H]^+$, respectivamente (Figura 4.28B).

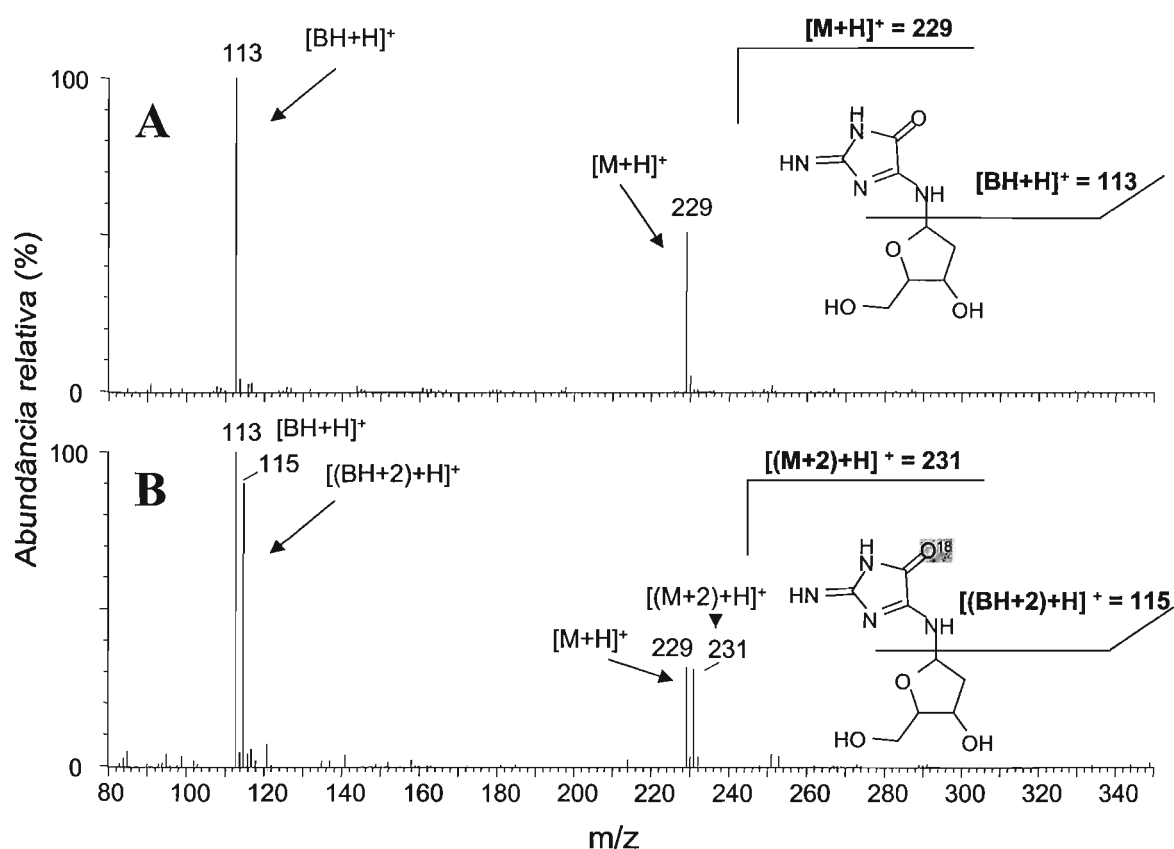


Figura 4.28 (A) Espectro de massas do produto dlz formado pela reação de 8-oxodGuo com 1O_2 . **(B)** Espectro de massas do produto dlz isotopicamente marcado com oxigênio-18 formado pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[^1O_2]$.

Estudos anteriores mostraram (Raoul *et al.*, 1995) que a dlz sofre hidrólise acompanhada da incorporação de uma molécula de água e leva à formação da dOz em solução aquosa neutra. Essa reação ocorre segundo mecanismo que envolve a formação transitória de um ácido carboxílico, seguido do ataque do oxigênio nucleofílico ao carbono eletrofílico (tipo imino) levando à ciclização e formação do produto final (Figura 4.29).

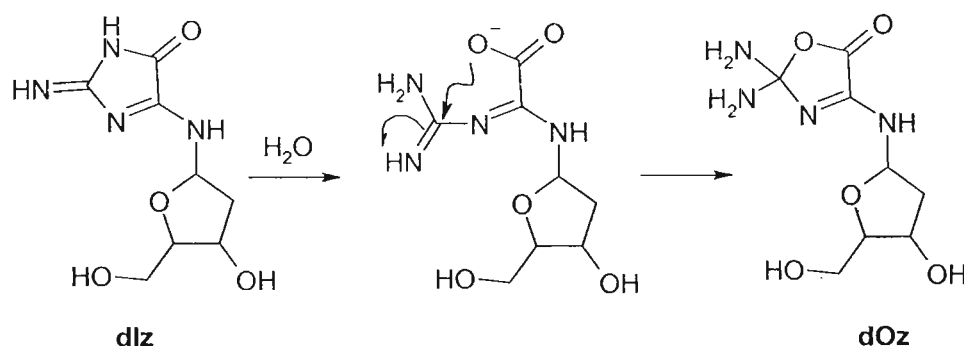


Figura 4.29 Mecanismo de hidrólise da imidazolona para formar a oxazolona (Raoul *et al.*, 1995).

No espectro de massas da figura 4.30A, os sinais em $m/z = 247$ e 131 referem-se, respectivamente, à molécula de dOz protonada e à base nitrogenada protonada. Os sinais em $m/z = 203$ e 87 correspondem à perda de 44 u.m.a. (CO_2) da molécula e da base nitrogenada respectivamente.

O espectro de massas da dOz formada pela oxidação da 8-oxodGuo com $^{18}\text{O}_2$, mostra o íon molecular $[(M+2)+\text{H}]^+$ em $m/z = 249$ indicando um aumento de 2 u.m.a., pela incorporação de um átomo de oxigênio-18, com relação ao composto não marcado. Os fragmentos em $m/z = 203$ e $m/z = 87$ não estão com suas massa aumentadas, visto que resultam da perda de uma molécula de CO_2 contendo oxigênio-18 do íon molecular e do fragmento de base protonada, respectivamente (Figura 4.30B).

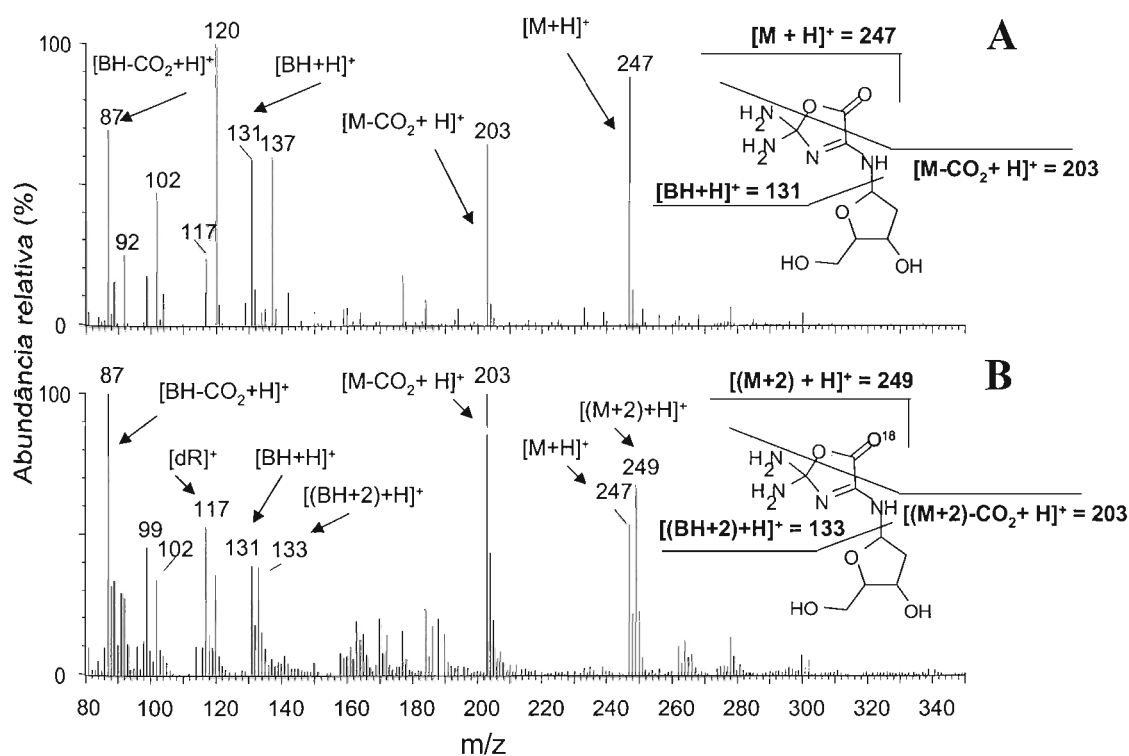


Figura 4.30 (A) Espectro de massas do produto dOz formado pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$. **(B)** Espectro de massas do produto dOz isotopicamente marcado com oxigênio-18 formado pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[\text{O}_2]$.

4.7.2 Separação por HPLC e detecção dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína

Um outro produto formado pela oxidação por $^1\text{O}_2$ da 8-oxodGuo segundo Raoul e Cadet (1996) é a 4-OH-8-oxodGuo. Entretanto, assim como no caso da oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$ é provável que este composto seja, na verdade, a dSp. A seguir, os resultados obtidos nas análises por MS confirmam essa proposta.

As massas correspondentes a esse produto foram detectadas utilizando a função de scan total no MS1 e perda neutra de 116 u.m.a. Essa última função mostra os íons que sofreram fragmentação na câmara de colisão e perda de parte da molécula com essa massa (Figura 4.31).

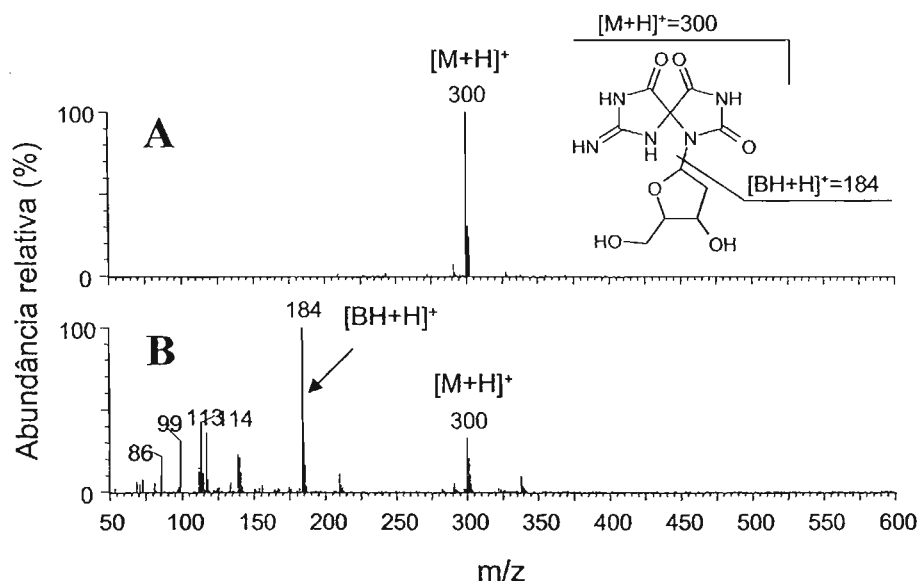


Figura 4.31 (A) Espectro de massas da dSp gerada na oxidação da 8-oxodGuo por 1O_2 obtido no modo ESI+ usando a função de perda neutra de 116 u.m.a. **(B)** Espectro de massas da dSp gerada na oxidação da 8-oxodGuo por 1O_2 obtido no modo ESI+ adquirido no MS1.

O espectro de fragmentação MS/MS no modo ESI+ foi obtido desse produto purificado e foi comparado com o espectro de uma solução padrão de dSp preparada pela foto-oxidação da dGuo por azul de metileno. Ambos os espectros (Figura 4.32) apresentam as mesmas características que são análogas àquelas reportadas para a dSp formada pela oxidação por um elétron da 8-oxodGuo (Luo *et al.*, 2000).

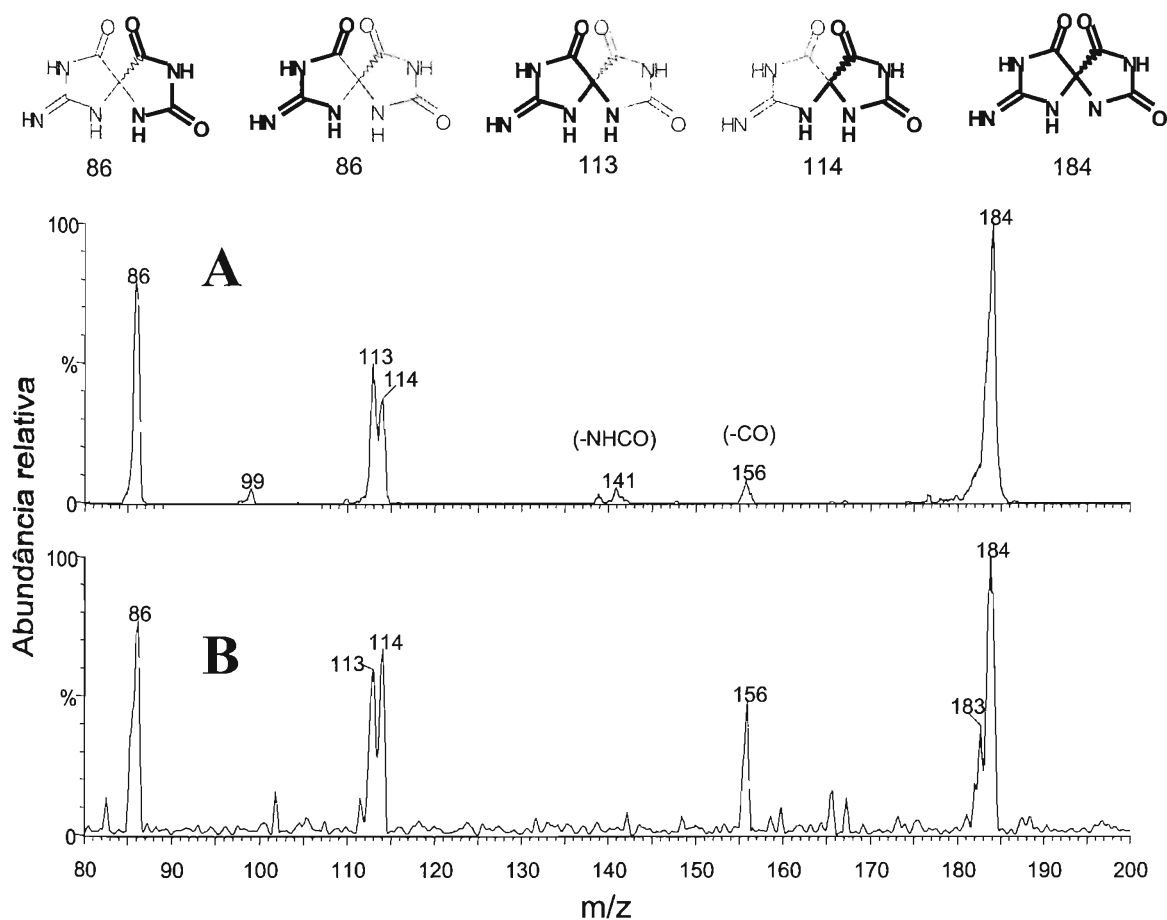


Figura 4.32 Espectro de fragmentação (MS/MS) da dSp obtido no modo ESI+. **(A)** Formada pela foto-oxidação da dGuo na presença de azul de metileno. **(B)** Formada pela oxidação da 8-oxodGuo por $^1\text{O}_2$ gerado pelo DHPNO₂.

A dSp formada pela reação da 8-oxodGuo com $^{18}\text{O}_2$ foi purificada e o espectro de massas obtido está representado na figura 4.33. Como seria esperado, observam-se os sinais em $m/z = 302$ e 186 referentes à molécula com incorporação de um átomo de oxigênio-18 e ao fragmento obtido pela perda da 2'-desoxirribose, respectivamente.

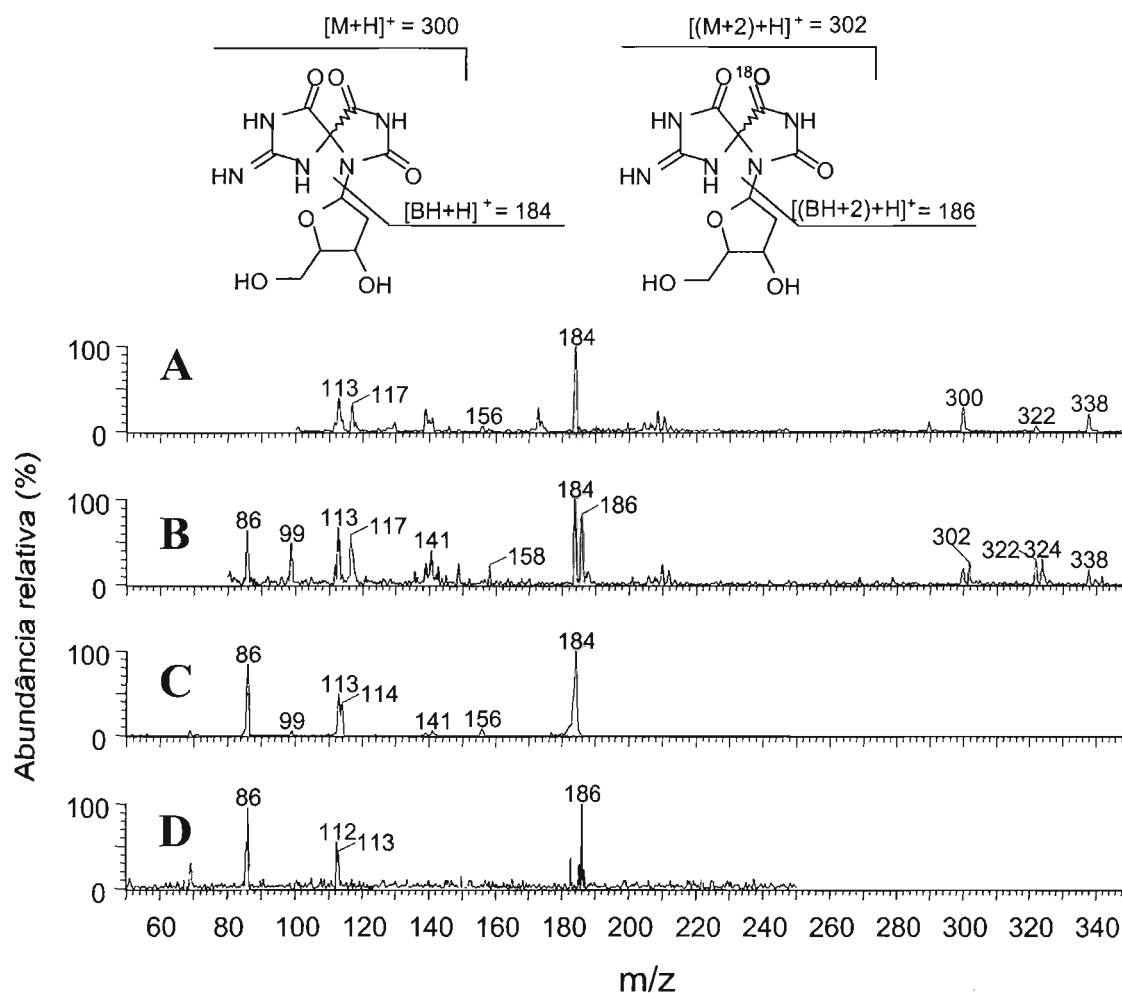


Figura 4.33 (A) Espectro de massas da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+. **(B)** Espectro de massas da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ obtido no modo ESI+. **(C)** Espectro de íons filhos da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$ obtido no modo ESI+ selecionando o íon com $m/z = 184$ no MS1. **(D)** Espectro de íons filhos da dSp formada pela reação de 8-oxodGuo com $^{18}[\text{}^1\text{O}_2]$ obtido no modo ESI+ selecionando o íon com $m/z = 186$ no MS1.

4.7.3 Separação por HPLC e detecção do precursor do ácido cianúrico

Como relatado por Raoul e Cadet (1996) na reação da 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$, produzido por fotossensibilização do tipo II, forma-se um nucleosídeo modificado que sofre hidrólise em condições alcalinas e gera ácido cianúrico e uréia.

No presente trabalho, na reação 8-oxodGuo com $^1\text{O}_2$ gerado pelo DHPNO₂, observa-se a formação de um produto que apresenta um sinal em $m/z = 288$ correspondente à molécula protonada do precursor do ácido cianúrico (Figura 4.34). Também é observado o fragmento em $m/z = 172$ correspondente à quebra da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose. O fragmento em $m/z = 130$ corresponde à perda do grupo $\text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{NH}$ da base nitrogenada. A presença do sinal em $m/z = 288$ na função de perda neutra de 116 u.m.a confirma que se trata de um nucleosídeo modificado.

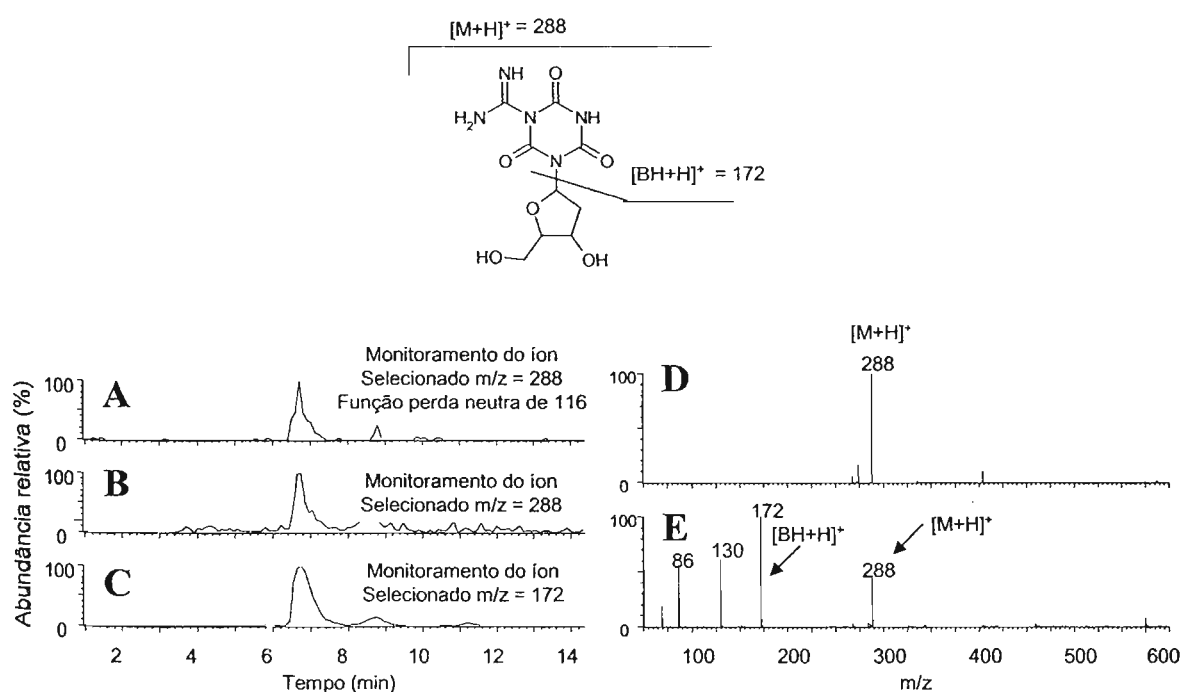


Figura 4.34 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI+ para o precursor do ácido cianúrico. (A) Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 288$ na função de perda neutra de 116 u.m.a. (B) Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 288$. (C) Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 172$. (D) Espectro de massas referente ao sinal em 7 min do cromatograma A. (E) Espectro de massas referente ao sinal em 7 min do cromatograma B.

Não foram detectados os sinais com intensidade razoável correspondentes às massas das moléculas protonadas $[\text{M}+\text{H}]^+$ do ácido cianúrico em $m/z = 246$ e da uréia em $m/z = 61$. Provavelmente isso ocorreu porque as análises foram feitas

imediatamente após a incubação com DHPNO₂ e o meio no qual a reação se processou não era alcalino, o que não permitiu uma hidrólise significativa.

4.7.4 Separação por HPLC e caracterização da guanidinohidantoína oxidada

Na oxidação por ¹O₂ da 8-oxodGuo quando inserida em oligonucleotídeo foi relatada a presença da dGh^{ox} como produto intermediário na formação do ácido oxalúrico (Duarte *et al.*, 2000). Trabalhos recentes (Luo *et al.*, 2001a e b; Chworos *et al.*, 2001), utilizando diferentes oxidantes, têm relatado a formação de derivados do tipo hidantoína.

No presente trabalho foi detectada a formação de um produto com massa molecular de 271 u.m.a. que poderia corresponder ao produto dGh^{ox} como proposto para oxidação da 8-oxoGua em oligonucleotídeos (Duarte *et al.*, 2000).

Com o intuito de se obter quantidade suficiente desse produto para caracterização estrutural, foram feitas várias fotossensibilizações com azul de metileno. Porém, as análises por HPLC e MS mostraram que nem sempre o resultado era reprodutivo. Por outro lado, quando se usava o endoperóxido DHPNO₂ para gerar ¹O₂, o produto era sempre detectado.

Sendo assim, a purificação do produto teve que ser realizada em duas etapas. Na primeira, o principal objetivo era eliminar o derivado de naftaleno e na segunda, isolar o produto.

A primeira etapa de purificação consistiu em coletar o eluente no intervalo de 7 a 15 min para separação feita por HPLC em coluna de fase reversa (seção 3.3.8.3). Esse intervalo de tempo foi escolhido com base nas análises por espectrometria de massas que indicaram que o produto apresentava um tempo de retenção em torno de 12 min.

A segunda purificação foi feita utilizando-se uma coluna de amina, na qual os produtos mais polares apresentam uma melhor separação e maior retenção (seção 3.3.8.3). Como pode ser observado na figura 4.35, o produto de *m/z* = 272 apresenta um tempo de retenção de 28 min. Esse padrão de separação foi utilizado para isolamento do composto. As coletas foram reunidas e liofilizadas para posterior análise no modo ESI+ e ESI-.

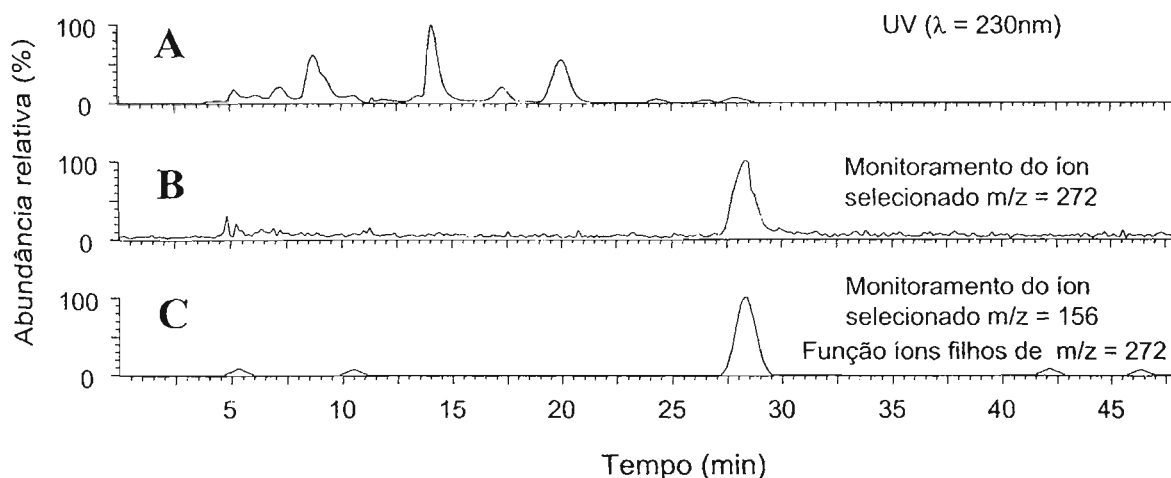


Figura 4.35 (A) Cromatograma com detecção UV em $\lambda = 230\text{ nm}$. **(B)** Cromatograma obtido selecionando a massa da dGh^{ox} em $m/z = 272$ para análise no modo ESI+. **(C)** Cromatograma obtido selecionando a massa do principal fragmento da dGh^{ox} $m/z = 156$ para análise no modo ESI+, na função de íons filhos de $m/z = 272$.

A análise do produto purificado foi feita novamente em coluna de fase reversa (seção 3.3.8.3). No espectro de massas do produto dGh^{ox} (Fig. 4.36D) observa-se um sinal referente ao íon com $m/z = 156$ e o correspondente aduto com sódio em $m/z = 294$. Na análise MS/MS (Fig. 4.36E e 4.36F) nota-se a presença de um fragmento em $m/z = 114$, indicando a perda de 42 u.m.a., conforme é observado para o oligonucleotídeo contendo dGh^{ox} (Duarte *et al.*, 2000). Este tipo de fragmentação é também sugerida por Chrowos *et al.* (2001) para a dGh^{ox} . Segundo esses autores, essa característica excluiria a possibilidade desse composto ser a iminoalantoína oxidada (dIa^{ox}). Por outro lado, esse padrão de fragmentação é apresentado por Luo *et al.* (2001b) para a dIa^{ox} . Esses autores não excluem a possibilidade de um equilíbrio entre a dGh^{ox} e a dIa^{ox} , embora não tenham apresentado uma comprovação experimental dessa hipótese.

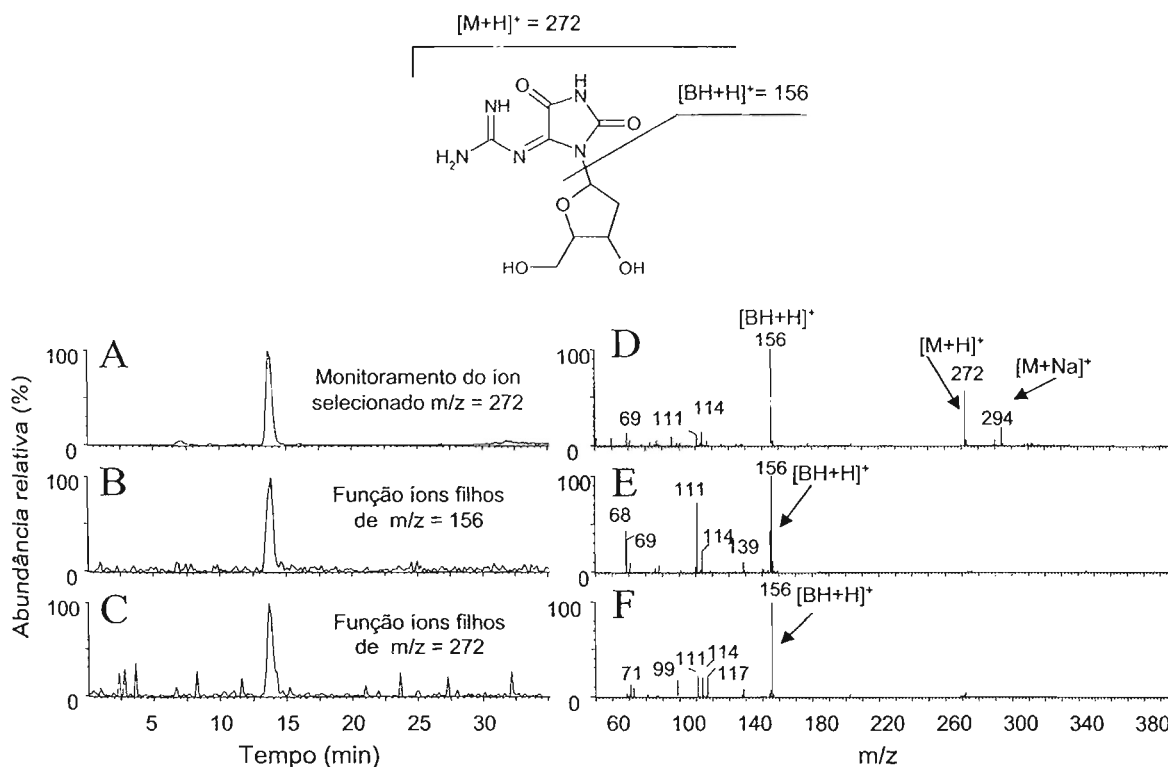


Figura 4.36 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI⁺ para a dGh^{ox}. **(A)** Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 272$ **(B)** Cromatograma obtido na função íons filhos de $m/z = 156$. **(C)** Cromatograma obtido na função íons filhos de $m/z = 272$. **(D)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma A. **(E)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma B. **(F)** Espectro de massas referente ao sinal em 14 min do cromatograma C.

As análises no modo negativo (Figura 4.37) mostram a presença do íon com $m/z = 270$ correspondente à dGh^{ox}. Observa-se ainda o fragmento em $m/z = 180$ gerado no processo de ionização. A formação do íon em $m/z = 180$, segundo mecanismo proposto por Hua *et al.* (2000), envolveria a quebra da ligação C-C e C-O no anel do açúcar. Em seguida, haveria desprotonação do grupo hidroxila na posição C3' e transferência da carga negativa do açúcar para a base através de um intermediário anular de seis membros com deslocamento do hidrogênio. Esse comportamento de fragmentação não é observado para dGuo e outros nucleosídeos, sendo preferencial para nucleosídeos modificados que tenham a

posição C8 oxidada (Hua *et al.*, 2000). O fragmento em $m/z = 222$ observado no espectro de fragmentação quando o íon $m/z = 270$ é selecionado no MS1 (Figura 4.37E) refere-se à perda de 48 u.m.a. da molécula. Essa perda pode ocorrer com a quebra da ligação entre C4' e C5' e eliminação de formaldeído e água (Hua *et al.*, 2000).

Um outro tipo de função de análise por MS/MS conhecida como “íons pais” também foi efetuada. Nesse caso, um provável fragmento é fixado no MS2 e são analisados, no MS1, os íons que deram origem ao fragmento selecionado. Como pode ser observado no espectro e pelo tempo de retenção (Figura 4.37C e F), esse íon com $m/z = 180$ foi originado pelo íon com $m/z = 270$.

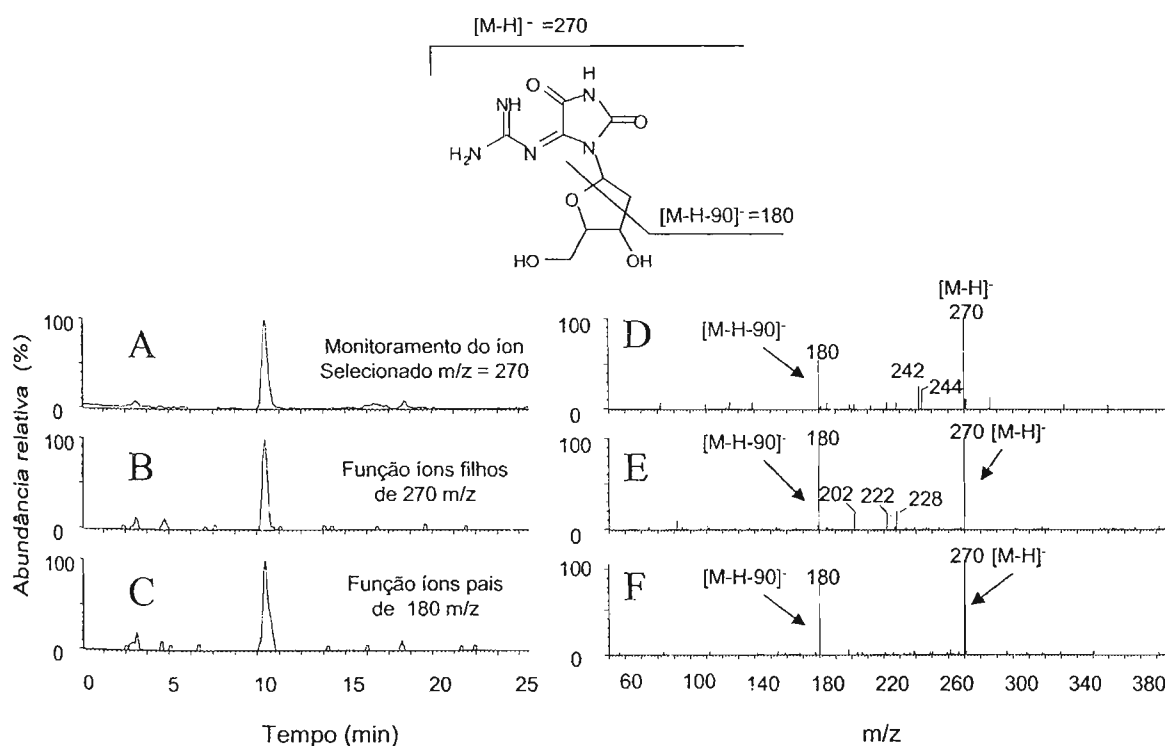


Figura 4.37 Cromatogramas e espectros de massas obtidos no modo ESI- para a *dGh^{ox}*. (A) Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z = 270$. (B) Cromatograma obtido na função íons filhos de $m/z = 270$. (C) Cromatograma obtido na função íons pais de $m/z = 180$. (D) Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma A. (E) Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma B. (F) Espectro de massas referente ao sinal em 11 min do cromatograma C.

4.8 Oxidação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

4.8.1 Separação por HPLC e caracterização dos produtos gerados na incubação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂

A incubação da 8-MeOdGuo com DHPNO₂ levou à formação dos produtos dlz, dOz e os diastereoisômeros da dSp contendo o grupo metoxi (8-MeOdSp). A presença desses produtos foi detectada pelas análises de HPLC-MS/MS, usando a função perda neutra de 116 u.m.a., onde se observam os sinais nos cromatogramas obtidos pela seleção dos respectivos íons com $m/z = 229$, 247 e 314 (Figura 4.38A, B e C). Para incubação com o DHPN¹⁸O₂, os cromatogramas obtidos pela seleção dos respectivos íons com $m/z = 231$, 249 e 316 mostram que houve incorporação de oxigênio-18 nos produtos (Figura 4.38D, E e F).

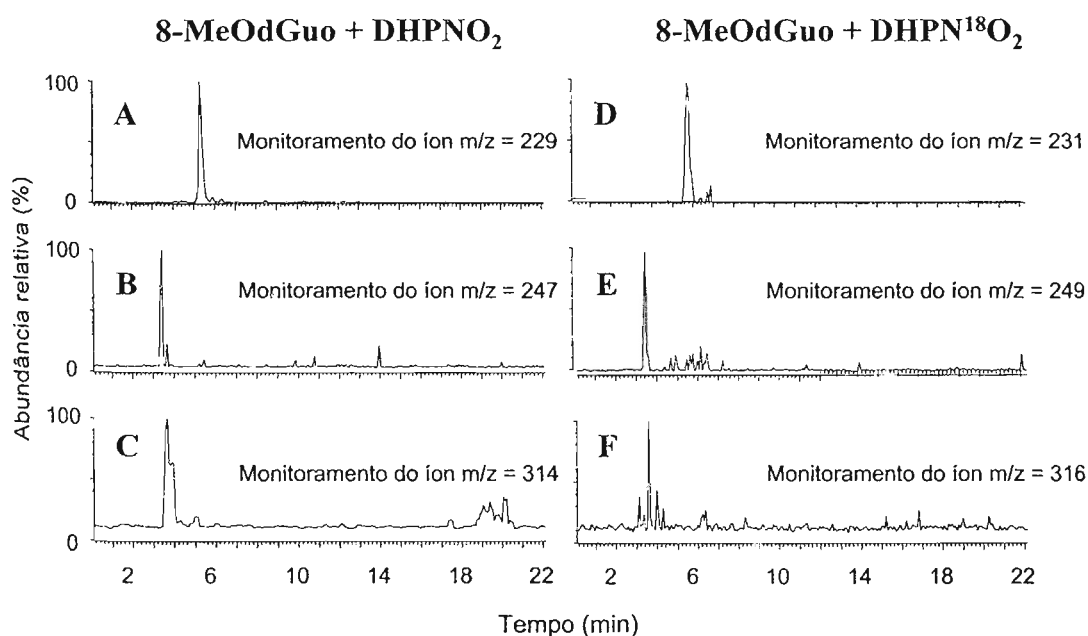


Figura 4.38 Cromatogramas obtidos na função de perda neutra de 116 u.m.a. para os produtos formados na reação de 8-MeOdGuo com ¹O₂ ou ¹⁸[¹O₂]. **(A)** Selecionando o íon em $m/z = 229$ referente à dlz. **(B)** Selecionando o íon em $m/z = 247$ referente à dOz. **(C)** Selecionando o íon em $m/z = 314$ referente à 8-MeOdSp. **(D)** Selecionando o íon em $m/z = 231$ referente à dlz marcada com oxigênio-18. **(E)** Selecionando o íon em $m/z = 249$ referente à dOz marcada com oxigênio-18. **(F)** Selecionando o íon em $m/z = 316$ referente à 8-MeOdSp marcada com oxigênio-18.

O espectro de massas da região correspondente ao tempo de retenção da dlz indicado no cromatograma A da figura 4.38, mostra o íon com $m/z = 229$ detectado na função de perda neutra de 116 u.m.a. (Figura 4.39A). Por sua vez, para a incubação da 8-MeOdGuo com DHPN¹⁸O₂ observa-se no espectro de massas os produtos com $m/z = 231$ e 229 (Figura 4.39B).

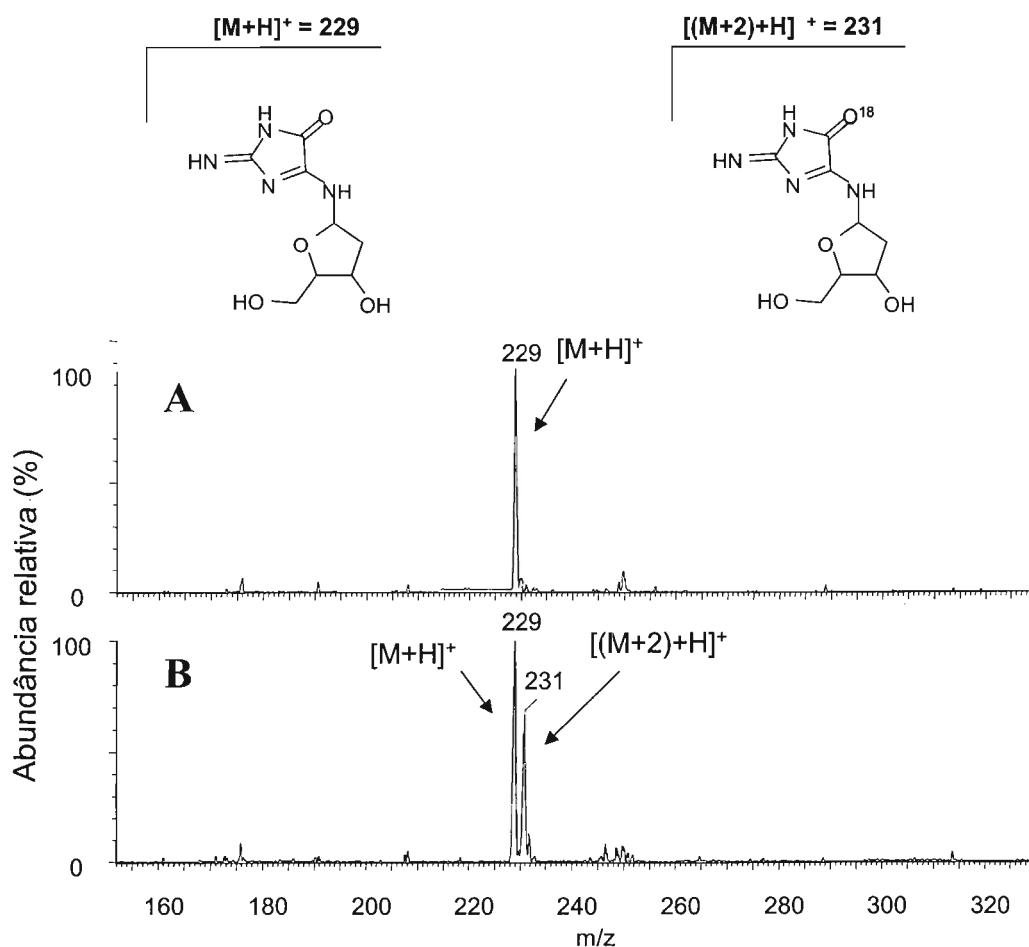


Figura 4.39 (A) Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. para o produto dlz. **(B)** Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. para o produto dlz marcado com oxigênio-18.

No espectro de massas da figura 4.40A, o sinal em $m/z = 247$ refere-se à molécula de oxazolona protonada $[dOz+H]^+$. Uma vez que a 8-MeOdSp tem o mesmo tempo de retenção que a dOz nessa condição de HPLC, observa-se

também nesse mesmo espectro a presença do sinal em $m/z = 314$ referente à molécula protonada $[8\text{-MeOdSp+H}]^+$.

O espectro de massas dos produtos formados pela oxidação da 8-MeOdGuo com $^{18}\text{O}_2$, mostra o íon molecular $[(dOz+2)+H]^+$ em $m/z = 249$ e $[(8\text{-MeOdSp+2})+H]^+$ em $m/z = 316$ indicando um aumento de 2 u.m.a em relação aos compostos não marcados (Figura 4.40B).

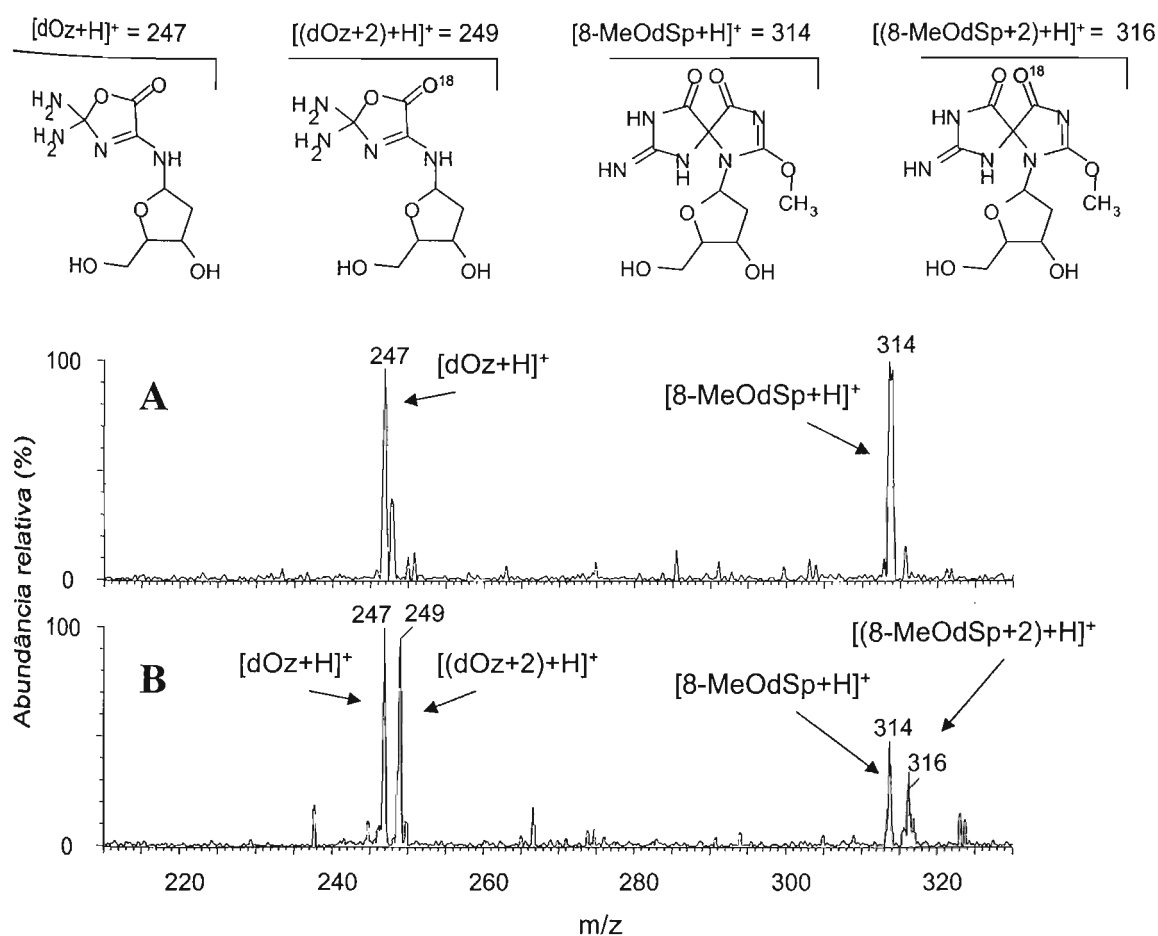


Figura 4.40 (A) Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. do produto dOz e 8-MeOdGuo. **(B)** Espectro de massas obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. dos produtos dOz e 8-MeOdGuo marcados com oxigênio-18.

Foi observada a presença de um íon com $m/z = 191$. Esse íon foi detectado na função de perda neutra de 116 u.m.a. tanto na incubação com DHPNO_2 (Figura 4.41A) como na incubação com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ (Figura 4.41B). Entretanto, não

se observa o incremento de 2 u.m.a. referente à inserção de oxigênio-18 na reação com o DHPN¹⁸O₂. O espectro de massas obtido mostra um sinal intenso em m/z 191. A estrutura proposta para esse produto, considerando a estrutura da 8-MeOdGuo e os dados obtidos, está representada na figura 4.41.

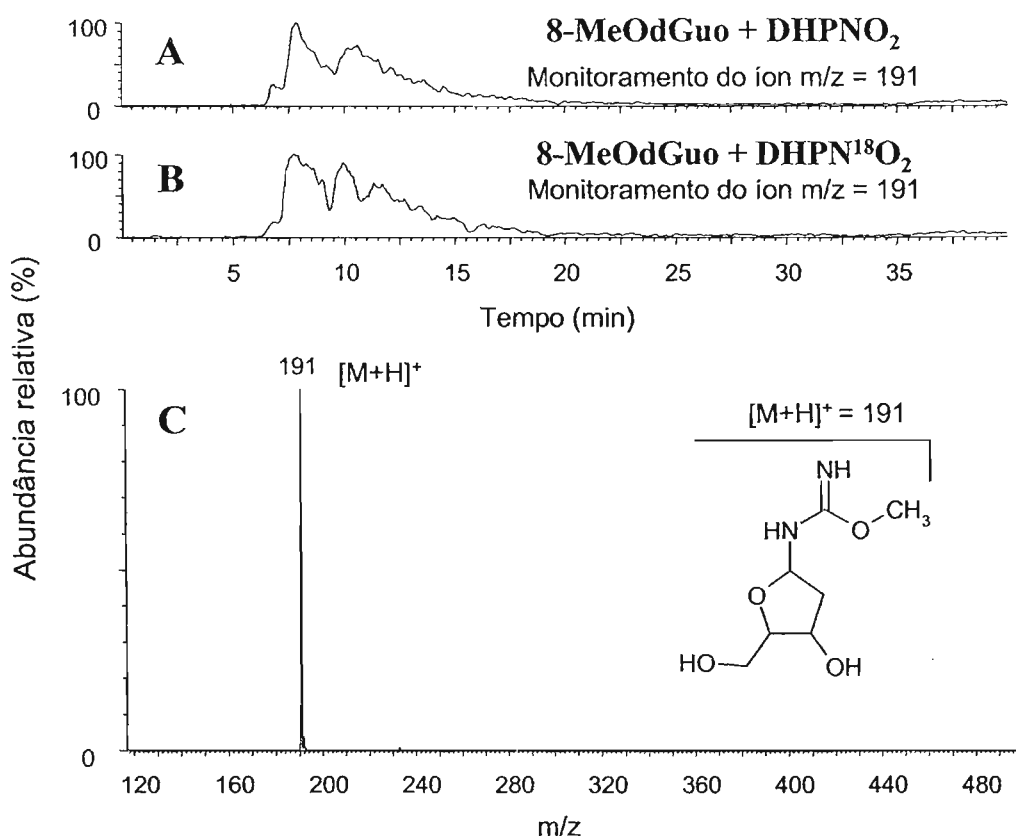


Figura 4.41 (A) Cromatograma obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando a massa de $m/z = 191$ do produto formado na reação de 8-MeOdGuo com ¹O₂. (B) Cromatograma obtido na função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando a massa de $m/z = 191$ do produto formado na reação de 8-MeOdGuo com ¹⁸[¹O₂]. (C) Espectro de massas da região mostrada nos cromatogramas A e B.

Como mostram os cromatogramas e os espectros de massas da figura 4.42, um outro produto de $m/z = 286$ foi detectado na incubação com DHPNO₂. Do mesmo modo, o respectivo produto marcado com oxigênio-18 ($m/z = 288$) formado na incubação com DHPN¹⁸O₂ também foi detectado.

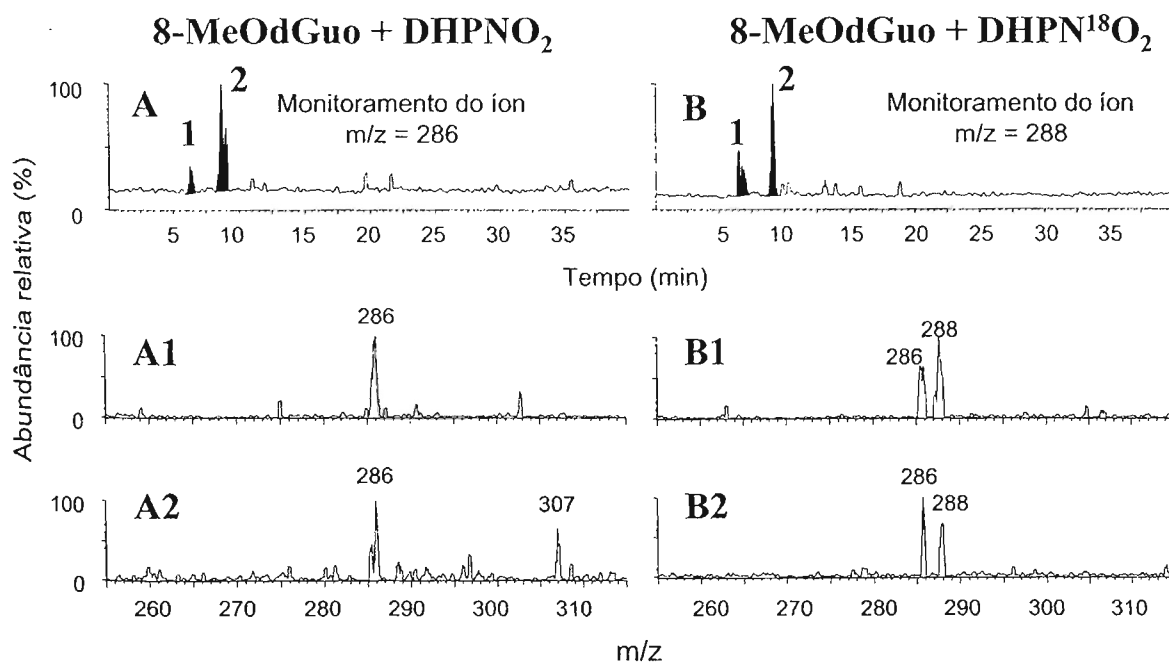


Figura 4.42 (A) Cromatograma obtido pela função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando o íon $m/z = 286$ na reação de 8-MeOdGuo com DHPNO₂. **(A1)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma A. **(A2)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma A. **(B)** Cromatograma obtido pela função de perda neutra de 116 u.m.a. selecionando o íon de $m/z = 288$ na reação de 8-MeOdGuo com DHPNO¹⁸O₂. **(B1)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma B. **(B2)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma B.

Foi também obtido o espectro de íons filhos desses produtos (Figura 4.43). Observa-se que, em ambos os casos, os fragmentos obtidos são muito parecidos e não foi possível observar um fragmento que indicasse que as estruturas desses dois compostos fossem diferentes.

Em analogia aos produtos detectados na oxidação da 8-oxodGuo por ¹O₂ essa massa corresponderia ao produto dGh^{ox} com o grupo metóxi. Contudo, a análise de fragmentação desse íon (Figura 4.43) mostrou que sua estrutura é, mais provavelmente a dIa^{ox} contendo o grupo metóxi. A perda de (CNHOCH₃) do fragmento da base protonada [BH+H]⁺ seria responsável pela formação do fragmento com $m/z = 113$ e $m/z = 115$ para o correspondente marcado.

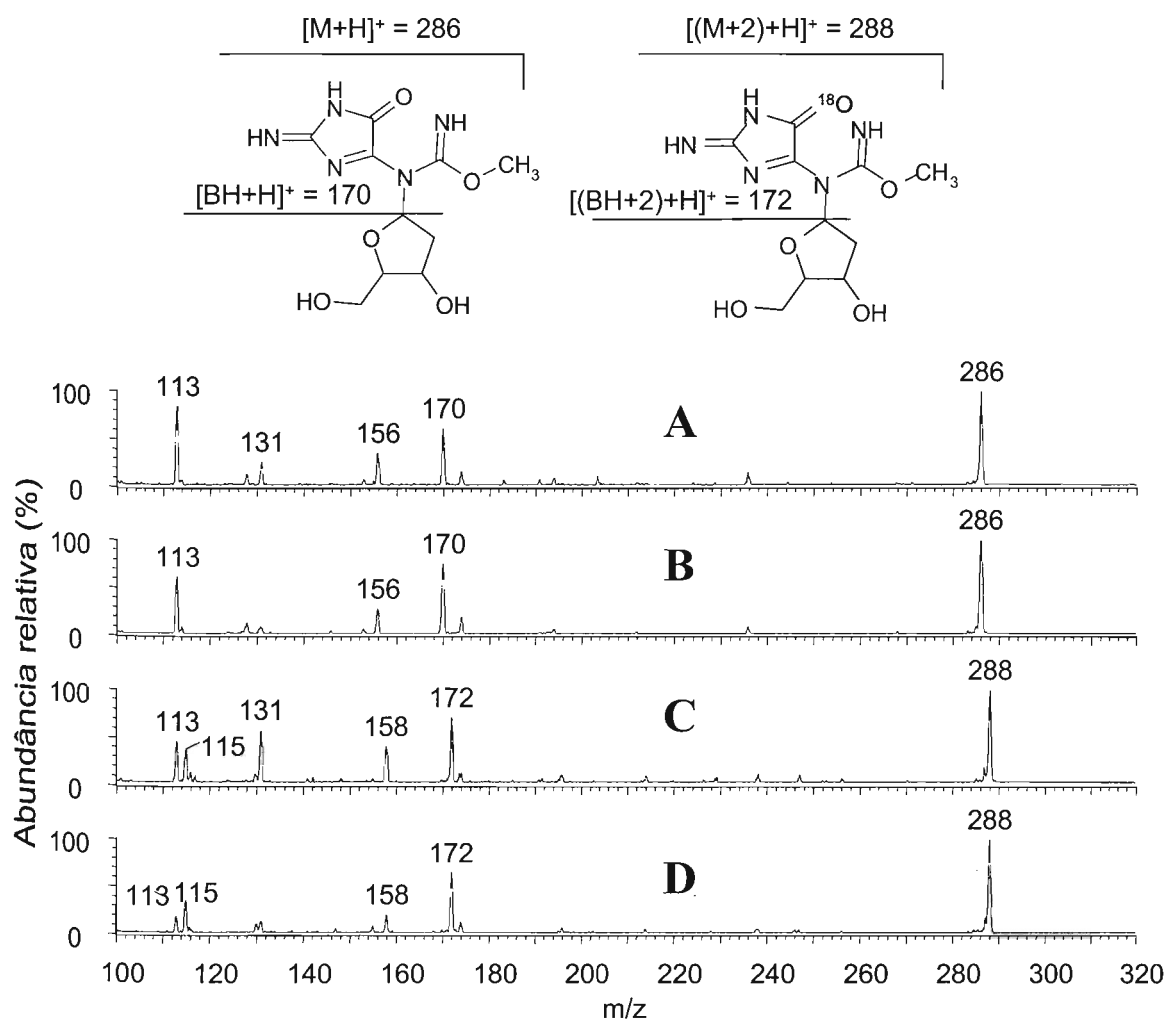


Figura 4.43 Espectros de massas na função de íons filhos obtido no modo ESI+ para o produto formado na reação da 8-MeOdGuo com $^{16}\text{O}_2$ ou $^{18}\text{O}_2$. **(A)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma A da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 286$ no MS1. **(B)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma A da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 286$ no MS1. **(C)** Espectro de massas do pico 1 do cromatograma B da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 288$ no MS1. **(D)** Espectro de massas do pico 2 do cromatograma B da figura 4.42 na função de íons filhos selecionando o íon de $m/z = 288$ no MS1.

A comparação do consumo de 8-oxodGuo e 8-MeOdGuo (Figura 4.44) com o tempo, quantificadas utilizando a área do sinal no cromatograma com detecção no UV a $\lambda = 260$ nm, mostra que ambos substratos apresentam uma reatividade semelhante na reação à 10°C.

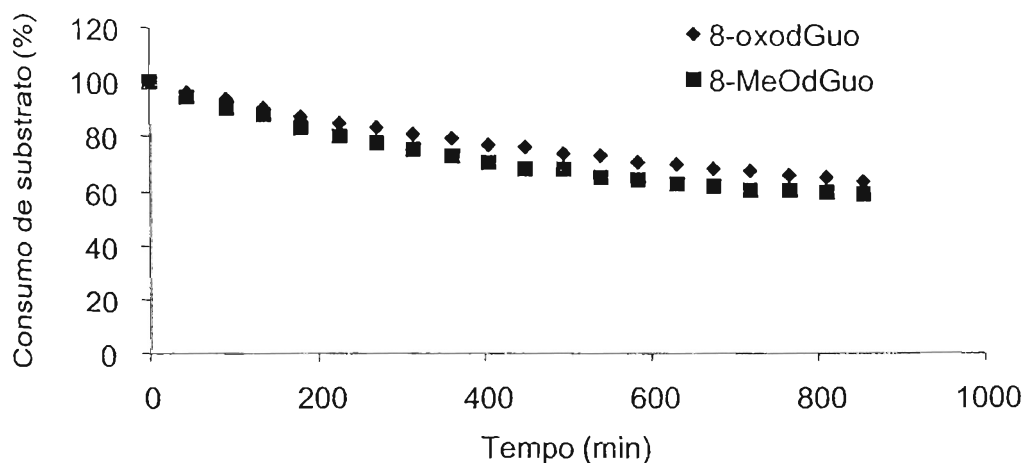


Figura 4.44 Comparação do consumo de 8-MeOdGuo e 8-oxodGuo na reação com 1O_2 produzido pela termólise de 10 mM do endoperóxido DHPNO₂ à 10°C.

4.9 Preparação e utilização do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina

A reatividade da 8-MeOdGuo frente ao 1O_2 foi também avaliada quando esta é incorporada em oligonucleotídeo.

4.9.1 Purificação por HPLC e caracterização do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina

Na figura 4.45A é mostrada a análise por HPLC do material resultante da síntese do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo. O sinal correspondente ao oligonucleotídeo esperado está indicado no cromatograma. Além do sinal referente ao produto esperado, existem ainda mais dois outros sinais referentes, provavelmente, a fragmentos de oligonucleotídeo originados pela síntese incompleta ou pela formação de uma seqüência indesejada.

Para realizar estudos com o oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo, este precisou ser purificado. Na figura 4.45B observa-se o cromatograma referente ao produto obtido após a purificação. Na análise por MS no modo ESI- (Figura 4.46), observa-se um sinal $[M-H]^-$ em $m/z = 904$ referente ao oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo, confirmando sua integridade após a purificação.

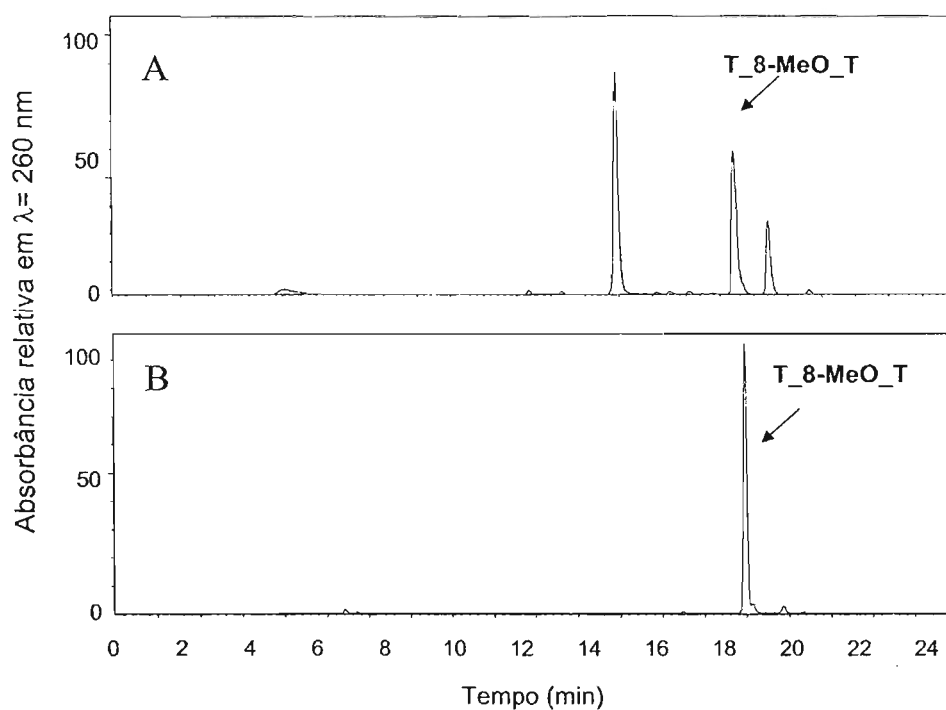


Figura 4.45 (A) Cromatograma do material bruto da síntese do T_8-MeO_T, no qual está indicado o sinal referente ao produto esperado. **(B)** Cromatograma do produto T_8-MeO_T após purificação.

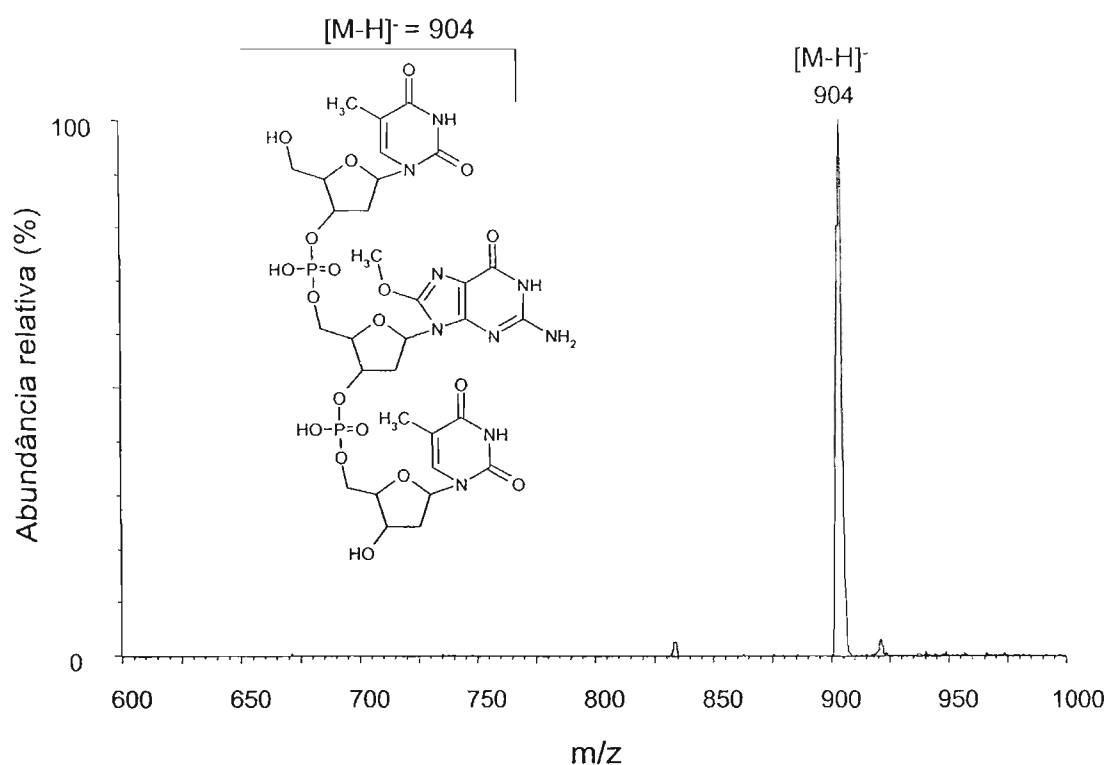


Figura 4.46 Espectro de massas obtido para o oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo no modo ESI-.

4.9.2 Separação por HPLC e caracterização do produto gerado na incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-metoxi-2'-desoxiguanosina com DHPNO₂

O principal produto observado por espectrometria de massas na incubação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo com o endoperóxido DHPNO₂ foi o oligonucleotídeo com sinal em $m/z = 835$ (Figura 4.47 B e D), o qual corresponde à dlz. Observa-se ainda, na figura 4.47 A e C, o cromatograma e o espectro de massas com sinal em $m/z = 904$ referente ao oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo que não sofreu reação.

Esse produto também foi observado anteriormente para foto-oxidação de um oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo usando riboflavina (Ikeda e Saito, 1999). Utilizando-se desse sistema para o oligonucleotídeo T_8-MeOdGuo_T, o produto formado co-eluiu com o T_lz_T, confirmando a formação dessa lesão (dados não mostrados). Ao contrário do que ocorre na oxidação por ¹O₂ da 8-oxodGuo quando inserida em oligonucleotídeos (Duarte *et al.*, 2000), no presente caso, a guanidino-hidantoína oxidada ou ácido oxalúrico não foram detectados.

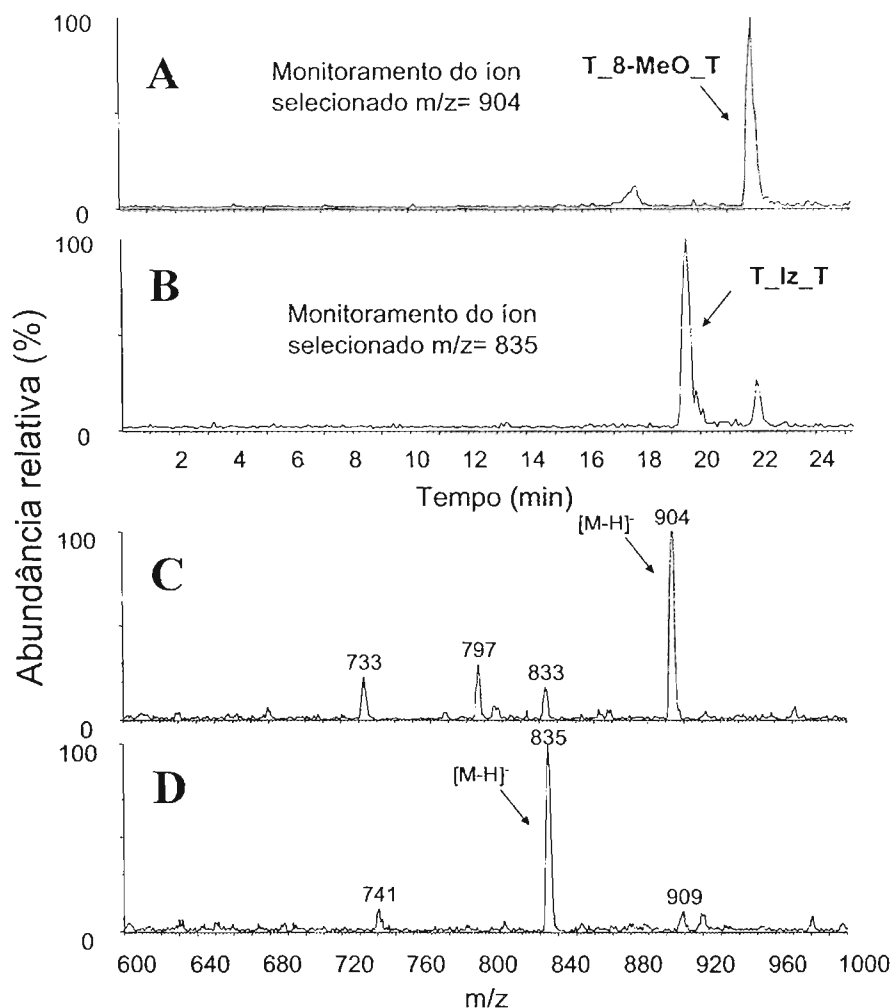


Figura 4.47 Cromatogramas obtidos para análise em HPLC e análise por MS no modo ESI-. **(A)** Monitoramento do íon de $m/z = 904$. **(B)** Monitoramento do íon de $m/z = 835$. **(C)** Espectro de massas obtido no modo ESI- para o oligonucleotídeo detectado no cromatograma A. **(D)** Espectro de massas obtido no modo ESI- para o oligonucleotídeo detectado no cromatograma B.

4.10 Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete

Foram determinadas as constantes de desativação total (k_r+k_t) do $^1\text{O}_2$ dos nucleosídeos pelo decaimento da luminescência em 1270 nm usando água deuterada como solvente. O gráfico de k_{obs} em função da concentração do desativador está exemplificado na figura 4.48 para a 8-MeOdGuo.

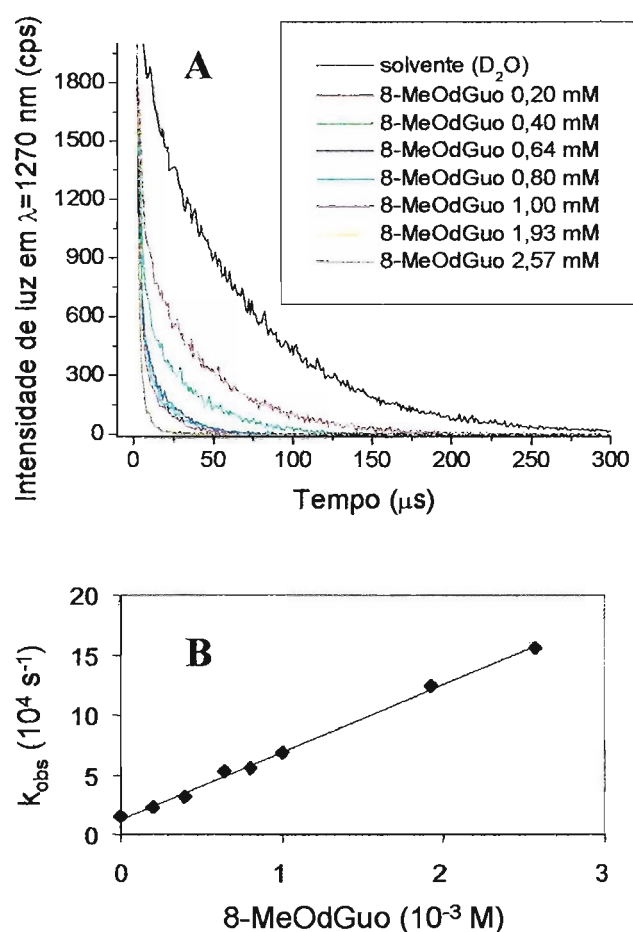


Figura 4.48 (A) Decaimento da luminescência em 1270 nm e efeito do desativador no tempo de vida do $^1\text{O}_2$. **(B)** Gráfico da k_{obs} em função da concentração do desativador.

A tabela 4.2 mostra os valores de k_t obtidos para a 8-MeOdGuo, dGuo, 8-oxoGuo e tampão fosfato. Para comparação foi determinada a constante da azida de sódio. Os valores experimentais para o tempo de vida médio do $^1\text{O}_2$ em D_2O ficaram em torno de 65 μs .

O valor de $5,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foi reportado anteriormente (Lee e Rodgers, 1987) para dGuo em sistema aquoso está bem próximo ao determinado no presente trabalho.

Tabela 4.2 Constantes de desativação total ($k_t = k_r + k_q$) do $^1\text{O}_2$

Composto	k_t ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
dGuo	5,39
8-oxodGuo	58,7
8-MeOdGuo	56,2
Tampão fosfato	0,21
NaN_3	528

4.11 Formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em DNA por oxigênio singlete

4.11.1 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de timo de bezerro

A seguir, são apresentados os resultados referentes à detecção de 8-oxodGuo formada no tratamento de DNA-TB com quantidades crescentes dos endoperóxidos DHPNO₂ e NDPO₂. Na figura 4.49 pode-se observar um aumento significativo na formação dessa lesão com o aumento da concentração dos endoperóxidos. O DHPNO₂ foi um pouco mais eficiente que o NDPO₂, principalmente em concentrações mais altas.

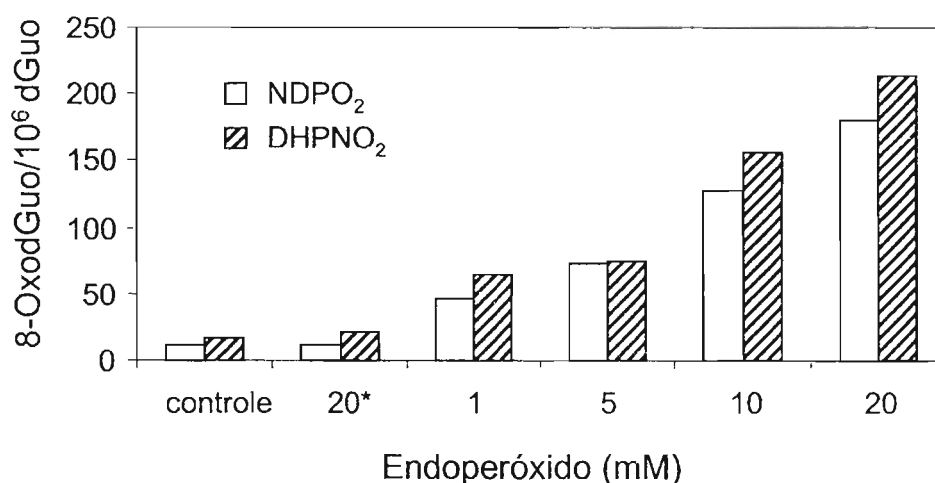


Figura 4.49 Quantidades de 8-oxodGuo formada pela oxidação de DNA-TB por $^1\text{O}_2$ gerado pelos endoperóxidos. Controle refere-se às incubações contendo somente DNA-TB e o símbolo 20* refere-se à incubação de DNA-TB com 20 mM de NDPO₂ ou DHPNO₂ termodecompostos.

O produto dSp não foi detectado nas amostras de DNA hidrolisado. Esse resultado está de acordo com trabalhos que mostraram que em nucleosídeo livre, o produto majoritário da oxidação da dGuo é a dSp (Ravanat e Cadet, 1995, Niles *et al.*, 2001) e o produto principal formado pela exposição de DNA a $^1\text{O}_2$ é a 8-oxodGuo (Ravanat e Cadet, 1995 e Cadet *et al.*, 1997).

4.11.2 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de células de fibroblastos

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que o tratamento com os endoperóxidos, assim como o NDP e DHPN, não diminuem a viabilidade celular.

Na figura 4.50 estão mostrados os cromatogramas com detecção eletroquímica da 8-oxodGuo formada em DNA de células controle e tratadas com DHPNO₂. Para efeitos comparativos, a análise da amostra do padrão de 8-oxodGuo também está apresentada.

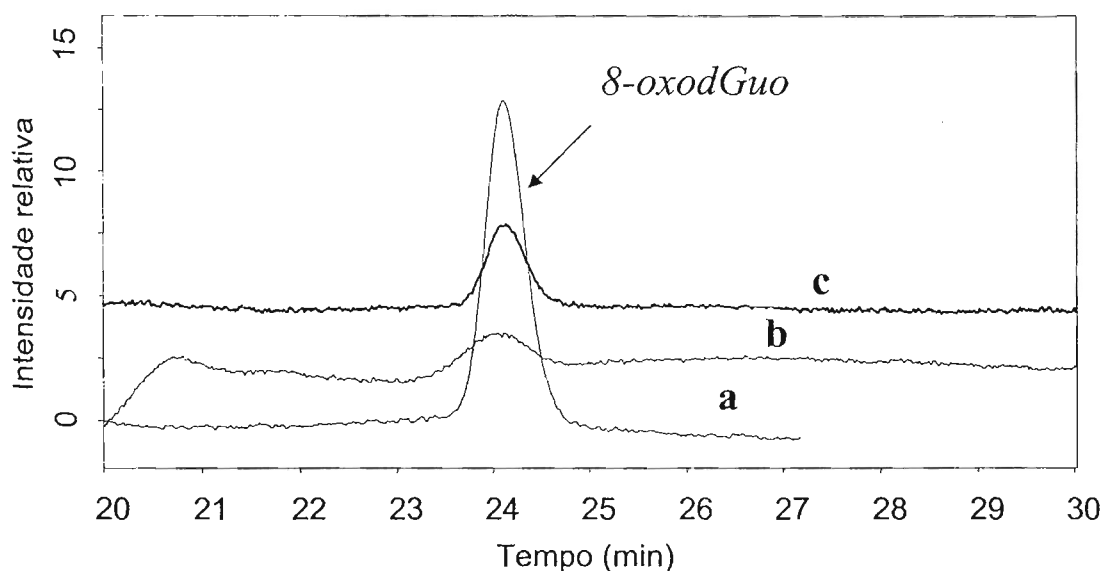


Figura 4.50 Cromatogramas de detecção da 8-oxodGuo. (a) Padrão de 5 pmol de 8-oxodGuo. (b) Amostra do DNA extraído das células que não foram tratadas com os endoperóxidos. (c) Amostra do DNA extraído das células que foram tratadas com 5 mM de DHPNO₂.

A quantificação da 8-oxodGuo no DNA extraído das células (Figura 4.51) mostrou níveis basais em torno de 5 lesões por 10^6 dGuo. As incubações com os endoperóxidos dos derivados de naftaleno termodecompostos não resultou em aumento significativo do número de lesões. Entretanto, quando as células de fibroblastos são incubadas com 5 mM de DHPNO₂, observa-se um aumento considerável (cerca de 3 vezes) do número de lesões.

A incubação das células com 5 mM de NDPO₂ não causou um aumento dos níveis de 8-oxodGuo como ocorreu com o tratamento com DHPNO₂.

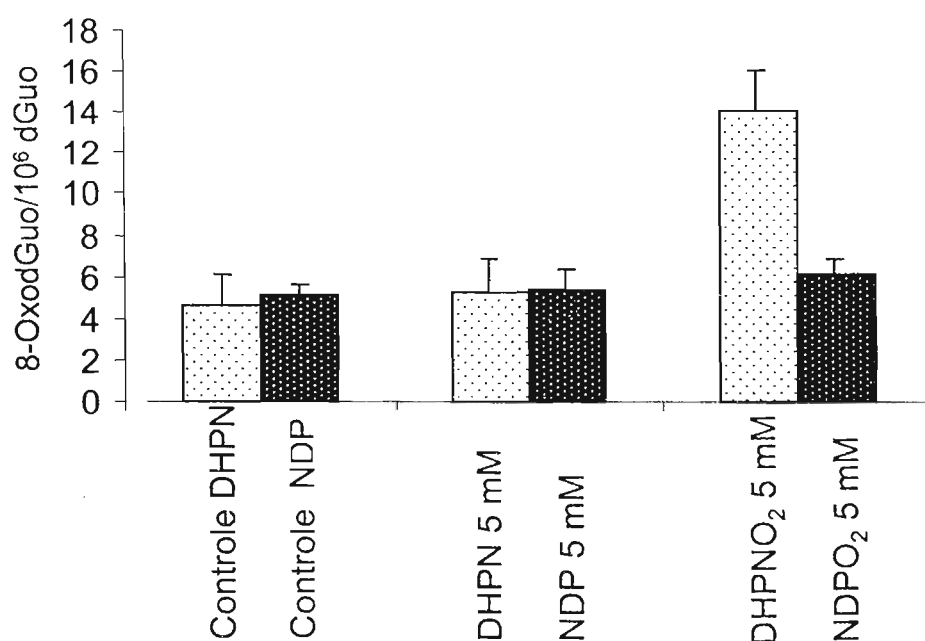


Figura 4.51 Comparação entre as quantidades de 8-oxodGuo formada pela oxidação do DNA celular de fibroblastos quando tratados com ¹O₂ gerado pelos endoperóxidos.

4.11.3 Detecção e quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina formada em DNA de células de monócitos

O tratamento das células de fibroblastos com DHPNO₂ ou NDPO₂ com posterior detecção da 8-oxodGuo mostrou que o DHPNO₂ é mais adequado nesse caso, pois, como já era esperado por seu caráter não-iônico, a liberação de ¹O₂ é intracelular.

Como a 8-oxodGuo é uma lesão que pode ser formada por outras espécies reativas além do ¹O₂, seria interessante diferenciar a lesão causada diretamente

pela reação do $^1\text{O}_2$ daquela formada por outras possíveis espécies geradas pelo estresse provocado pela presença do $^1\text{O}_2$ no meio celular.

Usando o DHPN $^{18}\text{O}_2$ foi possível demonstrar que o $^1\text{O}_2$ é capaz de lesar diretamente o DNA celular levando à formação da 8-oxodGuo. Nesse caso, a lesão contém o átomo de oxigênio-18 (Figura 4.52).

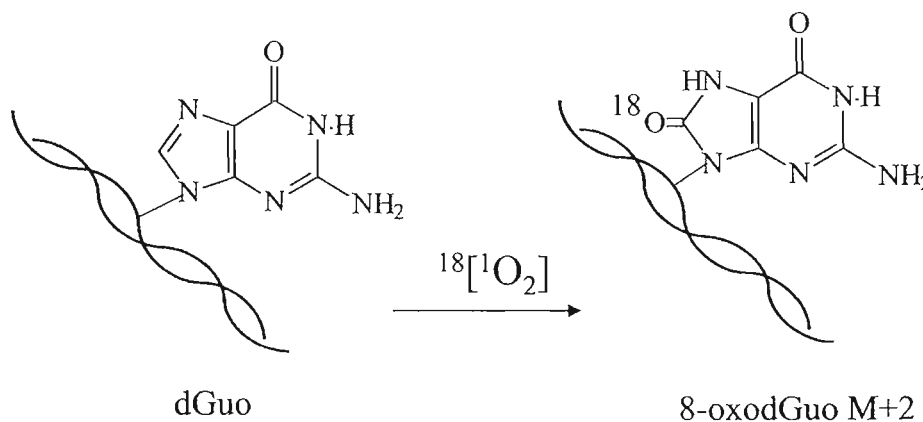


Figura 4.52 Reação do oxigênio singlete $^{18}[^1\text{O}_2]$ com a guanina em DNA.

Para quantificação por HPLC-MS/MS adicionou-se uma quantidade conhecida de padrão interno, a 8-oxodGuo (M+5) isotopicamente marcada com os nitrogênios ^{15}N (Figura 3.8, seção 3.3.18.2), antes de submeter a amostra à digestão enzimática.

Observa-se que no cromatograma referente ao controle (Figura 4.53) não há sinal para transição referente à 8-oxodGuo marcada com oxigênio-18 (^{18}O -8-oxodGuo, M+2, Figura 3.8, seção 3.3.18.2). Entretanto, o método foi sensível o bastante para medir 8-oxodGuo (M, Figura 3.8, seção 3.3.18.2) formada endogenamente pelo próprio metabolismo celular. Quando as células foram incubadas com DHPNO $_2$ um aumento no nível de 8-oxodGuo (M) foi observado e não se detectou a presença da 8-oxodGuo (M+2). Quando as células foram incubadas com endoperóxido DHPN $^{18}\text{O}_2$ um pequeno aumento foi observado no nível de 8-oxodGuo (M) e, nesse caso, a ^{18}O -8-oxodGuo (M+2) foi claramente detectada (Figura 4.53). Os resultados obtidos após o tratamento das células com duas concentrações diferentes do endoperóxido DHPN $^{18}\text{O}_2$ são mostradas na figura 4.54.

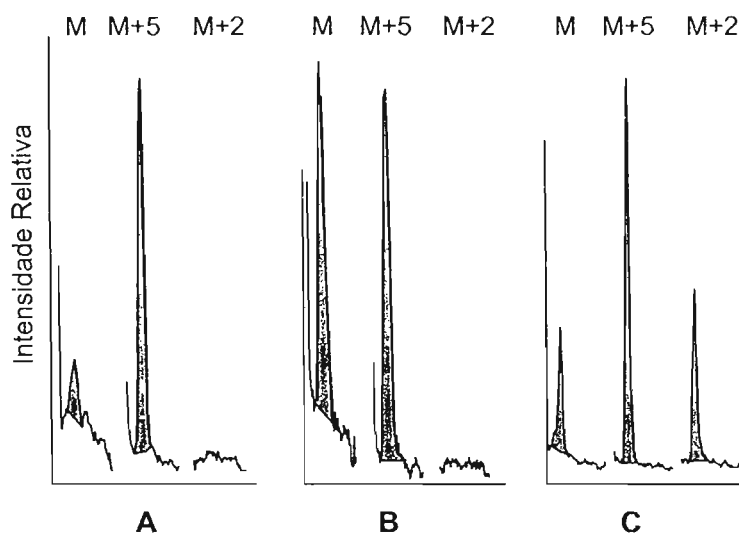


Figura 4.53 Cromatogramas de HPLC-MS/MS obtidos para detecção de 8-oxodGuo em DNA extraído de células de monócitos. **(A)** Células sem nenhum tratamento. **(B)** Células tratadas com endoperóxido não-marcado DHPNO₂. **(C)** Células tratadas com endoperóxido isotopicamente marcado DHPN¹⁸O₂. Para cada exemplo, o equipamento foi configurado para monitorar as transições de m/z 284→168 referente à 8-oxodGuo (M), 286→170 referente à ¹⁸O-8-oxodGuo (M+2) e 289→173 referente à 8-oxodGuo (M+5).

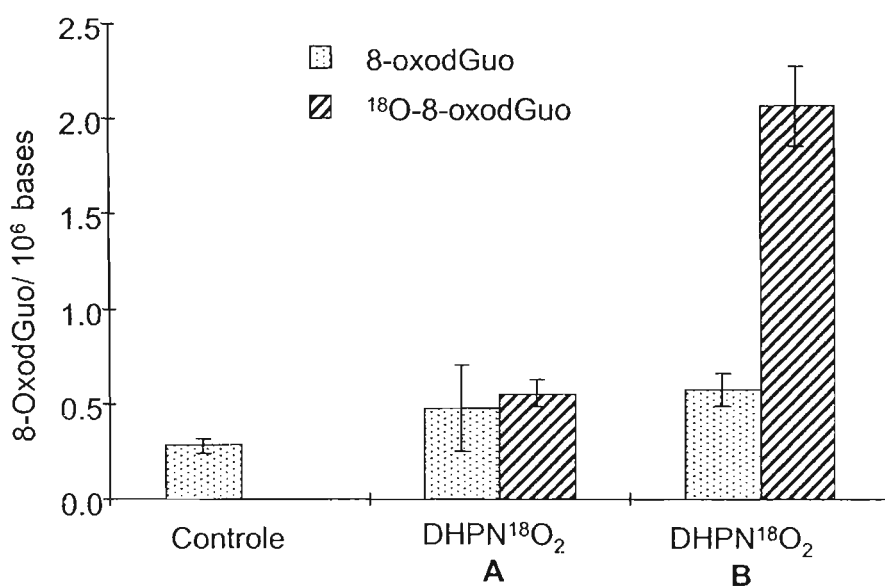


Figura 4.54 Formação de 8-oxodGuo e ¹⁸O-8-oxodGuo em DNA de células de monócitos. **(A)** Incubadas com 6,5 mM de DHPN¹⁸O₂. **(B)** Incubadas com 16 mM de DHPN¹⁸O₂.

Um outro tratamento foi feito para avaliar a geração de ^{18}O [$^1\text{O}_2$] intracelular. As células foram pré-incubadas com o $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ a 4°C por 15 min para permitir a penetração do endoperóxido. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação para remover o excesso de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$, ressuspensas em tampão PBS-A e incubadas a 37°C . Utilizando-se essas condições, a ^{18}O -8-oxodGuo (M+2) pôde ser detectada (Figura 4.55, coluna C). Entretanto, sem remover o excesso de endoperóxido, um nível três vezes maior da lesão foi medida (Figura 4.55, coluna D). A incubação com endoperóxido a 4°C por 1 h não mostrou a formação da lesão (Figura 4.55, coluna B).

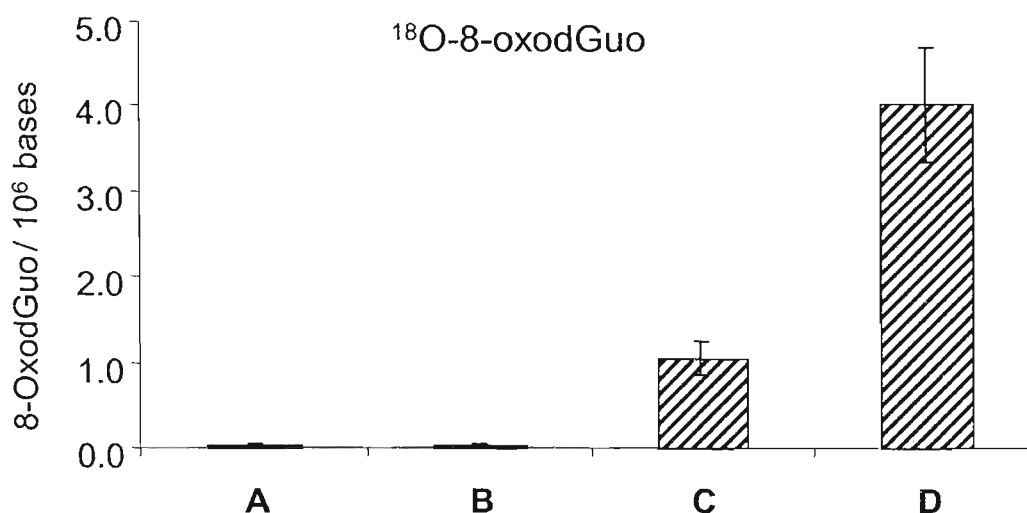


Figura 4.55 Formação de ^{18}O -8-oxodGuo (M+2) em DNA de células de monócitos incubadas com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. **(A)** Células incubadas a 37°C por 1 h sem endoperóxido. **(B)** Células incubadas com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ a 4°C por 1 h. **(C)** Células pré-incubadas com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ a 4°C por 15 min e lavadas com PBS e posterior incubação a 37°C por 1 h. **(D)** Células incubadas com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ a 37°C por 1 h.

Discussão

5 Discussão

5.1 Endoperóxidos de derivados de naftaleno como fonte química de oxigênio singlete

A investigação sobre a formação do $^1\text{O}_2$ em processos biológicos como na peroxidação lipídica, fagocitose e exposição aos raios UVA da radiação solar levou a uma questão fundamental sobre o papel dessa espécie no meio celular. Suas propriedades físico-químicas indicam que biomoléculas essenciais como ácidos graxos da membrana celular, aminoácidos de proteínas e bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos poderiam sofrer processos oxidativos levando à alteração de suas funções celulares e, em alguns casos, à destruição da célula. Por outro lado, outros componentes presentes no meio celular, como carotenóides, poderiam contribuir para proteção da célula desativando o $^1\text{O}_2$. Desta forma, experimentos utilizando uma fonte adequada de $^1\text{O}_2$ são necessários para esclarecer como ocorrem tais processos celulares, assim como, avaliar suas conseqüências.

Um dos métodos mais utilizados para gerar $^1\text{O}_2$ é a fotossensibilização (1.2.1.5.1). Nesse processo existem dois mecanismos competitivos: tipo I, onde há transferência de elétron entre o sensibilizador no estado excitado triplete ($^3\text{sens}^*$) e componentes do sistema gerando íons radicais e tipo II, no qual há transferência de energia do $^3\text{sens}^*$ para o O_2 ($^3\Sigma_g$) gerando $^1\text{O}_2$. Vários parâmetros influenciam sobre o mecanismo predominante num dado processo de fotossensibilização como: natureza do sensibilizador, comprimento de onda da luz, solvente, concentração de O_2 e natureza do substrato. Dessa maneira, torna-se difícil a atribuição inequívoca dos efeitos observados ao $^1\text{O}_2$.

Em geral, estruturas moleculares que favorecem a química do tipo I (interação sensibilizador-substrato) são aquelas que são facilmente oxidadas ou reduzidas. Compostos que não são tão facilmente oxidados ou reduzidos favorecem a formação de $^1\text{O}_2$ (mecanismo tipo II). Benzofenona e riboflavina (Figura 5.1) são exemplos de sensibilizadores que favorecem o mecanismo tipo I. Além disso, para alguns sensibilizadores como o azul de metileno (Figura 5.1), a concentração de O_2 e de substrato na solução influencia de tal maneira no

processo que o mecanismo predominante na fotossensibilização pode mudar ou os dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente (Foote, 1991).

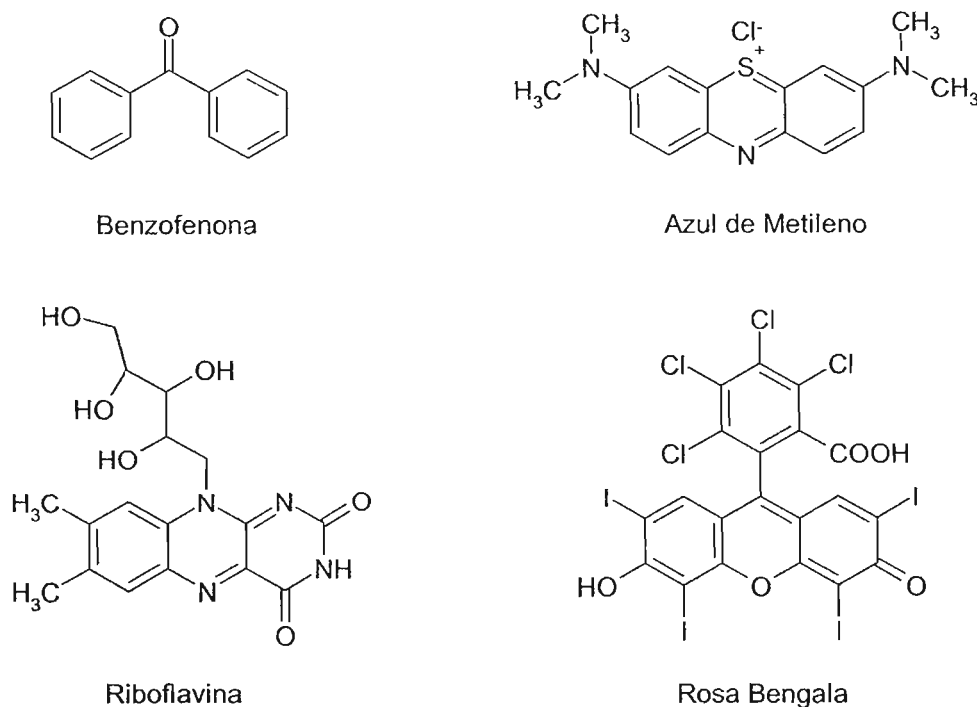


Figura 5.1 Estrutura de alguns sensibilizadores conhecidos.

O efeito do comprimento de onda sobre o mecanismo envolvido na fotossensibilização foi mostrado para um conhecido sensibilizador do tipo II, a rosa bengala (Figura 5.1). Nesse caso, radicais podem ser gerados quando a irradiação é feita a 313 nm e isso não ocorre quando a irradiação é feita a 514 nm. Essa diferença se deve à clivagem homolítica da ligação carbono-iodo quando a excitação é feita na região do UV (Allen *et al.*, 1991).

Foi avaliado o potencial de transferência de elétron pela rosa bengala triplete ($^3\text{RB}^*$) para substratos biologicamente relevantes em relação ao potencial de transferência de energia para o oxigênio. As constantes de desativação da $^3\text{RB}^*$ foram medidas em solução-tampão aquosa, acetonitrila e lipossomos unilamelares. Os resultados mostraram que para alguns substratos em células a transferência de elétron poderia competir com a formação de $^1\text{O}_2$ (Lambert e Kochevar, 1997).

Métodos alternativos que não envolvam o processo de fotossensibilização foram extensamente estudados. Contudo, na maioria desses métodos, os

reagentes são oxidantes e/ou tóxicos, levando a resultados controversos e inviabilizando a utilização em sistemas biológicos.

A geração de $^1\text{O}_2$ pela termólise de endoperóxidos de derivados de naftaleno ou antraceno tem muitas vantagens, pois, a decomposição do endoperóxido gera somente $^1\text{O}_2$ e o respectivo derivado de naftaleno ou antraceno. Entretanto, o rendimento pode variar dependendo do tipo e da posição dos substituintes no anel aromático. A temperatura de termólise e a estrutura do endoperóxido determinam a sua velocidade de decomposição e, conseqüentemente, a velocidade de formação do $^1\text{O}_2$.

Os endoperóxidos mais apropriados para estudos em meio biológico são aqueles que apresentam propriedades hidrofílicas e lipofílicas adequadas para atravessar membranas e o citoplasma, aproximando-se de diferentes alvos intracelulares. Do mesmo modo, a termólise do endoperóxido a 37°C deve liberar uma quantidade razoável de $^1\text{O}_2$ num tempo adequado para estudos que utilizem células em cultura.

Os primeiros endoperóxidos estudados foram os derivados do rubreno e antraceno, contudo eles liberam o oxigênio somente em condições de refluxo e seu uso como fonte de $^1\text{O}_2$ para sistemas biológicos se torna inviável. Esses compostos são mais apropriados para estudos de detecção do $^1\text{O}_2$ como captadores químicos (1.2.1.4.1). Somente o endoperóxido do derivado de antraceno contendo substituintes metóxi libera quantidades razoáveis de $^1\text{O}_2$ em temperatura mais baixa (Turro *et al.*, 1981).

Os endoperóxidos da série naftalênica se tornaram mais atrativos para uso como fonte de $^1\text{O}_2$, pois a termólise em temperatura de 30 a 40°C gera $^1\text{O}_2$ num tempo razoável (~2h) (Aubry, 1991). Contudo, os primeiros estudos já mostravam o papel importante do substituinte no anel aromático. As primeiras tentativas de mostrar a formação do endoperóxido a partir do 1,4-difenilnaftaleno não foram positivas e somente com a utilização do 1,4-dimetoxi-5,8-difenilnaftaleno foi possível o isolamento do endoperóxido no estado sólido e sua caracterização (composto A, Figura 5.2; Rigaudy *et al.*, 1966). A presença dos grupos fenil neste último composto se mostrou importante na estabilização do endoperóxido, pois tentativas de obter o endoperóxido a partir do 1,4-dimetoxinaftaleno (composto B, Figura 5.2) também não foram bem sucedidas. Nesse caso, o endoperóxido sofre

uma isomerização para o bis-epóxido e rearranjo para o aldeído-éster (Rigaudy *et al.*, 1969).

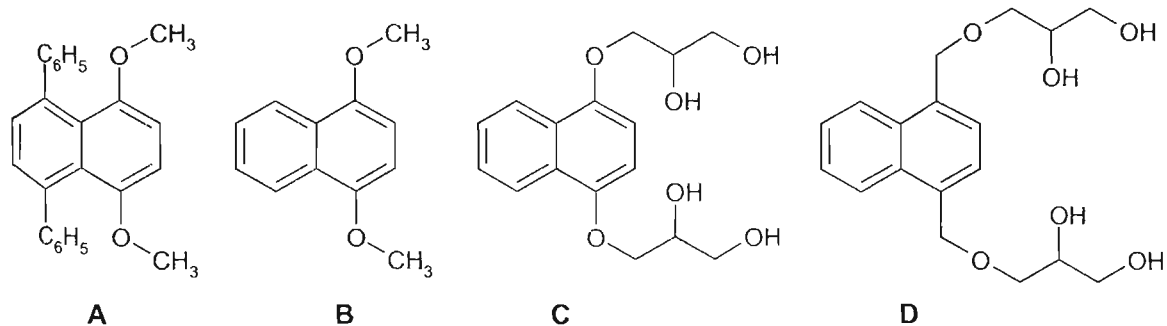


Figura 5.2 Derivados de naftaleno com substituintes com função éter.

A síntese de um derivado éter do HMN, contendo uma cadeia lateral dihidroxipropil como na DHPN (composto C, Figura 5.2), mostrou que esse composto apresenta reatividade com o $^1\text{O}_2$ 500 vezes maior que o HMN, porém, como no caso anteriormente mencionado, o endoperóxido formado não é estável e se decompõe formando o aldeído-éster (Pierlot *et al.*, 2000b). Quando um grupo metilênico separa o oxigênio do anel aromático (composto D, Figura 5.2) a reatividade é 10 vezes menor comparada com a DHPN. Nesse caso, há formação de endoperóxido na posição 1,4 e 5,8 e a liberação do $^1\text{O}_2$ é cerca de duas vezes mais lenta comparada com o NDPO₂ e o DHPNO₂ (Pierlot *et al.*, 2000b).

A formação de endoperóxido na posição 5,8 havia sido mostrada anteriormente para o *N,N',N'',N'''*-tetrakis(2,3-dihidroxipropil)2,2'-(naftaleno-1,4-diildimetil)bis(malonamida), indicando que além dos efeitos eletrônicos, o impedimento estérico dos substituintes pode afetar a regioseletividade da adição [4+2] do $^1\text{O}_2$ no anel aromático. Foi mostrado também que a formação do endoperóxido na posição 5,8 é mais difícil. Além disso, sua decomposição é mais lenta comparada com o endoperóxido na posição 1,4 do mesmo derivado de naftaleno (Pierlot e Aubry, 1997).

No presente trabalho, foram escolhidos o NDPO₂ e o DHPNO₂ como geradores de $^1\text{O}_2$. Esses compostos apresentam a vantagem de possuir grupos hidrofílicos distanciados do anel aromático por dois grupos metilênicos que favorecem a formação do endoperóxido correspondente sem provocar uma estabilidade excessiva. Dessa forma, a termólise pode ocorrer em temperaturas

amenas e num tempo razoável (tabela 1.1 e 1.2, seção 1.2.1.5.5). Os respectivos derivados de naftaleno hidrofílicos (NDP e DHPN), precursores dos endoperóxidos, foram preparados a partir do DMN. Na síntese desses dois compostos, o ANDP é produzido como intermediário.

A rota adotada para o ANDP foi baseada nos trabalhos de Lock e Walter (1942) e Marvel e Wilson (1958), sendo que o primeiro passo foi modificado. A diferença de reatividade da parte aromática e da cadeia lateral do DMN permite direcionar o ataque do bromo na posição desejada, uma vez que a parte aromática deve sofrer substituição eletrofílica característica do benzeno e a cadeia lateral, substituição de radical típica do metano. Portanto, foi possível a utilização de bromo e luz ao invés de *N*-bromosuccinamida.

A halogenação da cadeia lateral pelo ataque de bromo radicalar e a formação do radical alquila é o passo limitante dessa reação, porém, uma vez formado, o radical converte-se rapidamente no haleto de alquila. Dessa forma, um aspecto importante dessa reação foi a adição de uma quantidade de bromo próxima da estequiométrica, apenas com um pequeno excesso, de maneira controlada e contínua para que houvesse a produção de radicais, propagação da reação e substituição de apenas um hidrogênio em cada cadeia lateral.

De fato, o espectro de RMN de ^1H do produto obtido (Anexo I) mostrou que a molécula é simétrica e não houve bromação de apenas um grupo metil, dupla bromação de um mesmo grupo metil ou bromação do anel aromático, pois, os sinais obtidos correspondem exatamente à estrutura esperada. Não se observa também a presença de sinais que mostrariam a formação desses possíveis subprodutos ou reagente residual (ausência do sinal do grupo metil). A recristalização em clorofórmio foi, portanto, eficiente como processo de purificação do produto.

Um dos métodos mais importantes para preparar ácidos carboxílicos utiliza o malonato de etila (éster malônico). Esse método baseia-se na alta acidez dos átomos de hidrogênio em posição α no éster malônico e na extrema facilidade com que os ácidos malônicos e malônicos substituídos sofrem descarboxilação. Por tratamento com etóxido de sódio em álcool absoluto, o éster malônico transforma-se num sal, o éster malônico sódico. A ação deste sal sobre o 1,4-bis(bromometil)naftaleno gera um éster malônico substituído. Esta reação consiste num ataque nucleofílico do carbânion $\text{CH}(\text{COOC}_2\text{H}_5)_2^-$ ao haleto de

alquila. A eficiência dessa preparação depende do tratamento adequado dos solventes e da pureza do éster malônico. O espectro de RMN de ^1H do produto obtido (Anexo II) mostrou que a molécula é simétrica e que a substituição do bromo foi feita com sucesso. O produto final foi obtido pela hidrólise e descarboxilação do éster malônico substituído. As análises espectroscópicas confirmaram a estrutura esperada e a ausência de sub-produtos (Anexo III).

A síntese do NDP num passo anterior à preparação do respectivo endoperóxido (NDPO₂) é opcional, pois, o procedimento de síntese do NDPO₂ partindo do ANDP mostrou que ambos compostos fornecem o endoperóxido com o mesmo rendimento.

Para preparação da DHPN foi feita inicialmente a síntese de um intermediário mais reativo a partir do ANDP, o éster 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila. Num passo posterior, foi feita a reação usando o 3-amino-1,2-propanodiol e o éster preparado para obter a DHPN.

A termólise dos endoperóxidos NDPO₂ e DHPNO₂ foi estudada acompanhando o aparecimento da absorção da banda do anel aromático por espectroscopia na região do UV. A liberação de $^1\text{O}_2$ foi mostrada pelo acompanhamento da luminescência característica da emissão monomolecular na região espectral do infravermelho em $\lambda = 1270$ nm. Os espectros obtidos nessa região evidenciam diretamente a formação do $^1\text{O}_2$ na termólise dos endoperóxidos. A formação do $^1\text{O}_2$ nesse sistema já havia sido mostrada por captação química (detecção indireta) usando o derivado hidrossolúvel do rubreno (Pierlot *et al.*, 2000a).

Esses endoperóxidos têm sido usados em diversos estudos biológicos onde se deseja obter informações sobre o papel específico do $^1\text{O}_2$. Contudo, em muitos casos, os efeitos observados poderiam sugerir uma participação indireta dessa espécie. Quando o objetivo é estudar a interação direta do $^1\text{O}_2$ pela sua reação com importantes biomoléculas, o desenvolvimento de um gerador capaz de liberar $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$ é extremamente apropriado. Esse gerador foi preparado pela primeira vez pelo nosso grupo e, para essa finalidade, selecionamos a DHPN como carregador de $^{18}\text{[}^1\text{O}_2\text{]}$. Sua preparação foi feita usando oxigênio gasoso, isotopicamente marcado com os isótopos 18, gerando dessa forma o endoperóxido DHPN $^{18}\text{O}_2$.

A técnica de espectrometria de massas no modo ESI permite a análise de compostos pouco voláteis e dissolvidos em água. Um dos parâmetros que podem ser alterados na análise por ESI-MS é a voltagem do cone. Esse parâmetro influencia no processo de ionização da molécula, na fragmentação da molécula e na formação de adutos com possíveis íons presentes na amostra ou na fase móvel. Em alguns casos, as diferenças observadas para as análises obtidas sob diversos potenciais de cone podem fornecer informações importantes sobre a estrutura da molécula. No espectro de massas do DHPN¹⁸O₂ obtido em modo ESI+ (Figura 4.5, seção 4.1.3), diversos sinais foram formados pelos diferentes íons, dependendo do potencial do cone utilizado. Independente da intensidade de cada um dos íons formados, eles confirmam a massa esperada pela incorporação de dois átomos de oxigênio-18. Esses dados permitiram mostrar que o produto apresentava praticamente 100% de marcação isotópica, o que o torna uma poderosa ferramenta em estudos mecanísticos.

A propriedade do DHPN¹⁸O₂ de liberar ¹⁸[¹O₂] foi checada usando o EAS como captador químico e a análise do produto foi obtida por HPLC-MS no modo ESI- (seção 4.5). O íon majoritário [M-2H]²⁻ em m/z = 230 corresponde a molécula marcada com oxigênio-18 e duplamente carregada. Observa-se ainda, um sinal referente ao íon [M-2H]²⁻ do EASO₂ em m/z = 228. Essa última observação tornou-se um problema intrigante, uma vez que a análise do DHPN¹⁸O₂ mostrou que a marcação isotópica era praticamente 100% e o endoperóxido só poderia então ser formado pela reação com ¹O₂. A primeira hipótese para explicar esse resultado foi que o EASO₂ poderia ter sido formado pela fotossensibilização do EAS, porém, a reação tinha sido feita no escuro. Mesmo considerando essa possibilidade, a proporção de endoperóxido não-marcado formado não seria tão alta quanto à observada.

Esse resultado poderia ser melhor explicado pela transferência de energia do ¹⁸[¹O₂] para o O₂ dissolvido conforme demonstrado por Jones e Bayes (1972). Nesse estudo, a geração de ¹O₂ foi feita por descarga gasosa. Após passagem do ¹O₂ por um fluxo de ¹⁸O₂ esses autores conseguiram detectar a presença do ¹⁸[¹O₂] por espectrometria de massas com ionização pela radiação ressonante do argônio. Esse processo ioniza oxigênio no estado singlete, mas não no estado triplete fundamental. Além disso, os autores mostraram que esse processo é

extremamente rápido. A constante de velocidade para essa reação foi determinada como sendo da ordem de $\sim 1.10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e o processo ocorre basicamente por transferência de energia e não por rearranjo atômico.

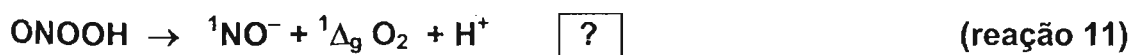
Nos ensaios usando o DHPN¹⁸O₂ e EAS essa possibilidade foi verificada pela remoção (borbulhando N₂) ou pelo aumento (borbulhando O₂) do O₂ dissolvido na solução. Os resultados mostraram um aumento do produto marcado na solução em que N₂ foi borbulhado e uma diminuição desse produto quando O₂ foi borbulhado (Figura 4.15 e 4.16A, seção 4.5). Esses dados confirmam o efeito do O₂ dissolvido e indicam que o processo de transferência de energia está ocorrendo levando à formação de ¹O₂ a partir do ¹⁸[¹O₂] (reação 10). O fato do EASO₂ não ter sido totalmente eliminado quando N₂ é borbulhado na solução antes da incubação mostra que esse procedimento não foi totalmente eficiente para remover o O₂.



O efeito da concentração do endoperóxido mostra que para concentrações mais altas do gerador, a formação de EAS¹⁸O₂ é maior. Esse resultado indica que aumentando a quantidade de ¹⁸[¹O₂], a probabilidade dessa espécie reagir com EAS é maior que a de formar ¹O₂ pela transferência de energia. Além disso, nos sistemas enriquecidos em D₂O observa-se uma diminuição do EAS¹⁸O₂ formado. Nesse caso, pelo tempo de vida do ¹⁸[¹O₂] ser maior, a probabilidade de transferência de energia para O₂, antes da reação com o captador EAS, é aumentada.

5.2 Detecção de oxigênio singlete gerado por diferentes sistemas

Estes experimentos foram feitos com o intuito de avaliar a formação de ¹O₂ na decomposição espontânea do ONOO⁻ em pH 7,4 ou 5,4. De acordo com o trabalho de Khan *et al.* (2000), a decomposição do ONOO⁻, após protonação, teria como produtos ¹O₂ e oxonitrato singlete (nitroxil, ¹NO⁻) com rendimento estequiométrico conforme esquematizado na reação 11.



Para detectar os produtos postulados, Khan *et al.* (2000) usaram meta-hemoglobina para capturar $^1\text{NO}^-$ e 9,10-difenilantraceno e 2,3-dimetil-2-buteno para capturar $^1\text{O}_2$ num sistema heterogêneo difásico (tetracloroeto/água). Os resultados apresentados indicavam a formação de nitrosil-hemoglobina e dos endoperóxidos correspondentes pela reação com $^1\text{O}_2$. Entretanto, foi possível demonstrar que esse resultado se deve à presença de H_2O_2 residual da síntese do ONOO^- . De fato, usando como captador de $^1\text{O}_2$, o derivado de antraceno hidrossolúvel, EAS, mostramos que $^1\text{O}_2$ não é formado quando se usa ONOO^- isento de H_2O_2 . Esse sistema é mais adequado pois a captura do $^1\text{O}_2$ é feita na mesma fase em que ele é gerado (fase aquosa). O resultado foi também confirmado pela ausência da emissão monomolecular do $^1\text{O}_2$ em $\lambda = 1270 \text{ nm}$.

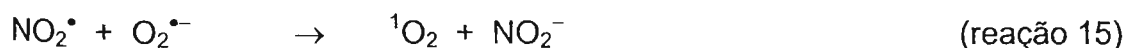
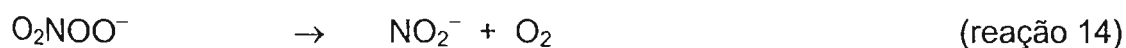
Em todos os sistemas estudados, a detecção foi feita com o EAS na concentração inicial de 8 mM, valor β para o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCI}^-$ em água (Di Mascio e Sies, 1989). Ressaltamos que, caso $^1\text{O}_2$ estivesse sendo formado, este seria detectado, pois, em estudos anteriores, a concentração de 0,8 mM de EAS foi suficiente para detectar o produto EASO_2 no sistema $\text{ONOO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ (Di Mascio *et al.*, 1996).

Os experimentos realizados mostraram que não há formação de EASO_2 em quantidades detectáveis pela decomposição de ONOO^- quando H_2O_2 está ausente. Fato que foi comprovado pela co-injeção do padrão de EASO_2 à amostra do ensaio com ONOO^- 15 mM (cromatograma 1c, Figura 4.12, seção 4.3.4).

Além disso, pode ser notado na figura 4.12 (seção 4.3.4) que existe a formação de um produto com tempo de retenção maior que o EASO_2 . esse produto é gerado, inclusive, pela decomposição do ONOO^- na ausência de H_2O_2 . Este dado indica que, possivelmente, outras espécies foram formadas pela sua decomposição e reagiram com o EAS, gerando um produto que não é o EASO_2 .

A formação de $^1\text{O}_2$ pela reação de ONOO^- e H_2O_2 foi primeiramente descrita por Di Mascio *et al.* (1994). Trabalhos posteriores (Alvarez *et al.*, 1995) também descreveram que a reação de ácido peroxinitroso com H_2O_2 gerava oxigênio e que rendimentos maiores poderiam ser obtidos utilizando um excesso de H_2O_2 . Nos experimentos realizados no presente trabalho também foi mostrada a formação de EASO_2 quando a decomposição de ONOO^- ocorre na presença H_2O_2 (Figura 4.12, cromatograma 2).

O mecanismo para formação de oxigênio na oxidação do H_2O_2 pelo ONOO^- (Goldstein e Czapski, 1998 e Hodges e Ingold, 1999) envolve a oxidação do H_2O_2 pelo ONOOH (reação 12). O $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO_2^{\bullet} gerados podem levar à formação do dioxoperoxonitrato, O_2NOO^- (reação 13). A heterólise desse intermediário produz NO_2^- e O_2 (reação 14). Conforme este mecanismo, a energia de Gibbs (+94,6 kJ/mol) para formação de $^1\text{O}_2$ é desfavorável (Koppenol, 1989). Entretanto, a oxidação direta do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelo NO_2^{\bullet} , sem o O_2NOO^- intermediário, reação 15, permitiria a formação de $^1\text{O}_2$ com uma energia de Gibbs termodinamicamente favorável (-32,4 kJ/mol).



Para comparação, também foi mostrada a formação do EASO_2 quando o $^1\text{O}_2$ é gerado pela termólise do DHPNO_2 . Esse processo libera cerca de 60% de $^1\text{O}_2$. Do mesmo modo, foi utilizado o sistema $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OCl}^-$, o qual é bem conhecido por gerar $^1\text{O}_2$ com alto rendimento, 87%, avaliado usando EAS como captador (Di Mascio *et al.*, 1989) e 86% usando 2,5-dimetilfurano como captador (Held *et al.*, 1978). Ressaltamos que o EASO_2 não é produzido na presença de OCl^- ou H_2O_2 (cromatogramas a e b, Figura 4.11), ou outros oxidantes como ozônio e radical hidroxila. Pode-se, portanto, considerar o EASO_2 como um produto específico da reação do EAS com $^1\text{O}_2$ (Di Mascio e Sies, 1989).

5.3 Oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

Utilizando-se uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$, foram obtidas importantes informações a respeito dos principais produtos formados na reação entre $^1\text{O}_2$ e a dGuo. Dados estruturais dos produtos detectados foram obtidos usando marcação isotópica com ^{18}O [$^1\text{O}_2$] e análises por MS.

Em estudos anteriores de fotossensibilização da dGuo em solução aquosa, os dois diastereoisômeros produzidos foram identificados como sendo a 4-OH-8-oxodGuo (Ravanat e Cadet, 1995). Entretanto, posteriormente foi verificado que

eles eram, na verdade, uma mistura de diastereoisômeros da dSp (Niles *et al.*, 2001). Nesse sistema, a 8-oxodGuo também foi detectada em quantidade bem menor (Buchko *et al.*, 1995; Ravanat e Cadet, 1995). Como esses estudos foram feitos usando sensibilizadores do tipo II (azul de metileno) como fontes de $^1\text{O}_2$, a possibilidade da contribuição de reações envolvendo o mecanismo tipo I de fotossensibilização não poderia ser excluída.

Os compostos detectados usando DHPNO₂ e NDPO₂ como fontes de $^1\text{O}_2$ estão de acordo com a distribuição de produtos descritas no parágrafo anterior. Observa-se ainda que a formação de produtos é proporcional à concentração de endoperóxido e que as quantidades formadas dos nucleosídeos oxidados foram similares para os dois endoperóxidos utilizados. Além disso, os diastereoisômeros da dSp são formados em maior quantidade em relação à 8-oxodGuo, cerca de 5 a 30 vezes, dependendo da concentração do endoperóxido.

A formação dos produtos contendo a marcação isotópica, gerados na incubação com DHPN¹⁸O₂ também foi investigada. Para essa finalidade foram utilizadas análises de HPLC-MS/MS. Os resultados obtidos confirmam a reação direta entre o $^1\text{O}_2$ e a dGuo pela incorporação de oxigênio-18 nos produtos. Entretanto, os produtos não marcados também foram detectados nesses ensaios. A formação desses produtos também poderia ser explicada pela transferência de energia para o O₂ dissolvido, como descrito anteriormente (seção 5.1). O espectro de fragmentação obtido no modo MS/MS confirma a estrutura de espironucleosídeos como descrito por Luo *et al.* (2000).

5.4 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

A 8-oxodGuo é altamente reativa frente ao $^1\text{O}_2$. A constante de reação é duas ordens de magnitude maior quando comparada com dGuo (Sheu and Foote, 1995a). A velocidade de decomposição pela fotossensibilização com azul de metileno é três vezes mais rápida comparada com a dGuo (Buchko *et al.*, 1995). Do mesmo modo, por apresentar um potencial de oxidação menor que qualquer nucleosídeo natural, a 8-oxodGuo torna-se um alvo preferencial de outros oxidantes cujo mecanismo envolva a oxidação por 1 ou 2 elétrons (Burrows e Muller, 1998). Em ambos os casos, a energia do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) da base reflete essa facilidade de oxidação e a

reatividade frente a oxidantes eletrofílicos (Prat *et al.*, 1998). O efeito de seqüência na oxidação da guanina em oligonucleotídeos dupla fita também foi demonstrado, sendo que a guanina localizada na direção da extremidade 5' é mais susceptível à oxidação devido à interação π do empilhamento. A reatividade para oligômeros dupla fita contendo guanina, usando fotossensibilização do tipo I, aumenta na ordem: -GGG- > -GG- > -GA- >> -GC- > -GT-, e os cálculos de potenciais de ionização estão de acordo com a ordem experimental obtida (Saito *et al.*, 1995). Do mesmo modo, foi avaliado se esse tipo de fator influenciaria na oxidação da 8-oxodGuo. Os cálculos de potenciais de ionização mostraram que a 8-oxodGuo, localizada na direção 5' com relação à dGuo, é mais facilmente oxidável que uma 8-oxodGuo isolada (Prat *et al.*, 1998). Observações experimentais usando oxidantes que atuam por um mecanismo de 1 elétron mostraram que a reatividade da 8-oxodGuo é cerca de 30 vezes maior que da seqüência 5'-GGG-3' em DNA dupla fita (Hickerson *et al.*, 1999).

Estas propriedades são particularmente relevantes considerando-se que, desde a sua descoberta, essa lesão em DNA tem sido utilizada como um biomarcador de estresse por ser formada em diversos processos oxidativos. Níveis aumentados dessa lesão têm sido relacionados a processos patológicos e envelhecimento (Halliwell e Gutteridge, 1999). Eventos relacionados com a oxidação da 8-oxodGuo são, portanto, fundamentais para a compreensão dos danos em DNA (Hickerson *et al.*, 1999).

Com relação à oxidação da 8-oxodGuo em solução aquosa, envolvendo mais provavelmente o mecanismo tipo II de fotossensibilização com azul de metileno, foram reportados como principais produtos: a dOz e sua precursora, a dlz, o ácido cianúrico e os diastereoisômeros da dSp. Baseando-se no efeito de D₂O na velocidade de decomposição da 8-oxodGuo e no efeito supressor da azida de sódio, foi proposto que o ¹O₂ era o responsável pela formação desses produtos de oxidação (Buchko *et al.*, 1995 e Raoul e Cadet, 1996).

Nas condições de análise por HPLC-MS do presente trabalho, foi mostrada a presença dos produtos mencionados anteriormente, exceto o ácido cianúrico. Neste caso, foi detectado somente o seu precursor. Aparentemente, as condições de reação utilizadas não possibilitaram a hidrólise desse composto em extensão significativa.

Inicialmente, a dlz e a dOz foram descritas como produtos majoritários da oxidação da dGuo por radicais hidroxila ou fotossensibilizadores do tipo I (Cadet *et al.*, 1994). O mecanismo proposto para sua formação envolve a oxidação por um elétron da base guanina e a desprotonação do radical resultante, formando o cátion radical guanina. A reação desse radical com O₂ na posição C5, seguida do ataque da água na posição C8, redução por 1 elétron e liberação de CO₂, forma um intermediário que libera formamida e o produto dlz.

Como mencionado anteriormente, o principal produto de oxidação da dGuo por ¹O₂ gerado pelo mecanismo tipo II de fotossensibilização era a mistura dos dois diastereoisômeros da 4-OH-8-oxodGuo. Desta forma, por um certo período, a dOz e a 4-OH-8-oxodGuo foram consideradas como marcadores da fotossensibilização tipo I ou II, respectivamente.

Com o intuito de esclarecer a formação de dOz na oxidação da 8-oxodGuo pelo ¹O₂, Adam *et al.* (1996) utilizaram a fotossensibilização com rosa bengala e benzofenona (sensibilizadores majoritariamente do tipo II e tipo I, respectivamente). Uma proporção de 4-OH-8-oxodGuo : dOz bem próxima foi obtida com os dois sensibilizadores. Esses dados mostraram que esses produtos não eram adequados para distinguir o mecanismo de fotossensibilização, pois, a 8-oxodGuo é um produto comum aos dois processos e sua oxidação subsequente poderia levar a resultados controversos.

No presente trabalho, quando a oxidação da 8-oxodGuo foi feita com a fonte química de ¹⁸[¹O₂], foi confirmada a reação direta entre o ¹O₂ e a 8-oxodGuo através da detecção dos produtos contendo um átomo de oxigênio-18.

Na oxidação da 8-oxodGuo por ¹O₂, quando inserida em oligonucleotídeo, foi relatada a presença da dGh^{ox} como produto intermediário na formação do ácido oxalúrico (Duarte *et al.*, 2000). Ao contrário do que é observado para a 8-oxodGuo em solução, não há formação de dlz, 4-OH-8-oxodGuo ou dSp, nem ácido cianúrico. Nesse caso, o provável mecanismo envolve a conversão do 4,5-dioxetano intermediário no hidroperóxido em C5 e após alguns passos que incluem a abertura do anel na ligação C5-C6 e descarboxilação, há formação de um produto relativamente estável, a dGh^{ox}. Após algumas etapas de hidrólise, a dGh^{ox} é convertida em dOxa. Esta proposta mecanística foi evidenciada com a

utilização da fonte química de $^1\text{O}_2$ isotopicamente marcada, DHPN $^{18}\text{O}_2$ (Duarte *et al.*, 2000).

Outros trabalhos, utilizando diferentes oxidantes, têm relatado a formação de derivados do tipo hidantoína para oxidação da 8-oxoGua (Luo *et al.*, 2001a e b; Chworos *et al.*, 2001).

A oxidação eletroquímica por um elétron da 8-oxoGuo forma Gh (Goyal *et al.*, 1997). Na oxidação por um elétron da 8-oxoGua usando Ir(IV) em pH 4, a mistura em equilíbrio de Gh/la seria o produto predominante. Além disso, essa mistura poderia sofrer subsequente oxidação gerando preferencialmente la $^{\text{ox}}$, que foi caracterizada por testes químicos, espectrometria de massas (MS) e NMR de ^1H (Luo *et al.*, 2001a). Por outro lado, a fotossensibilização da 8-oxodGuo por um sensibilizador que segue preferencialmente o mecanismo tipo I, mostrou que a dlz é o produto principal em pH>7 e a dla $^{\text{ox}}$ é o produto majoritário em pH<7. Uma quantidade razoável dos diastereoisômeros da dSp também é formada em ambos os casos (Luo *et al.*, 2001b).

Na oxidação por dois elétrons da 8-oxoGua, usando a porfirina Mn-TMPyP/KHSO $_5$ e um modelo de dinucleotídeo, foi proposta a formação da dlz e dGh $^{\text{ox}}$ como produtos principais, sendo que este último foi relatado como instável formando como produto final o dOxa (Chworos *et al.*, 2001).

No presente trabalho foi detectada a presença de um produto cuja massa molecular de 271 u.m.a. poderia corresponder ao produto dGh $^{\text{ox}}$, como proposto para oxidação da 8-oxodGuo em oligonucleotídeos (Duarte *et al.*, 2000).

Inicialmente, a estrutura correspondente à dGh $^{\text{ox}}$ foi sugerida para um intermediário precursor da dlz na oxidação por fotossensibilização tipo I da 8-oxodGuo (Adam *et al.*, 1996). Essa proposta foi considerada por Vialas *et al.* (1998 e 2000) para estudos de oxidação da dGuo por um oxidante de 2 elétrons, a porfirina Mn-TMPyP/KHSO $_5$. Foi detectado um produto de massa molecular 271 u.m.a. e o associaram à estrutura da dGh $^{\text{ox}}$ e dla $^{\text{ox}}$ como intermediários na formação da dlz e ácido parabânico.

Tentativas de obter o produto dGh $^{\text{ox}}$ marcado isotopicamente com oxigênio-18 pela incubação com DHPN $^{18}\text{O}_2$ não foram bem sucedidas e o produto esperado com um incremento de massa de 2 u.m.a. não foi detectado nas presentes condições de análise.

Esse resultado indica que esse produto não poderia ser um possível precursor da dlz como proposto anteriormente (Adam *et al.*, 1996 e Vialas *et al.*, 1998 e 2000), uma vez que a dlz isotopicamente marcada com oxigênio-18 foi claramente detectada. Uma conclusão similar foi relatada por Chworos *et al.* (2001), sendo sugerido que a dGh^{ox} é uma precursora do ácido oxalúrico, tendo o ácido parabânico como intermediário. Essa proposta está de acordo com a seqüência de intermediários sugerida para oxidação por ¹O₂ da 8-oxodGuo quando inserida em oligonucleotídeo (Duarte *et al.*, 2000). Por outro lado, um outro trabalho também discute os destinos finais da dGh^{ox} (Luo *et al.*, 2001). Nesse caso, é proposto que o produto de hidrólise da dla^{ox} seria o ácido oxalúrico. O ácido parabânico seria o produto da hidrólise da dGh^{ox}.

De uma maneira geral, vias que levam à oxidação direta por quatro elétrons da 8-oxodGuo geram provavelmente dGh^{ox}. Isso ocorre porque a oxidação gera diretamente um produto com o anel de seis membros aberto e com uma ligação C=N. A oxidação pelo mecanismo de um elétron permite a interconversão Gh \leftrightarrow la num estágio intermediário, tendo a dla^{ox} como produto termodinâmico majoritário após oxidação (Luo *et al.*, 2001).

Desse modo, de acordo com os dados da literatura e diversas evidências experimentais aqui apresentadas, é razoável propor que o produto de massa 271 u.m.a., identificado na oxidação da 8-oxodGuo por ¹O₂, seja a dGh^{ox}.

O esquema da figura 5.3 resume, com base nos resultados obtidos e relatados na literatura, as principais vias de degradação da 8-oxodGuo por ¹O₂, em oligonucleotídeo e em solução aquosa.

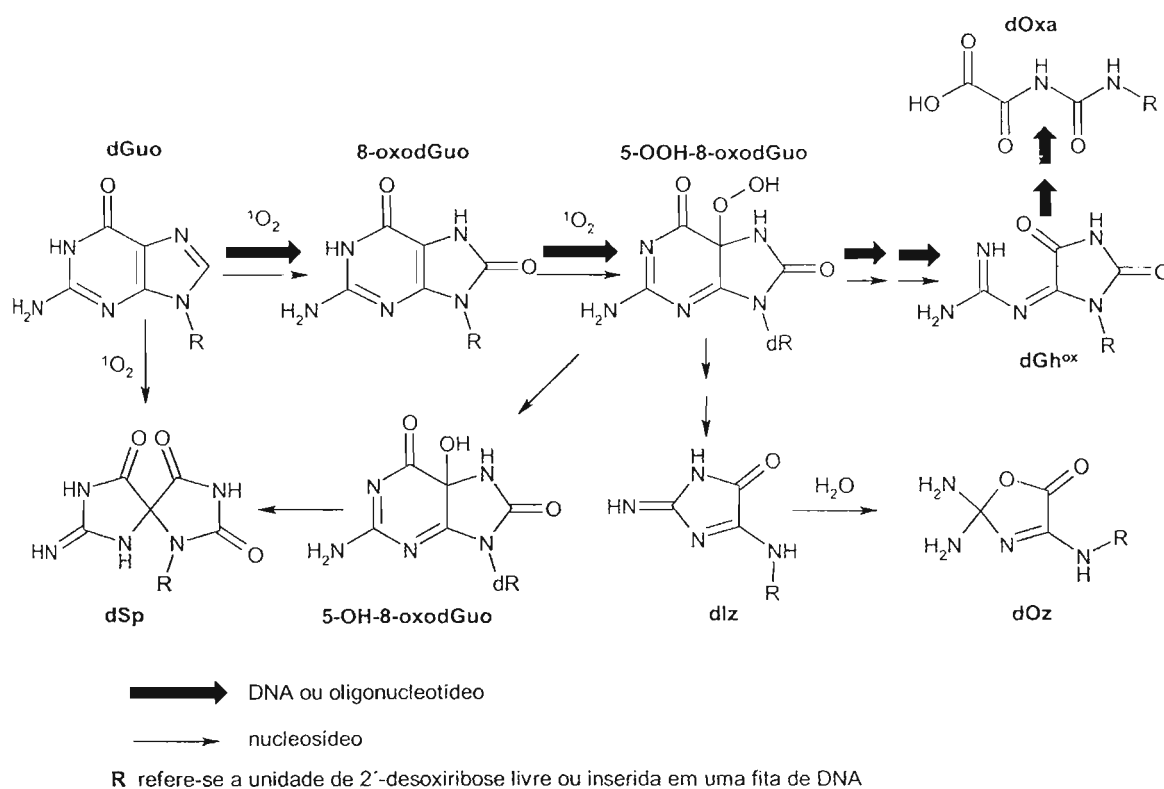


Figura 5.3 Produtos de oxidação da dGuo e 8-oxodGuo formados pela reação com $^1\text{O}_2$ gerado pelo DHPNO₂.

5.5 Oxidação da 8-metoxi-2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

A determinação dos produtos formados na oxidação da dGuo e da 8-oxodGuo, assim como o mecanismo pelo qual esse processo ocorre em diferentes contextos, é de grande importância para entender a mutagenicidade observada pela ação do $^1\text{O}_2$ e sua capacidade de induzir quebras em fita de DNA. A dependência da formação dessas quebras com o tempo indica que o processo requer duas moléculas de $^1\text{O}_2$ (Di Mascio *et al.*, 1989). Esses dados indicam que, provavelmente, a oxidação da 8-oxodGuo, inicialmente formada pela oxidação da dGuo em DNA, é uma etapa necessária nesse processo. Além disso, tem sido demonstrado que a 8-oxodGuo não é um sítio alcali-lábil (Burrows e Muller, 1998).

No estudo da oxidação da 8-MeOdGuo em solução (Luo *et al.*, 2001b), via mecanismo tipo I de fotossensibilização com riboflavina, os resultados mostraram que o produto majoritário final é a dlz, além de pequena quantidade de outros produtos. A preparação do oligonucleotídeo contendo 8-MeOdGuo foi descrita por Ikeda e Saito (1999) e a fotossensibilização com riboflavina desse

oligonucleotídeo mostrou a formação quase quantitativa de dlz. O estudo da oxidação da 8-MeOdGuo por $^1\text{O}_2$ aqui apresentado foi parcialmente desenvolvido no laboratório de lesões em ácidos nucleicos (C.E.A./Grenoble/França) sob acompanhamento do Dr. Jean-Luc Ravanat e Dr. Didier Gasparutto.

Os produtos formados são os mesmos obtidos para oxidação da 8-oxodGuo, com exceção do produto de $m/z = 191$ (MeO-desoxirribosiluréia), pois um correspondente para a reação da 8-oxodGuo não foi detectado. Nesse caso, o grupo metóxi parece estabilizar e dificultar a quebra da ligação *N*-glicosídica. Outra diferença foi o produto de $m/z = 286$ que, pelo espectro de fragmentação, mostrou que sua estrutura mais provável seria a da dla^{ox} contendo o grupo metoxi (MeO- dla^{ox}), e não a da dGh^{ox} como ocorre com a 8-oxodGuo.

A síntese química de oligonucleotídeos contendo bases modificadas é uma ferramenta importante para investigar a reatividade e a distribuição de produtos. Tem sido mostrado que os mecanismos de degradação dos produtos de oxidação podem ser diferentes quando estão inseridos na fita de DNA ou em solução (Duarte et al., 2000). Efeitos relacionados à estrutura polianiônica da fita de DNA e o pareamento das bases poderiam influenciar no processo. A síntese de oligonucleotídeos com lesões resultantes da oxidação do DNA por espécies reativas do oxigênio e/ou radiação ionizante como a 8-oxodGuo, 5-hidroxi-2'-desoxicidina em posições definidas já foi demonstrada para estudos de propriedades biológicas dessas lesões (Roelen et al., 1991 e Gasparutto et al., 2000b).

O sinton obtido possibilitou a síntese do oligonucleotídeo. Entretanto, a degradação de parte do produto impossibilitou a obtenção de um melhor rendimento.

No caso da oxidação do oligonucleotídeo contendo a 8-MeOdGuo por $^1\text{O}_2$ observou-se a formação da dlz como produto principal. Esse produto foi observado anteriormente para foto-oxidação usando riboflavina de um oligonucleotídeo contendo a 8-MeodGuo (Ikeda e Saito, 1999). Entretanto, não formou a guanidinhidantoína oxidada ou ácido oxalúrico como ocorre na oxidação por $^1\text{O}_2$ da 8-oxodGuo inserida em oligonucleotídeos (Duarte et al., 2000).

A distribuição dos diferentes produtos obtidos para oxidação da 8-MeOdGuo está representado na figura 5.4.

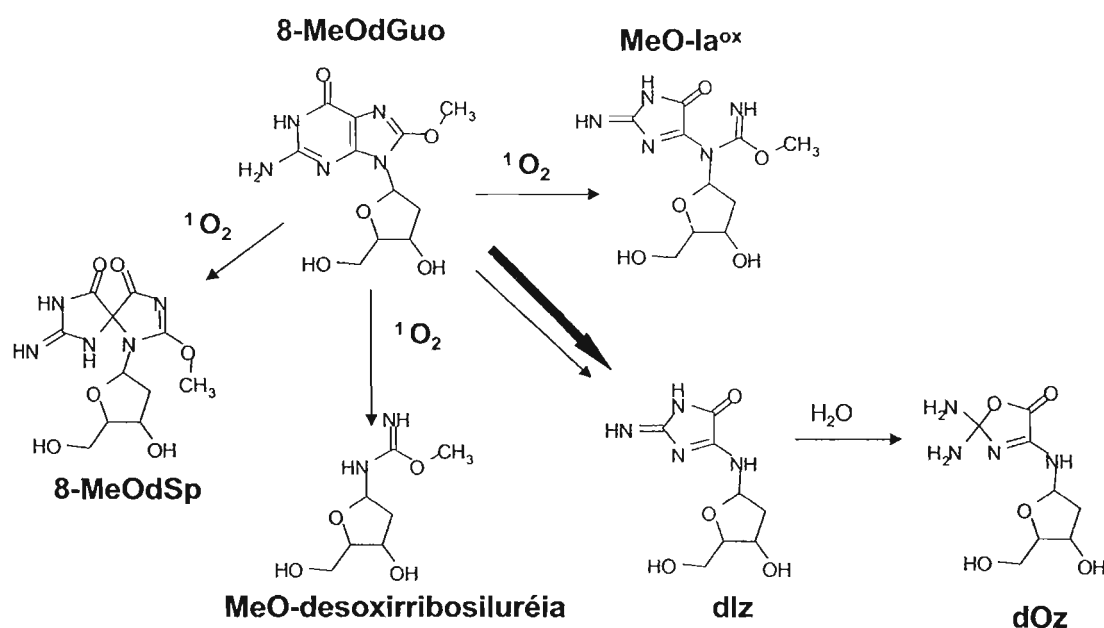


Figura 5.4 Produtos de oxidação da 8-MeOdGuo formados pela reação com 1O_2 gerado pelo DHPNO₂. A seta em negrito indica a rota quando a 8-MeOdGuo está incorporada em oligonucleotídeo.

A comparação dos produtos formados pela oxidação da 8-MeOdGuo ou 8-oxodGuo por 1O_2 está ilustrada na figura 5.5.

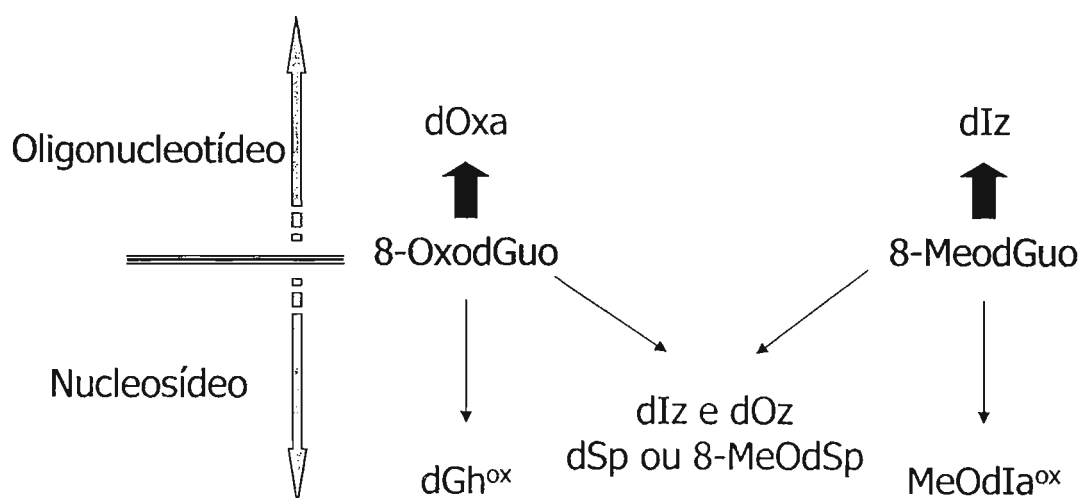


Figura 5.5 Produtos de oxidação da 8-MeOdGuo e da 8-oxodGuo formados pela reação com 1O_2 gerado pelo DHPNO₂.

As diferenças e semelhanças na distribuição dos produtos podem estar relacionadas com o equilíbrio ceto-enólico que ocorre com a 8-oxodGuo e que não ocorre na 8-MeOdGuo. O fato de dlz ou dSp não serem formadas em fita de DNA quando a 8-oxodGuo é oxidada pelo $^1\text{O}_2$ pode indicar que, nesse caso, o equilíbrio deve estar deslocado para a forma cetônica, enquanto que em solução a prevalência das duas formas levaria a formação dos produtos similares aos formados com a 8-MeOdGuo. Além disso, a reatividade da forma cetônica e da forma enol pode ser um pouco diferente e é difícil estabelecer a contribuição de cada uma delas na constante de reação da 8-oxodGuo em solução.

5.6 Determinação das constantes de desativação total do oxigênio singlete em solução aquosa

A desativação do $^1\text{O}_2$ pode ocorrer pelo mecanismo físico ou químico. A *via* física envolve a interação do oxigênio com um supressor que acelera sua conversão para o estado fundamental sem, contudo, consumir o oxigênio ou formar produto. Na *via* química há consumo de oxigênio e formação de produto. A constante de velocidade de desativação total ($k_t = k_q + k_r$) é a soma das constantes física (k_q) e química (k_r). Existem dois mecanismos principais para desativação física: transferência de energia e transferência de carga. Em ambos os casos, é geralmente aceita a formação de um intermediário transiente e reversível que, de acordo com a energia de excitação e o potencial de ionização do desativador, pode ser descrito como um aduto covalente (peróxido), como um exciplex ou como um complexo de transferência de carga (Sheu e Foote, 1995c).

As constantes de desativação total de derivados da guanosina com os grupos hidroxila da ribose protegidos por *tert*-butildimetilsilil e substituídos na posição 8 com Br, CH₃, OCH₂C₆H₅, OCH₃ e OH (8-oxodGuo) foram determinadas em diferentes solventes deuterados (diclorometano, benzeno, acetona e acetonitrila). As constantes de reação foram determinadas em acetona (Sheu e Foote, 1995c). Os resultados mostraram que a k_t aumenta cerca de 5 a 15 vezes para todos os derivados em solventes mais polares (nesse caso acetonitrila). O efeito da polaridade do solvente é mais pronunciado para os derivados com substituintes mais ricos em elétrons. Esses dados indicam que o estado de

transição para essa interação é polar com transferência parcial de carga. Além disso, com exceção da 8-oxodGuo, para todos os outros derivados a k_r representa cerca de 2 a 3% da k_q , de forma que a maior parte do $^1\text{O}_2$ é desativada pela via física. Para a 8-oxodGuo esse valor ficou em torno de 35%, sugerindo que esse composto está reagindo de forma diferente dos demais derivados (Sheu e Foote, 1995c).

No presente trabalho foram determinadas as constantes de desativação total do $^1\text{O}_2$ para a dGuo, 8-oxodGuo e 8-MeOdGuo em D_2O , sendo obtido os valores: $5,39 \cdot 10^6$; $58,7 \cdot 10^6$ e $56,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Quando comparados com os valores determinados por Sheu e Foote (1995c) para os mesmos compostos em acetonitrila, porém, contendo ribose protegida *tert*-butildimetilsilil, temos: $9,15 \cdot 10^6$; $65,2 \cdot 10^6$ e $38,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Os valores aqui obtidos para a dGuo e 8-oxodGuo são menores que o esperado se considerarmos o efeito do solvente sobre as constantes. Por outro lado, as hidroxilas da 2'-desoxirribose não estavam protegidas o que poderia contribuir na desativação do $^1\text{O}_2$ pela transferência de energia de excitação eletrônica para os níveis de energia vibracional da ligação O-H. Além disso, o valor de $5,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ que foi reportado anteriormente para dGuo em sistema aquoso (Lee e Rodgers, 1987), está bem próximo ao aqui determinado. Por sua vez, a k_t determinada para a 8-MeOdGuo em D_2O é maior que em acetonitrila. A constante desse derivado é próxima da constante da 8-oxodGuo e confirma os resultados obtidos anteriormente pelo acompanhamento do consumo desses dois substratos na reação com $^1\text{O}_2$ (seção 4.8.1).

Também foram determinadas as constantes de desativação total para um conhecido supressor físico, a azida de sódio. O valor obtido ($5,28 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) está de acordo com valores reportados anteriormente que se situam no intervalo de $3 \cdot 10^8$ a $6,9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Lissi *et al.*, 1993).

A maioria das incubações deste trabalho foi feita em água, uma vez que o tampão fosfato poderia favorecer a supressão do $^1\text{O}_2$ e diminuir o rendimento dos produtos. De fato, essa constante de desativação foi determinada e obteve-se o valor de $2,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

5.7 Formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em DNA pela oxidação da 2'-desoxiguanosina por oxigênio singlete

No caso de oligonucleotídeos, simples e dupla fita, a natureza polianiônica do DNA e o pareamento das bases são fatores importantes que poderiam afetar a cinética e o mecanismo de transformação dos intermediários formados (Vialas *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* usando DNA em solução aquosa mostraram que o $^1\text{O}_2$ gerado na termólise do DHPNO₂ é capaz de oxidar o DNA. A base guanina é preferencialmente oxidada levando à formação de 8-oxoGua. Outros produtos que poderiam ser formados por outras espécies reativas foram também monitorados e nenhum deles foi encontrado. Entre eles, incluem-se dímeros de timina, derivado formamidopirimidina da guanina (FapyGua), produtos de oxidação da timina (5,6-dihidro-5,6-dihidroxitimidina, 5-formil-2'-desoxiuridina e 5-hidroximetil-2'-desoxiuridina) e 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenosina (Ravanat *et al.*, 2001).

Os resultados referentes à detecção de 8-oxodGuo formada no tratamento *in vitro* de DNA com quantidades crescentes dos endoperóxidos DHPNO₂ e NDPO₂ mostram um aumento significativo na formação dessa lesão com o aumento da concentração dos endoperóxidos. Neste caso, o DHPNO₂ foi um pouco mais eficiente que o NDPO₂. Este efeito foi principalmente observado em concentrações mais altas, provavelmente por apresentar um rendimento de produção de $^1\text{O}_2$ maior, 60 % para o DHPNO₂ e 50 % para o NDPO₂ (Pierlot *et al.*, 2000a).

A cinética de formação da 8-oxodGuo não é linear com o tempo de incubação com o DHPNO₂ (Ravanat *et al.*, 2001). Isto pode ser explicado pela decomposição exponencial do DHPNO₂ que tem tempo de meia-vida em torno de 23 min (Pierlot *et al.*, 2000a)

Os diastereoisômeros da dSp nunca foram detectados em DNA isolado tratado com $^1\text{O}_2$, indicando que, em DNA, o endoperóxido inicialmente formado leva à formação predominante da 8-oxodGuo (Cadet *et al.*, 2000). A ausência da FapyGua, principal produto da hidratação do cátion radical guanina, exclui a possibilidade da existência de um intermediário radical no processo de oxidação pelo $^1\text{O}_2$.

A incubação das células com NDPO₂ não causou um aumento nos níveis de 8-oxodGuo como ocorreu no tratamento com DHPNO₂. Isso se deve,

provavelmente, ao fato do DHPNO₂ ser incorporado mais facilmente às células por possuir um caráter não-iônico (Klotz *et al.*, 1999), enquanto que esse processo é mais difícil para o NDPO₂ que possui caráter iônico. Dessa forma, o aumento nos níveis de 8-oxodGuo se deve principalmente à produção intracelular do ¹O₂.

Células de monócitos incubadas a 37°C com DHPNO₂ termodecomposto ou a 4°C com DHPNO₂ não mostraram níveis aumentados de 8-oxodGuo quando comparadas com as células sem tratamento nenhum.

A 8-oxodGuo é uma lesão que poderia ser formada pela reação direta do ¹O₂ com a dGuo do DNA ou por outras espécies reativas além do ¹O₂ que poderiam ser geradas pelo estresse provocado pela presença do ¹O₂ no meio celular. Para diferenciar entre essas duas possibilidades, foi utilizado o DHPN¹⁸O₂. O uso dessa ferramenta possibilitou demonstrar que o ¹O₂ é capaz de lesar diretamente o DNA celular levando à formação da 8-oxodGuo. Esse resultado foi obtido pela detecção por HPLC-MS/MS da 8-oxodGuo marcada com o átomo de oxigênio-18, formada na oxidação pelo ¹⁸[¹O₂].

O tratamento feito para avaliar a geração de ¹⁸[¹O₂] intracelular mostrou que houve a formação da ¹⁸O-8-oxodGuo (M+2) para as células pré-incubadas com o DHPN¹⁸O₂ a 4°C por 15 min seguida da remoção do excesso de DHPN¹⁸O₂. Porém, sem remover o excesso de endoperóxido, um nível três vezes maior da lesão foi obtido. Essa diferença poderia ser explicada pela existência de um equilíbrio entre a localização intra e extracelular do endoperóxido. A remoção do DHPN¹⁸O₂ extracelular pode, provavelmente, ter resultado numa diminuição de sua concentração intracelular. Além disso, o período de 15 min a 4°C pode não ter sido suficiente para sua incorporação total nas células. Esse fato pode contribuir para explicar a menor quantidade de ¹⁸O-8-oxodGuo medida nesse experimento.

Conclusões

6 Conclusões

A síntese do endoperóxido do derivado de naftaleno hidrofílico e não-iônico, o DHPN¹⁸O₂, como fonte química de ¹⁸[¹O₂] e a utilização da técnica de HPLC-MS/MS foram fundamentais para realizar os estudos sobre a reação do DNA com o ¹O₂.

A incubação do DNA de timo de bezerro e o tratamento das células com os endoperóxidos NDPO₂ ou DHPNO₂, como fontes puras de ¹O₂, com posterior detecção do produto 8-oxodGuo, mostrou níveis maiores quando o DHPNO₂ é utilizado. Tal fato pode ser explicado em função de seu maior rendimento de formação de ¹O₂ e por ser capaz de penetrar em células. Além disso, usando o DHPN¹⁸O₂ foi possível demonstrar que o ¹O₂ reage diretamente o DNA celular levando à formação da 8-oxodGuo.

Os produtos de oxidação da 8-oxodGuo por ¹O₂ ou ¹⁸[¹O₂], gerados pelo DHPNO₂ ou DHPN¹⁸O₂, foram detectados e caracterizados por espectrometria de massas possibilitando mostrar a incorporação do isótopo 18 do oxigênio nos principais produtos de oxidação, dlz, dOz, e diastereoisômeros da dSp. Foi também identificada a dGh^{ox}, que havia sido anteriormente detectada como um produto intermediário da formação do ácido oxalúrico na oxidação pelo ¹O₂ da 8-oxodGuo incorporada em oligonucleotídeos.

A síntese do nucleosídeo modificado, a 8-MeOdGuo, e estudos da reação com ¹O₂ mostraram a formação de produtos que, pelas características observadas em análises de espectrometria de massas, correspondem a dlz, dOz, dSp e dla^{ox}. No caso da dSp e dla^{ox} o grupo metoxi proveniente da 8-MeOdGuo é mantido.

A identificação dos produtos formados e dos mecanismos envolvidos na oxidação do DNA por ¹O₂ é muito importante para entender a mutagenicidade observada pela ação dessa espécie e para contribuir na interpretação de estudos que têm relacionado variações nos níveis de 8-oxodGuo com diversos processos patológicos.

A utilização de ferramentas adequadas para detecção de ¹O₂ em sistemas aquosos, como o EAS, possibilitou, também, mostrar que não há geração de quantidades estequiométricas de ¹O₂ na decomposição espontânea de peroxinitrito. Deve ser ressaltado que esta espécie tem sido relacionada a diversos processos oxidativos com importantes implicações biológicas.

Perspectivas

7 Perspectivas

A química envolvida na oxidação da 8-oxodGuo difere do monômero para o polímero de DNA. As razões pelas quais isso ocorre ainda precisam ser desvendadas. Os resultados sobre os produtos formados em ambos os casos são valiosos para monitorar o efeito de outras variáveis sobre o sistema. Nesse sentido, uma estratégia seria avaliar o efeito de pH, seqüência em oligonucleotídeos e temperatura.

O estabelecimento de estratégias de síntese de oligonucleotídeos contendo bases modificadas e estudos de mutagênese e reparo de novas lesões em bactérias e células de mamíferos também são importantes para estabelecer as ligações dos estudos efetuados *in vitro* com efeitos biológicos desses processos.

Referências Bibliográficas

8 Referências bibliográficas

- Adam, W.; Saha-Möller, C.R.; Schönberger, A. (1996) Photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type I and type II photosensitizers, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9233.
- Adams, S.P.; Kavka, K.S.; Wykes, E.J.; Holder, S.B.; Gallupi, G.R. (1983) Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of DNA 51-Mers, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 661.
- Agnez-Lima, L.F.; Di Mascio, P.; Napolitano, R.L.; Fuchs, R.P.P.; Menck, C.F.M. (1999) Mutation spectrum induced by singlet oxygen in *Escherichia coli* deficient in exonuclease III, *Photochem. Photobiol.*, 70, 505.
- 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 $^1\text{O}_2$ -induced mutagenesis in bacteria, *Nucleic Acids Res.*, 29, 2899.
- Allen, M.T.; Lynch, M.; Lagos, A.; Redmond, R.W.; Kochevar, I.E. (1991) A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1075, 42.
- Alvarez, B.; Denicola, A.; Radi, R. (1995) Reaction between peroxyntirite and hydrogen-peroxide-formation of oxygen and slowing of peroxyntirite decomposition, *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 859.
- Ando, W.; Takata, T. (1985) Photooxidation of Sulfur Compounds *In Singlet O₂*, Frimer, A.A., Ed., CRC Press, Boca Raton, Vol. 3, p.1.
- Arnold, S.J.; Ogryslo, E.A.; Witzke, H. (1964) Some new emission bands of molecular oxygen, *J. Chem. Phys.*, 40, 1769.
- Aubry, J.M.; Rigaudy, J.; Cuong N.K. (1981) A water-soluble rubrene derivative: synthesis, properties and trapping of $^1\text{O}_2$ in aqueous solution, *Photochem. Photobiol.*, 33, 149.
- Aubry, J.M. (1985) Search for singlet oxygen in decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 5844.

- Aubry, J.M.; Cazin, B. (1988) Chemical sources of singlet oxygen. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions, *Inorg. Chem.*, 27, 2013.
- Aubry, J.M.; Cazin, B.; Duprat, F. (1989) Chemical sources of singlet oxygen. Peroxidation of water-soluble singlet oxygen carriers with hydrogen peroxide-molybdate system, *J. Org. Chem.*, 54, 726.
- Aubry, J.M. (1991) New chemical sources of singlet oxygen, In *Membrane Lipid Oxidation*, Vigo-Pelfrey, C., Ed., CRC Press, Boca Raton, Vol. 2.
- Aubry, J.M.; Cazin, B.; Rougee, M.; Bensasson, R.V. (1995) Kinetic studies of singlet oxygen [4+2]-cycloadditions with cyclic 1,3-dienes in 28 solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 9159.
- Balasubramanian, D.; Du, X.; Zigler, J.S.J. (1990) The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins, *Photochem. Photobiol.*, 52, 761.
- Barclay, L.C.R.; Baskin, K.A.; Locke, S.J.; Vinqvist, M.R. (1989) Absolute rate constants for lipid peroxidation and inhibition in model membranes, *Can. J. Chem.*, 67, 1366.
- Basu-Modak, S.; Tyrrell, R.M. (1993) Singlet Oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene, *Cancer Res.*, 53, 4505.
- Becker, H.G.O.; Berger, W.; Domscke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewald, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Zeppenfeld, G. (1997), Propriedades, purificação e preparação de reagentes, solventes e materiais importantes, In *Organikum - Química Orgânica Experimental*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Beutner, S.; Bloerdon, B.; Hoffmann, T.; Martin, H-D. (2000) Synthetic singlet oxygen quenchers, *Methods Enzymol.*, 319, 226.
- 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, 106.

- Boveris, A.; Cadenas, E.; Chance, B. (1981) Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions, *Fed. Proc.*, 40, 195.
- Boveris, A.; Cadenas, E. (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species, *In Oxygen, gene expression, and cellular function*, Clerch, L.B. and Massaro, D.J., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 105.
- Breen, A.P.; Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1033.
- Briviba, K; Sies, H. (2000) Biological singlet oxygen quenchers assessed by monomol light emission, *Methods Enzymol.*, 319, 222.
- Browne, R.J.; Ogryslo, E.A. (1964) Chemiluminescence from reaction of chlorine with aqueous hydrogen peroxide, *P. Chem. Soc. London*, 117.
- Buchko, G.W.; Wagner, J.R.; Cadet, J.; Raoul, S.; Weinfeld, M. (1995) Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1263, 17.
- Burrows, C.J.; Muller J.G. (1998) Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chem. Rev.*, 98, 1109.
- Cadet, J.; Berger, M.; Bunchko, G.W.; Joshi, P.C.; Raoul, S.; Ravanat, J.-L. (1994) 2,2-Diamino-4-[(3,5-di-O-acetyl-2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5-(2H)-oxazolone: a novel and predominant radical oxidation product of 3',5'-di-O-acetyl-2'-deoxyguanosine, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 7403.
- Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Morin, B.; Raoul, S.; Ravanat, J.-L.; Spinelli, S. (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage, *Biol. Chem.*, 378, 1275.
- Cadet, J.; Douki, T.; Pouget, J-P.; Ravanat, J.-L. (2000) Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement, *Methods Enzymol.*, 319, 143.
- Cahill, A.E.; Taube, H. (1952) The use of heavy oxygen in the study of reactions of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2312.
- Cazin, B.; Aubry, J. M.; Rigaudy, J. (1986) Is water the best or the worst solvent for [2+4] cycloadditions of singlet oxygen to aromatic compounds?, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 952.

- Cilento, G. (1982) In *Chemical and biological generation of excited states*; Adam, W.; Cilento, G., Eds.; Academic Press, New York.
- Chworos, A.; Coppel, Y.; Dubey, I.; Pratviel, G.; Meunier, B. (2001) Guanine oxidation: NMR characterization of a dehydro-guanidinohydantoin residue generated by a $2e^-$ oxidation of d(GpT), *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5867.
- Coddington, J.W.; Hurst J.K.; Lyman, S.V. (1999) Hydroxyl radical formation during peroxyxynitrous acid decomposition, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 2438.
- Corey, E.J.; Taylor, W.C. (1964) A study of the peroxidation of organic compounds by externally generated singlet oxygen molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3881.
- Costa de Oliveira, R.L.; 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, 4319.
- Dewilde, A.; Pellieux, C.; Pierlot, C.; Wattré P.; Aubry, J.M. (1998) Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide, *Biol. Chem.*, 379, 1377.
- Di Mascio, P.; Sies, H. (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)dipropionate. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2909.
- Di Mascio, P.; Wefers, H.; Do-Thy, H.-P.; Lafleur, M.V.M.; Sies, H. (1989) Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strands breaks, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1007, 151.
- Di Mascio, P.; Murphy, M.E.; Sies H. (1991) Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 194S.
- Di Mascio, P; Bechara, E.J.H.; Medeiros, M.H.G.; Briviba, K.; Sies, H. (1994) Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide, *FEBS Lett.*, 355, 287.
- Di Mascio, P.; Medeiros, M.H.G.; Bechara, E.J.H.; Catalani, L.H. (1995) Singlet molecular oxygen: Generation, reactivity, identification and biological effects, *Ciência e Cultura*, 47, 297.

- Di Mascio, P.; Briviba, K.; Bechara, E.J.H.; Medeiros, M.H.G.; Sies, H. (1996) Reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen, *Methods Enzymol.*, 269, 395.
- Doleiden, F.H.; Fahrenholz, S.R.; Lamola, A.A.; Trozzolo, A.M. (1974) Reactivity of cholesterol and some fatty acids toward singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, 20, 519.
- Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. (1998) Photodynamic Therapy, *J. Natl. Canc. Inst.*, 90, 889.
- Duarte, V.; Muller, J.G.; Burrows, C.J. (1999) Insertion of dGMP and dAMP during in vitro DNA synthesis opposite an oxidized form of 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *Nucleic Acids Res.*, 27, 496.
- Duarte, V.; Gasparutto, D.; Yamaguchi, L.F.; Ravanat, J.-L.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Di Mascio, P.; Cadet, J. (2000) Oxaluric acid as the major product of singlet oxygen-mediate oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12622.
- Duarte, V.; Gasparutto, D.; Jaquinod, M.; Ravanat, J.; Cadet, J. (2001) Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 46.
- *Dufraisse, C.; Velluz, L. (1942), L'union labile de l'oxygène au carbone. Influences des méthoxyles et de leurs positions sur l'état de labilité de oxygène dans les phooxydes mésodiphénylanthracéniques; un peroxyde spontanément dissociable à froid, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 171.
- Encinas, M.V.; Lemp. E.; Lissi, E.A. (1987) Interaction of singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$) with aliphatic amines and hydroxylamines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 8, 1125.
- Fiala, E.S; Conaway, C.C.; Mathis, J.E. (1989) Oxidative DNA e RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropane, *Cancer Res.*, 49, 5518
- Floyd, R.A.; West, M.S.; Eneff, K.L.; Hogsett, W.E.; Tingey, D.T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 262, 266.

- Foote, C.S.; Wexler, S. (1964a) Olefin Oxidations with excited singlet molecular oxygen, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3879.
- Foote, C.S.; Wexler, S. (1964b) Singlet Oxygen. A probable intermediate in photosensitized autooxidation, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3880.
- Foote, C.S.; Wexler, S.; Ando, W.; Higgins, R. (1968) Chemistry of Singlet Oxygen. IV. Oxygenations with hypochlorite-hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 975.
- Foote, C.S.; Peterson, E.R.; Lee, K.-W. (1972) Chemistry of Singlet Oxygen. XVI. Long lifetime of singlet oxygen in carbon disulfide, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1032.
- Foote, C.S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 54, 659.
- Foote, C.S.; Clennan, E.L (1995) Properties and reactions of singlet dioxygen, *In Active oxygen in chemistry*, Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A. and Liebman J.F.; Eds., Vol. 2, 105.
- Gasparutto, D.; Ait-Abbas, M.; Jaquinod, M.; Boiteux, S.; Cadet, J. (2000a) Repair and coding properties of 5-hydroxy-5-methylhydantoin nucleosides inserted into DNA oligomers, *Chem. Res. Toxicol.*, 13, 575.
- Gasparutto, D.; Bourdat, A.G.; D'Ham, C.; Duarte, V.; Romieu, A.; Cadet, J. (2000b) Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides, *Biochimie*, 82, 19.
- Gilbert, A.; Baggott, J. (1991) Photo-oxygenation reactions, *In Essentials of molecular photochemistry*, Blackwell scientific publications.
- Goldstein, S.; Czapski, G. (1998) Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: evidence for carbonate radical production, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 3458.
- Goyal, R.N.; Jain, N.; Garg, D.K. (1997) Electrochemical and enzymic oxidation of guanosine and 8-hydroxyguanosine and the effects of oxidation products in mice, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43, 105.
- Grether-Beck, S.; Olaizola-Horn, S.; Schmitt, H.; Grewe, M.; Jahnke, A.; Johnson, J.P.; Briviba, K.; Sies, H.; Krutmann, J. (1996) Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression

- of the human intercellular adhesion molecule 1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93,14586.
- Grether-Beck, S.; Bonizzi, G.; Schmitt-Brenden, H.; Felsner, I.; Timmer, A.; Sies, H.; Johnson, J.P.; Piette, J.; Krutmann, J. (2000) Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation, *EMBO J.*, 19, 5793.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C (1990) The antioxidants of human extracellular fluids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 1.
- Halliwell B.; Gutteridge J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford University Press, Inc., New York.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J. Immun. Meth.*, 119, 203.
- Hayakawa, H.; Taketomi, A.; Sakumi, K.; Kuwano, M.; Sekiguchi, M. (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells, *Biochemistry*, 34, 89.
- Helbock, H.J.; Beckman, K.B.; Ames, B.N. (1999) 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage, *Methods Enzymol.* 300, 156.
- Held, A.M.; Halko, D.J.; Hurst J.K. (1978) Mechansims of chlorine oxidation of hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 5732.
- Hickerson, R.P.; Prat, F.; Muller, J.G.; Foote, C.S.; Burrows, C.J. (1999) Sequence and stacking dependence of 8-oxoguanine oxidation: comparison of one-electron vs singlet oxygen mechanisms, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9423.
- Ho, R.Y.N.; Liebman, J.F.; Valentine, J.S. (1995) Overview of the energetics and reactivity of oxygen, *In Active oxygen in chemistry*, Foote, C.S.; Valentine, J.S.; Greenberg, A. and Liebman J.F.; Eds., Vol. 2, 1.
- Hodges, G.R.; Ingold, K.U. (1999) Cage-escape of geminate radical pairs can produce peroxynitrate from peroxynitrite under a wide variety of experimental conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 10695.
- Howard, J.A.; Ingold, K.U. (1968) The self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1057.

- Hua, Y.; Wainhaus, S.B.; Yang, Y.; Shen, L.; Xiong, Y.; Xu, X.; Zhang, F.; Bolton, J.L.; van Breemen, R.B. (2000) Comparison of negative and positive ion electrospray tandem mass spectrometry for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of oxidized deoxynucleosides, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 12, 80.
- Ikeda, H.; Saito I. (1999). 8-Methoxydeoxyguanosine as an effective precursor of 2-aminoimidazolone, a major guanine oxidation product in one-electron oxidation of DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 121, 10836.
- Jones, I.T.N.; Bayes, K.D. (1972) Electronic energy transfer from $^{32}\text{O}_2$ ($a^1\Delta_g$) to $^{36}\text{O}_2(X^3\Sigma_g^-)$, *J. Chem. Phys.*, 57, 1003.
- Kajiwara, T.; Kearns, D.R. (1973) Direct spectroscopic evidence for a deuterium solvent effect on the lifetime of singlet oxygen in water, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 5886.
- Kang, P.; Foote, C.S. (2002a) Formation of Transient Intermediates in Low-Temperature Photosensitized Oxidation of an 8- ^{13}C -Guanosine Derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4865.
- Kang, P.; Foote, C.S. (2002b) Photosensitized Oxidation of $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -Labeled Imidazole Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 9629.
- Kanofsky, J.R. (1989) Singlet oxygen production by biological systems, *Chem. Biol. Interactions*, 70, 1.
- Kasai, H.; Yamaizumi, Z.; Berger, M.; Cadet, J. (1992) Photosensitized formation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in DNA by riboflavin, a non-singlet oxygen mediated reaction, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 9692.
- Kautsky, H. (1939) Quenching of luminescence by oxygen, *Trans. Faraday Soc.*, 35, 216.
- Kearns, D.R. (1971) Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen, *Chem. Rev.*, 71, 395.
- Kellogg, R.E. (1969) Mechanism of chemiluminescence from peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 5433.
- Khan, A.U.; Kasha, M (1963) Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution, *J. Chem. Phys.*, 39, 2105.
- Khan, A.U.; Kasha, M (1964) Correction, *J. Chem. Phys.*, 40, 605.

- Khan, A.U. (1976) Singlet molecular oxygen. A new kind of oxygen. *J. Phys. Chem.*, 80, 2219.
- Khan, A.U. (1981) Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g$) in the reaction of potassium superoxide with water, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6516.
- Khan, A.U.; Kovacic, D.; Kolbanovskiy, A.; Desai, M.; Frenkel, K.; Geacintov, N.E. (2000) The decomposition of peroxyxynitrite to nitroxyl anion (NO^-) and singlet oxygen in aqueous solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 2984.
- Klotz, L.O.; Pellieux, C.; Briviba, K.; Pierlot, C.; Aubry, J.M.; Sies, H. (1999) Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA, *Eur. J. Biochem.*, 260, 917.
- Kochevar, I.E.; Redmond, R.W. (2000) Photosensitized production of singlet oxygen, *Methods Enzymol.*, 319, 20.
- Kohda, K.; Tsunomoto, H.; Minoura, Y.; Tanabe, K.; Shibutani, S. (1996) Synthesis, miscoding specificity, and thermodynamic stability of oligodeoxynucleotide containing 8-methyl-2'-deoxyguanosine, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1278.
- Koppenol, W.H. (1989) *In Focus on Membrane Lipid Oxidation*, Ed. Vigo-Pelfrey, C., CRC Press, Boca Raton, Vol. 1.
- Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A.E. (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 26, 463.
- Krasnovsky jr, A.A.; Kagan, V.E.; Minin, A.A. (1983) Quenching of singlet oxygen luminescence by fatty acids and lipids, *FEBS Lett.*, 155, 233.
- Kreitner, M.; Ebermann, R.; Alth, G. (1996) Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. B*, 36, 109.
- Lambert, C.R.; Kochevar, I.E. (1997) Electron transfer quenching of the rose bengal triplet state, *Photochem. Photobiol.*, 66, 15.
- Lee, P.C.; Rodgers, M.A. (1987) Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem Photobiol.*, 45, 79.

- Leipold, M.D.; Muller, J.G.; Burrows, C.J.; David, S.S. (2000) Removal of hydantoin products of 8-oxoguanine oxidation by the Escherichia coli DNA repair enzyme, FPG, *Biochemistry*, 39, 14984.
- Li, M.Y.; Cline, C.S.; Koker, E.B.; Carmichael, H.H.; Chignell, C.F.; Bilski, P. (2001) Quenching of singlet molecular oxygen (1O_2) by azide anion in solvent mixtures, *Photochem. Photobiol.*, 74, 760.
- Lissi, E.A.; Encinas, M.V.; Lemp, E.; Rubio, M.A. (1993) Singlet Oxygen O_2 ($^1\Delta_g$) bimolecular process. Solvent and compartmentalization effects, *Chem. Rev.*, 93, 699.
- Lock, G.; Walter, E. (1942), Über die chlormethylierung des naphthalins und die verwendung des 1,5-di-chlormethylnaphthalins zur synthese polycyclischer ringsysteme, I. Mitteilung, *Chem. Ber.*, 75B, 1158.
- Luo, W.; Muller, J.G.; Rachlin, E.M.; Burrows, C.J. (2000) Characterization of spiroiminodihydantoin as a product of one-electron oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, *Org. Letters*, 2, 613.
- Luo, W.; Muller, J.G.; Rachlin, E.M.; Burrows, C.J. (2001a). Characterization of hydantoin products from one-electron of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine in a nucleoside model, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 927.
- Luo, W.; Muller, J.G.; Burrows, C.J. (2001b) The pH-dependent role of superoxide in riboflavin-catalyzed photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, *Organic Lett.*, 3, 2801.
- Maki, H.; Sekiguchi, M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, 355, 273.
- Marvel, C.S.; Wilson, B.D. (1958), Synthetic studies in the dihydropyrene series, *J. Org. Chem.*, 54, 726.
- McBride, L.J.; Caruthers, M.H. (1983) Nucleotide chemistry. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, 24, 245.
- McCall, D.B. (1984) Sodium 9,10-bis(2-ethylene)anthracene Disulfate: a new water-soluble singlet oxygen trap for biological systems and polymer-immobilized naphthalene endoperoxides: a new convenient singlet oxygen generator, *Tese da Wayne State University*.

- Menck, C.F.M.; Di Mascio, P.; Agnez, L.F.; Ribeiro, D.T.; Oliveira, R.C. (1993) Genetic deleterious effects of singlet oxygen, *Química Nova*, 16, 328.
- Michaels, M.L.; Tchou, J.; Grollman, A.P.; Miller, J.H. (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine, *Biochemistry*, 31, 10964.
- Min, D.B.; Boff, J.M. (2002) Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1, 58.
- Moan, J. (1990) On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues, *J. Photochem. Photobiol. B*, 6, 343.
- Moan, J.; Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, 53, 549.
- Monroe, B. M. (1985) Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants, *In Singlet O₂*, Frimer, A.A., Ed., CRC Press, Boca Raton, Vol. 1.
- *Moureu, C.; Dufraisse, C.; Dean, P.M. (1926a) Un peroxyde organique dissociable: le peroxyde de rubrène, *C. R. Acad. Sci.*, 182, 1584.
- *Moureu, C.; Dufraisse, C.; Dean, P.M. (1926b) Peroxyde de rubrène: nouvelles expériences, *C. R. Acad. Sci.*, 183, 1101.
- Niles, J.C.; Burney, S.; Singh, S.P.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (1999). Peroxynitrite reaction products of 3',5'-di-O-acetyl-8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11729.
- Niles, J.C.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R. (2001). Spiroiminodihydantoin is the major product of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine reaction with peroxynitrite in the presence of thiols and guanosine photooxidation by methylene blue, *Organic Lett.* 3, 963.
- Nonell, S.; Braslavsky, S.E. (2000) Time-resolved singlet oxygen detection, *Methods Enzymol.*, 319, 37.
- Pierlot, C.; Hajjam, S.; Barthélémy, C.; Aubry, J.M. (1996) Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (¹O₂, ¹Δ_g) carriers for biological media, *J. Photochem. Photobiol. B*, 36, 31.
- Pierlot C.; Aubry J.M. (1997) First evidence of the formation of the 5,8-endoperoxide from the oxidation of 1,4-disubstituted naphthalene of singlet oxygen, *Chem. Comm.*, 2290.

- Pierlot C.; Aubry J.M.; Briviba K.; Sies H.; Di Mascio P. (2000a) Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media, *Methods Enzymol.*, 319, 3.
- Pierlot, C.; Poprawski, J.; Marko, J.; Aubry, J.M. (2000b) Effects of oxygenated substituents on the [4+2] cycloaddition of singlet oxygen in the photooxygenation of water-soluble naphthyl ethers, *Tetrahedron Lett.*, 41, 5063.
- Pouget, J.-P.; Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Richard, M.-J.; Cadet, J. (1999) Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma-radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays, *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 51.
- Prat, F.; Hou, C.-C.; Foote, C.S. (1997) Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in nonaqueous solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 5051.
- Prat, F.; Houk, K.N.; Foote, C.S. (1998) Effect of guanine stacking on the oxidation of 8-oxoguanine in B-DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 845.
- Radi, R.; Turrens, J.F.; Freeman, B.A. (1991) Cytochrome C-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 118.
- Raoul, S.; Cadet, J. (1996) Photosensitized reaction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: identification of 1-(2-Deoxy- β -erythro-pentofuranosyl) cyanuric acid as the major singlet oxygen oxidation product, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 1892.
- Raoul, S.; Berger, M.; Buchko, G.W.; Joshi, P.C.; Morin, B.; Weinfeld, M.; Cadet, J. (1996) ^1H , ^{13}C and ^{15}N nuclear magnetic resonance analysis and chemical features of the two main radical oxidation products of 2'-deoxyguanosine: Oxazolone and imidazolone nucleosides, *J. Chem. Soc. Perk. Trans. 2*, 3, 371.
- Ravanat, J.-L. (1992) Photosensibilisation des acides nucleiques, Tese de Doutorado apresentada à Université Joseph Fourier de Grenoble- França.
- Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Incardona, M.-F.; Cadet, J. (1993), HPLC separations of normal and modified nucleobases and nucleosides on an amino silica gel column, *J. Liq. Chrom.*, 16(15), 3185.

- Ravanat, J.-L.; Cadet, J. (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterization of the main oxidation products, *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 379.
- Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G.R.; Medeiros, M.H.G.; Cadet, J. (2000a) Singlet Oxygen induces oxidation of cellular DNA, *J. Biol. Chem.*, 275, 40601.
- Ravanat, J.-L.; Remaud, G.; Cadet, J. (2000b) Measurement of the main photooxidation products of 2'-deoxyguanosine using chromatographic methods coupled to mass spectrometry, *Arch. Biochem. Biophys.*, 374, 118.
- 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.
- Ribeiro, D.T.; Costa de Oliveira R.L.; Di Mascio, P.; Menck, C.F.M. (1994), Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a single-stranded shuttle vector replicated in monkey cells, *Free Radic. Res. Commun.* 21, 75.
- Rigaudy, J; Delétang, C.; Basselier, J.-J. (1966) Effets des substituants sur la photooxydation des systèmes aromatiques. Premier exemple d'isolement d'un photooxyde en série naphthalénique; sa dissociation thermique, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 263, 1435.
- Rigaudy, J.; Delétang, C.; Basselier, J.-J. (1969) Autoxydation photosensibilisée du diméthoxy-1,4-naphtalène: le photooxyde et ses produits de transformation, *C. R. Acad. Sc. Paris*, 268, 344.
- Roelen, H.C.; Saris, C.P.; Brugghe, H.F.; van den Elst, H.; Westra, J.G.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. (1991) Solid-phase synthesis of DNA fragments containing the modified base 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Nucleic Acids Res.*, 19, 4361.
- Rougee, M.; Bensasson, R.V.; Land, E.J.; Pariente, R. (1988) Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity, *Photochem. Photobiol.*, 47, 485.
- Russell, G.A. (1957) Deuterium-isotope effects in the autoxidation of aralkyl hydrocarbons. Mechanism of the interaction of peroxy radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 3871.

- Ryter, S.W.; Tyrrell, R.M. (1998) Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression, *Free Radical Biology and Medicine*, 24, 1520.
- Saito, I.; Matsuura, T.; Inoue, K. (1981), Formation of superoxide ion from singlet oxygen. On the use of a watersoluble singlet oxygen source, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 188.
- Saito, I.; Takayama, M.; Sugiyama, H.; Nakatani, K. (1995) Photoinduced DNA cleavage via electron transfer: demonstration that guanine residues located 5' to guanine are the most electron-donating sites, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6406.
- Schaller, H., Weimann, G., Khorana, H.G., Lerch, B. (1963) Studies on polynucleotides. Stepwise synthesis of specific deoxyribonucleotides – Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new synthesis of deoxyribonucleoside-3 phosphates, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3821.
- Scharffetter-Kochanek, K.; Wlaschek, M.; Briviba, K.; Sies, H. (1993) Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett*, 331, 304.
- Schmidt, R., Afshari, E. (1992) Collisional deactivation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ by solvent molecules. Comparative experiments with $^{16}\text{O}_2$ and $^{18}\text{O}_2$, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 96, 788.
- Schnuriger, B.; Bourdon, J. (1968) Phototosensitized oxidation through stearate monomolecular films, *Photochem. Photobiol.*, 8, 361.
- Schulz, W.A.; Bendorf, M.S.W.; Sies, H. (1994) Localization of strand breaks in plasmid DNA treated with reactive oxygen species, *Methods Enzymol.*, 234, 45.
- Sheu, C.; Foote, C.S. (1993) Endoperoxide formation in a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*; 115, 10446.
- Sheu, C.; Foote, C.S. (1995a) Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine (“8-hydroxyguanosine”) formed by photooxidation of a guanosine derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6439.
- Sheu, C.; Foote, C.S. (1995b) Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative. Formation of dioxetane and hydroperoxide intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 474.

- Sheu, C.; Foote, C.S. (1995c) Solvent and electronic effects on the reaction of guanosine derivatives with singlet oxygen, *J. Org. Chem.*, 60, 4498.
- Sheu, C.; Kang, P.; Khan, S.; Foote, C.S. (2002) Low-Temperature Photosensitized Oxidation of a Guanosine Derivative and Formation of an Imidazole Ring-Opened Product, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 3905.
- Shigenaga, M.K.; Park, J.-W.; Cundy, K.C.; Gimeno, C.J.; Ames, B.N. (1990), In vivo oxidative DNA damage measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Methods Enzymol.*, 186, 521.
- Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 25, 1058.
- Sies, H. (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection, *Mut. Res.*, 299, 183.
- Sinha, N.D., Biernat, J., Koster, H. (1983) Beta-cyanoethyl N,N-dialkylamino/N-Morpholinomonochloro phosphoramidites. New phosphotilating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, 24, 5843.
- Spassky, A.; Angelov, D. (1997) Influence of the local helical conformation on the guanine modifications generated from one-electron DNA oxidation, *Biochemistry*, 36, 6571.
- Sary, A.; Sarasin, A. (2000) Ultraviolet A- and singlet oxygen-induced mutation spectra, *Methods Enzymol.*, 319, 153.
- Staschewski, D. (1974) The stable isotopes of oxygen in research and technical applications, *Angew. Chem. Ind. Ed.*, 13, 357.
- Steinbeck, M.J.; Khan, A.U.; Karnovsky, M.J. (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.*, 267, 13425.
- Sysak, P.K; Foote C.S.; Ching T.-Y. (1977) Chemistry of singlet oxygen - XXV Photooxygenation of methionine, *Photochem. Photobiol.* 26, 19.
- Tatsuzawa, H.; maruyama, T.; Misawa, N.; Fujimori, K.; Hori, K.; Sano, Y.; Kambayashi, Y.; Nakano, M. (1998) Inactivation of bacterial respiratory chain enzymes by singlet oxygen, *FEBS Lett.*, 439, 329.

- Tomita, M.; Irie, M.; Ukita, T. (1969) Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction, *Biochemistry*, 8, 5149.
- Turro, N.J.; Chow, M.F.; Rigaudy, J. (1981) Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 7218.
- Tyrrell, R.M.; Pidoux, M. (1989) Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations, *Photochem. Photobiol.*, 49, 407.
- Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M., Kobayashi, Y. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS, *Nucleic Acids Res.*, 22, 1774.
- Wasserman, H.H.; Scheffer, J.R. (1967) Singlet oxygen reactions from photoperoxides, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3073.
- Wilkinson, F.; Helman, W.P.; Ross, A.B. (1995) Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 24, 663-1021.
- Waschek, M.; Wenk, J.; Brenneisen, P.; Briviba, K.; Schwarz, A.; Sies, H.; Scharffetter-Kochanek, K. (1997) Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro, *FEBS Lett.*, 413, 239.
- Wright, A.; Bulb, W.A.; Hawkins, C.L.; Davies M.J. (2002) Singlet Oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues, *Photochem. Photobiol.*, 76, 35.
- Vever-Bizet, C.; Dellinger, M.; Brault, D.; Rougee, M.; Bensasson, R.V. (1989) Singlet molecular oxygen quenching by saturated and unsaturated fatty-acids and by cholesterol, *Photochem. Photobiol.*, 50, 321.
- Vialas, C.; Pratviel, G.; Claparols, C.; Meunier, B. (1998) Efficient Oxidation of 2'-Deoxyguanosine by Mn-TMPyP/KHSO₅ to Imidazolone dlz without Formation of 8-Oxo-dG, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 11548.
- Vialas, C.; Claparols, C.; Pratviel, G.; Meunier, B. (2000) Guanine Oxidation in Double-Stranded DNA by Mn-TMPyP/KHSO₅: 5,8-Dihydroxy-7,8-

dihydroguanine Residue as a Key Precursor of Imidazolone and Parabanic Acid Derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2157.

Vogel, A.I. (1989) *In Vogel's textbook of practical organic chemistry*, revisado por Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R.; John Wiley & Sons, Inc.

***Referências citadas em (Aubry, 1991)**

Anexos

Anexo I
1,4-Bis(bromometil)naftaleno

Tabela I.1 Constantes de acoplamento para o BBMN.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	J_{ab} (orto) = 6,5; J_{ab} (meso) = 3,3
b	duplo dublete	J_{ba} (orto) = 6,5; J_{ba} (meso) = 3,4

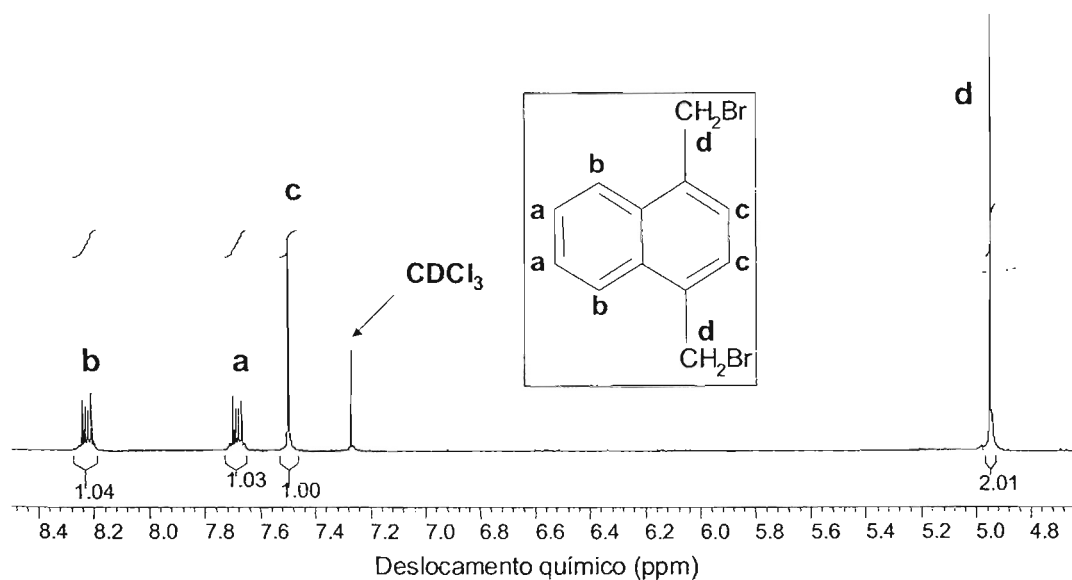


Figura I.1. Espectro de RMN de ^1H do BBMN em CDCl_3 .

Anexo II

Éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de dietila

Tabela II.1 Constantes de acoplamento para o éster α,α' -dicarboxi-1,4-naftalenobispropanoato de dietila.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	$J_{ab}(\text{orto}) = 6,6$; $J_{ab}(\text{meso}) = 3,3$
b	duplo dublete	$J_{ba}(\text{orto}) = 6,6$; $J_{ba}(\text{meso}) = 3,3$
d	dublete	$J_{de} = 7,9$
e	tripleto	$J_{ed} = 7,9$
f	quarteto	$J_{fg} = 7,1$
g	tripleto	$J_{gf} = 7,1$

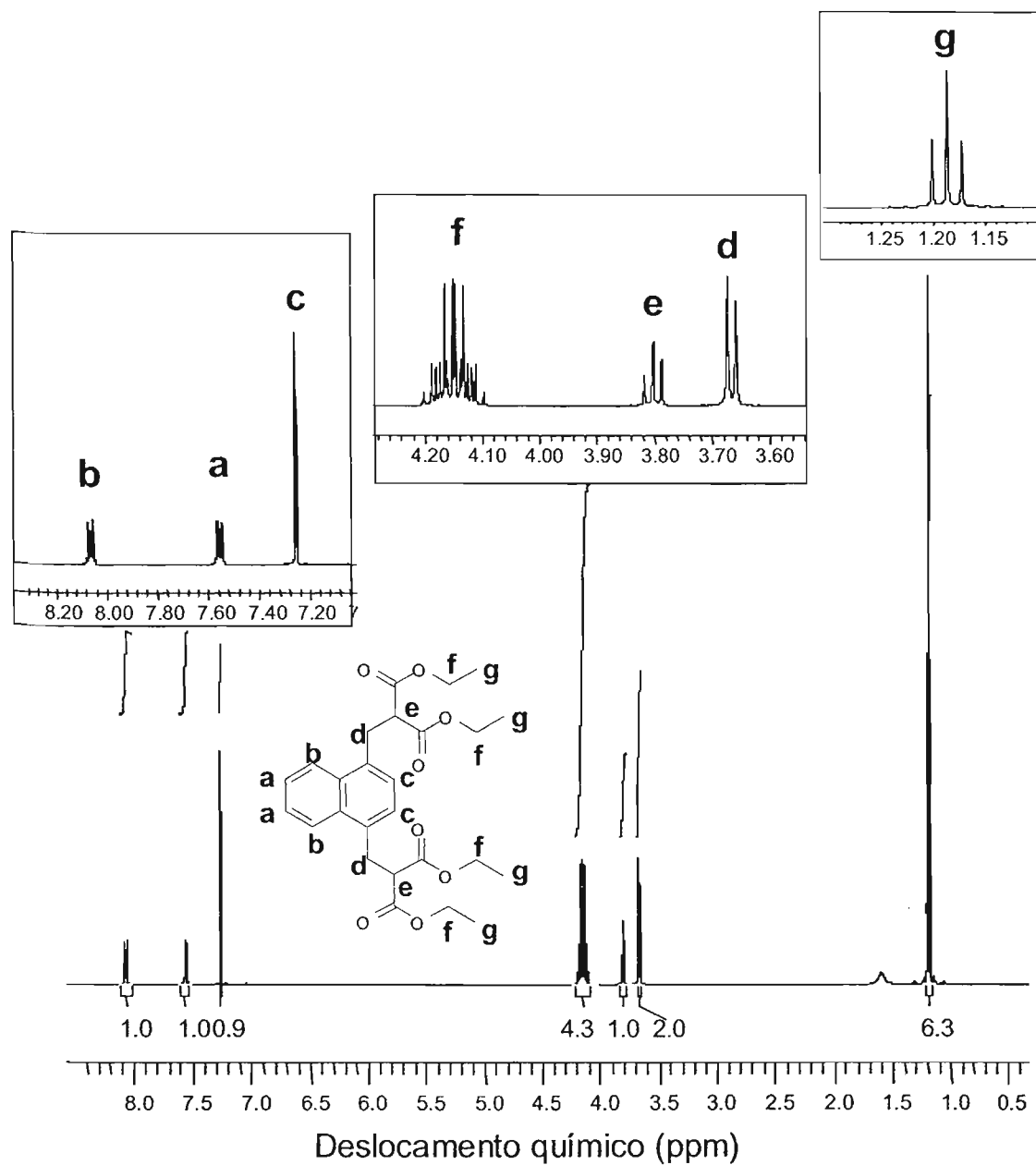


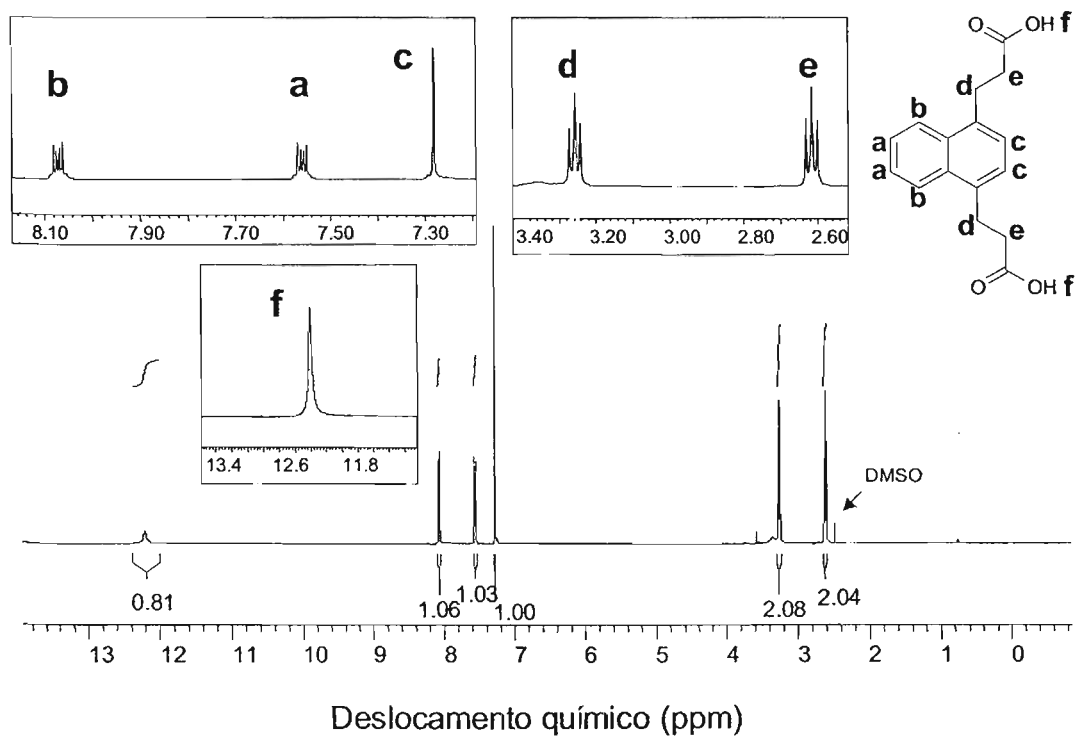
Figura II.1 Espectro de RMN de ^1H do éster α, α' -dicarbetoxi-1,4-naftalenobispropanoato de dietila em CDCl_3 .

Anexo III

Ácido 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanóico

Tabela III.1 Constantes de acoplamento para o ANDP.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	J_{ab} (orto) = 6,5; J_{ab} (meso) = 3,3
b	duplo dublete	J_{ba} (orto) = 6,5; J_{ba} (meso) = 3,3
d	tripleto	J_{de} = 8,02
e	tripleto	J_{ed} = 8,02

Figura III.1 Espectro de RMN de ^1H do ANDP em DMSO-d_6 .

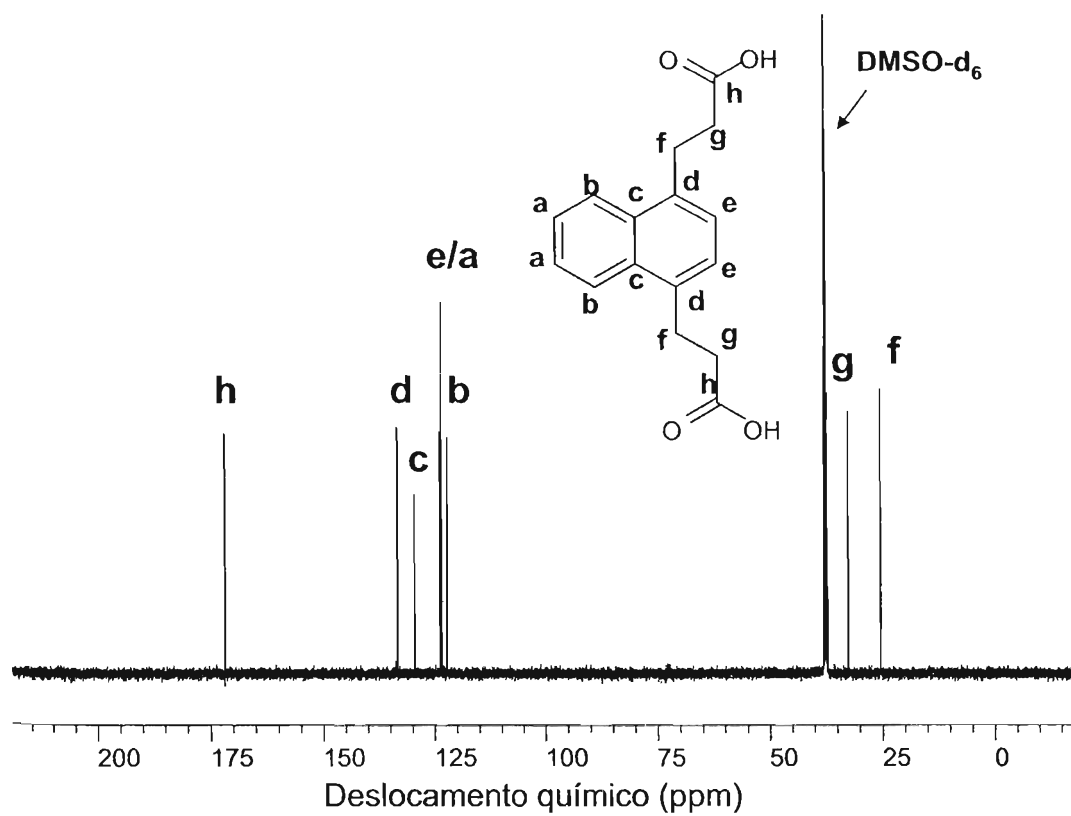


Figura III.2 Espectro de RMN de ^{13}C do ANDP em DMSO-d_6 .

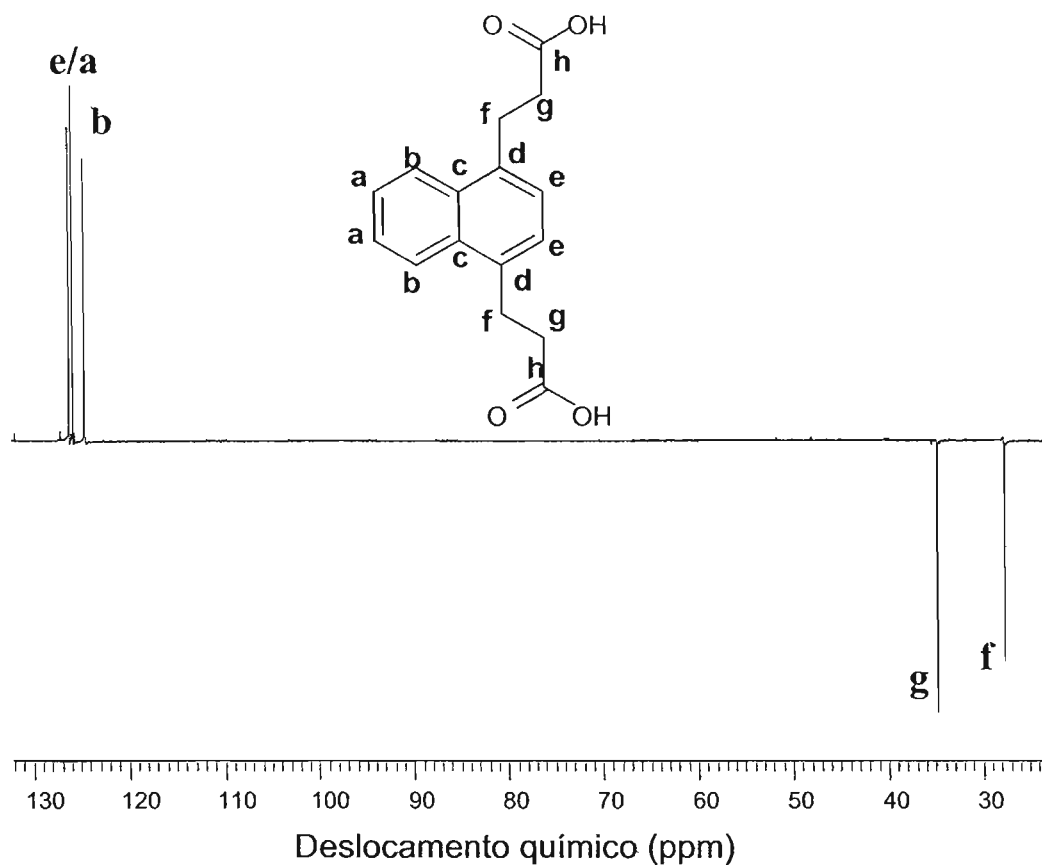


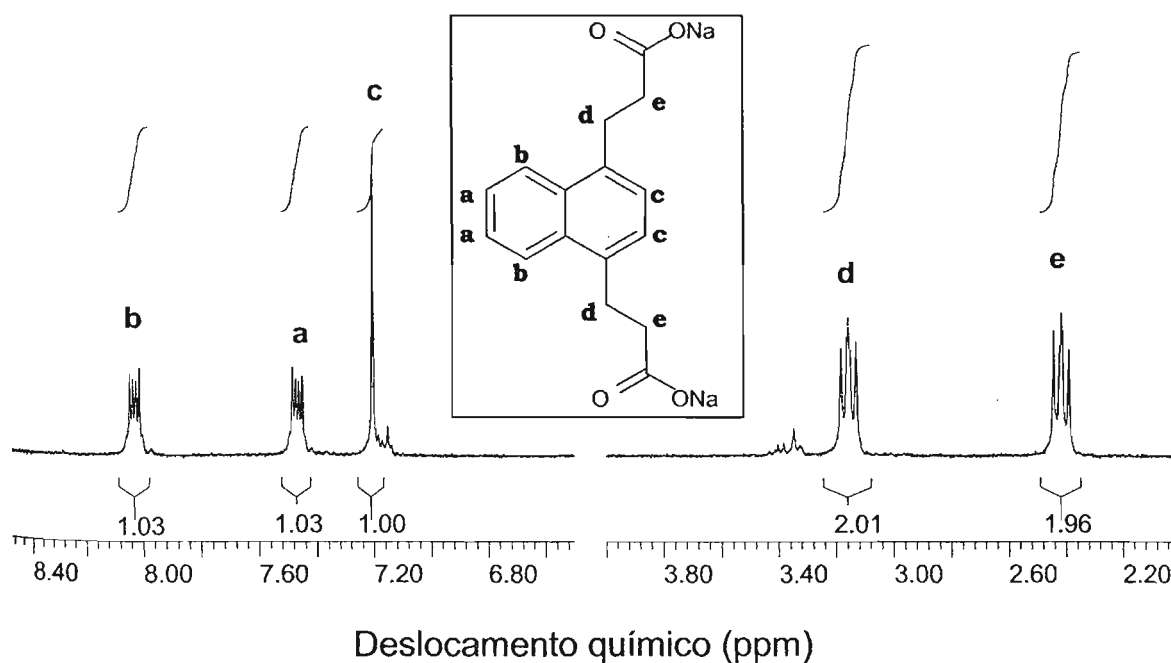
Figura III.3 Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT) do ANDP em DMSO-d_6 .

Anexo IV

3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de sódio

Tabela IV.1 Constantes de acoplamento para o NDP.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	J_{ab} (orto) = 6,5; J_{ab} (meso) = 3,3
b	duplo dublete	J_{ba} (orto) = 6,5; J_{ba} (meso) = 3,3
d	tripleto	J_{de} = 8,02
e	tripleto	J_{ed} = 8,02

Figura IV.1 Espectro de RMN de ^1H do NDP em D_2O .

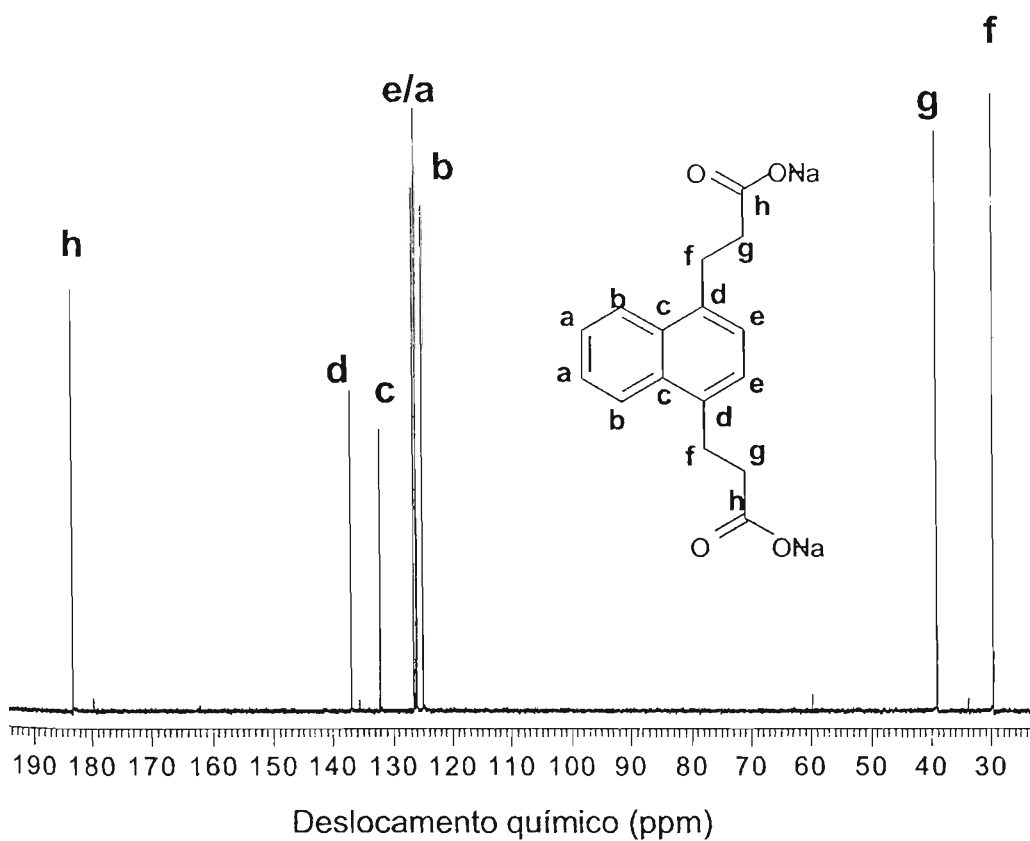


Figura IV.2 Espectro de RMN de ^{13}C do NDP em D_2O .

O espectro de massas obtido em modo ESI⁻ do produto apresenta um pico mais intenso e majoritário de valor 271 m/z , correspondendo à molécula de NDP sem os dois átomos de sódio e com um próton, e um pico de valor 135 m/z , correspondendo à molécula de NDP sem os dois átomos de sódio, logo duplamente carregada.

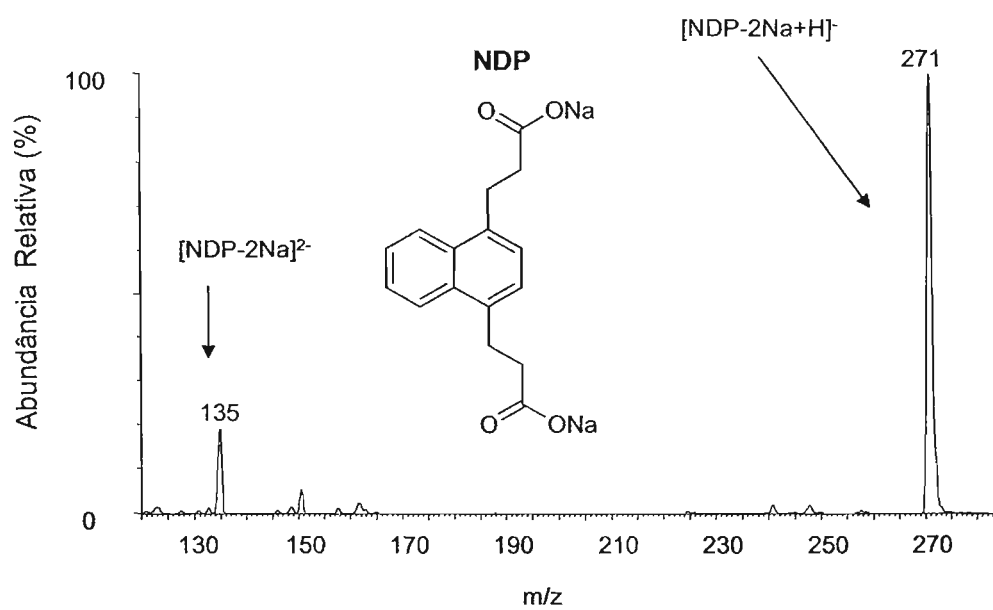


Figura IV.3 Espectro de massas do NDP obtido no modo ESI⁻.

Anexo V

3,3'-(1,4-Naftilideno)dipropanoato de etila

Tabela V.1 Constantes de acoplamento para o 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de etila.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	J_{ab} (orto) = 6,6; J_{ab} (meso) = 3,3
b	duplo dublete	J_{ba} (orto) = 6,6; J_{ba} (meso) = 3,3
d	Triplete	J_{de} = 7,9
e	Triplete	J_{ed} = 7,9
f	quarteto	J_{fg} = 7,1
g	Triplete	J_{gf} = 7,2

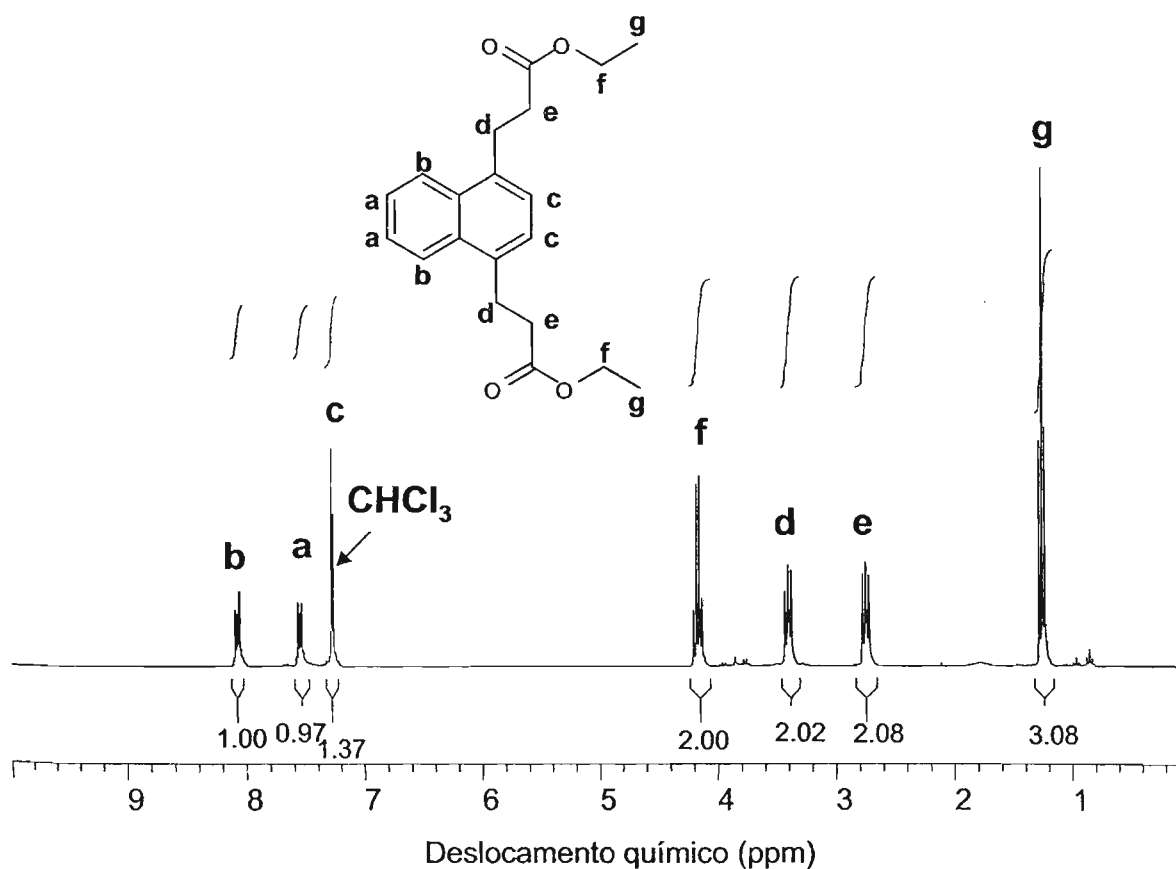


Figura V.1 Espectro de RMN de ^1H do NDPE em CDCl_3 .

O espectro de massas obtido em modo ESI⁺ (Figura V.2) apresenta um pico mais intenso e majoritário de valor 329 *m/z*, correspondendo à molécula do diéster com um próton, o segundo pico mais intenso de valor 351 *m/z* corresponde à molécula do diéster com um átomo de sódio. Os sinais em *m/z* 346 e 367 correspondem aos adutos com amônio e potássio respectivamente.

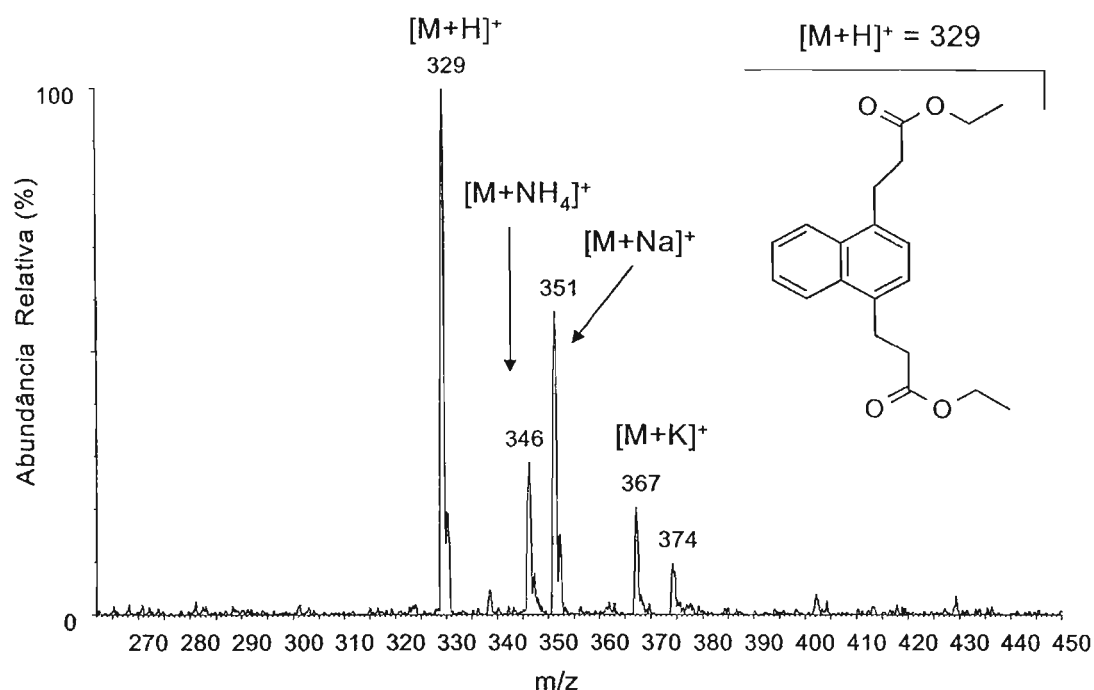


Figura V.2 Espectro de massas do NDPE obtido no modo ESI⁺.

Anexo VI

***N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida**

Os hidrogênios que se encontram nos carbonos vicinais ao centro quiral, não são magneticamente equivalentes e seus acoplamentos foram verificados no espectro feito em água deuterada.

Tabela VI.1 Constantes de acoplamento do DHPN para análise em D₂O.

H	tipo de sinal	J (Hz)
a	duplo dublete	$J_{ab}(\text{orto}) = 6,5; J_{ab}(\text{meso}) = 3,2$
b	duplo dublete	$J_{ba}(\text{orto}) = 6,5; J_{ba}(\text{meso}) = 3,2$
d	triplete	$J_{de} = 7,3$
e	triplete	$J_{ed} = 7,3$
g ₁	duplo dublete	$J_{g_1g_2} = 11,9; J_{hg_1} = 4,1$
g ₂	duplo dublete	$J_{g_2g_1} = 11,9; J_{hg_2} = 6,3$
i ₁	duplo dublete	$J_{i_1i_2} = 13,9; J_{hi_1} = 6,8$
i ₂	duplo dublete	$J_{i_2i_1} = 13,9^*; J_{hi_2} = 5,4$

* valores estimados em função de i₁ de acordo com o que seria esperado.

** soma das integrais, pois os sinais se sobrepõem em 2,915 ppm

Como pode ser observado, os sinais menores de i₂ devem estar sob os sinais de g₂. Esta hipótese é suportada pela observação de que o valor da integral referente a g₂ é um pouco maior que o esperado (cerca de 0,3 a mais), sendo que este valor somado a integral (i₁+i₂) resulta em 4,1 aproximadamente.

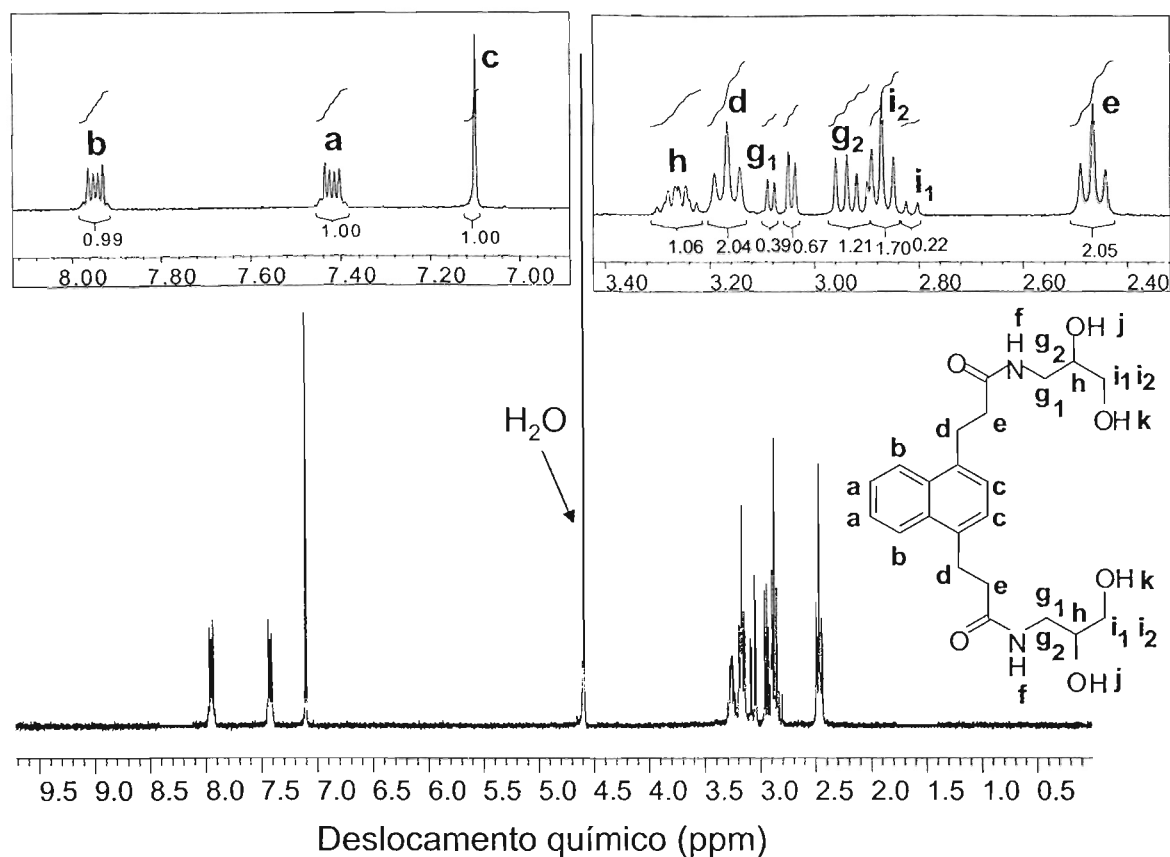


Figura VI.1 Espectro de RMN de ^1H do DHPN em D_2O .

Para detecção dos hidrogênios dos heteroátomos foi feito um espectro com a amostra dissolvida em DMSO-d_6 .

Tabela VI.2 Constantes de acoplamento para os prótons dos heteroátomos do DHPN para análise em DMSO-d_6 .

H	tipo de sinal	J (Hz)
f	Triplete	$J_{fg} = 5,7$
j	Dublete	$J_{jh} = 4,8$
k	Triplete	$J_{ki} = 6,0$

Em função das características do espectro, o próton f parece ter a mesma constante de acoplamento com g_1 e g_2 , e o próton k parece ter a mesma constante de acoplamento com i_1 e i_2 , pois em ambos os casos, um duplo dublete não foi observado.

Esses valores de integrais são um pouco menores que os esperados, porém isso pode ser explicado por uma possível troca com a água que apresenta um sinal intenso em 3,3.

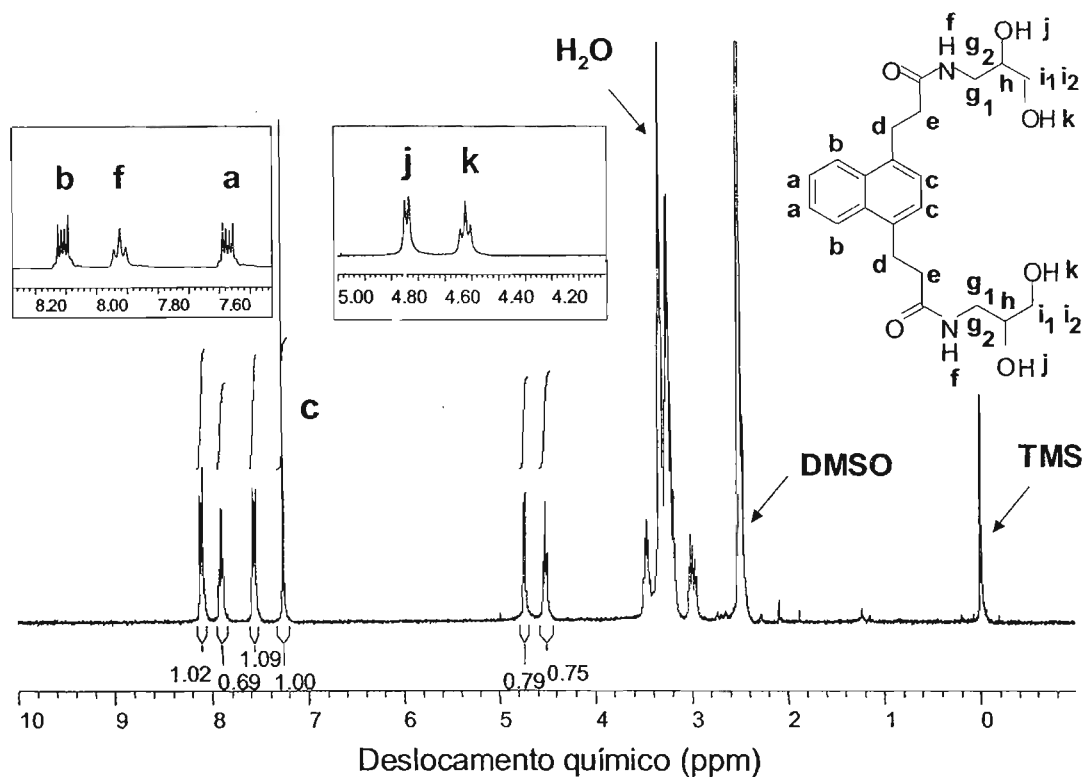


Figura VI.2 Espectro de RMN de ^1H do DHPN em DMSO-d_6 .

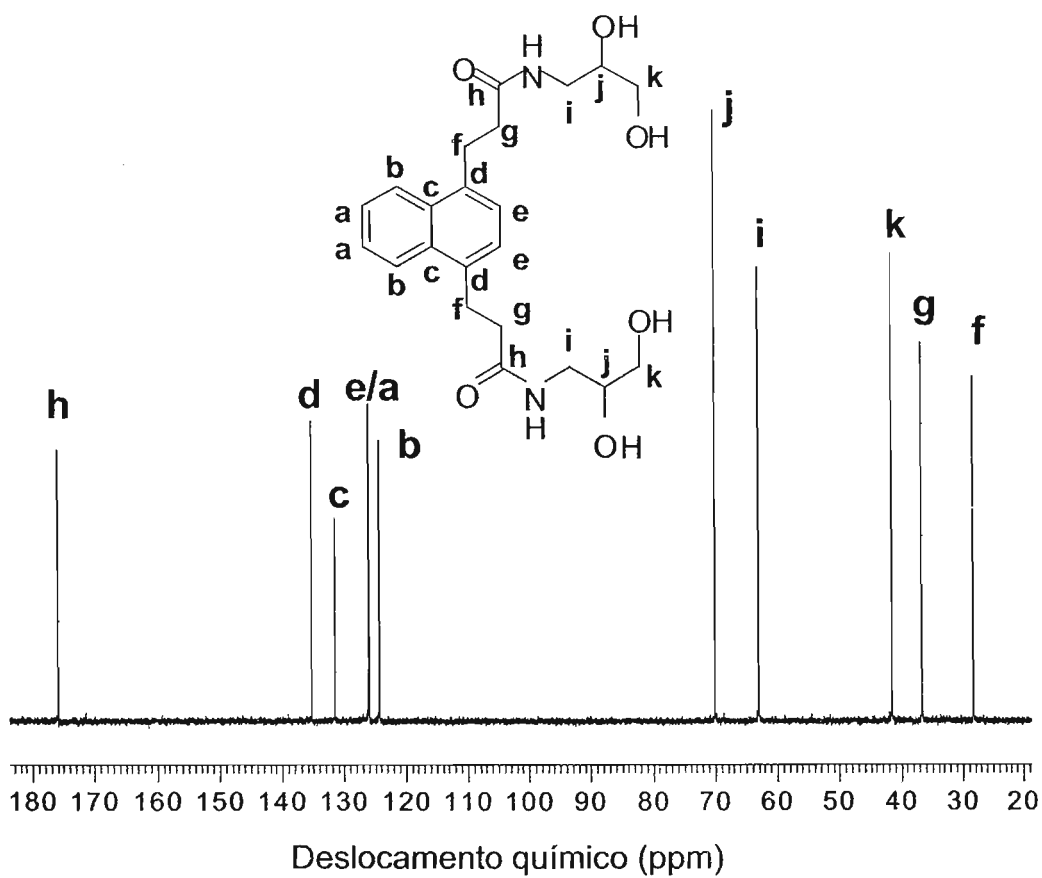


Figura VI.3 Espectro de RMN de ^{13}C do DHPN em D_2O .

O espectro de massas obtido em modo ESI⁺ (Figura VI.3) apresenta um pico mais intenso e majoritário de valor 419 *m/z*, correspondendo à molécula do produto com um próton, o segundo pico mais intenso de valor 436 *m/z* corresponde à molécula do DHPN com um íon amônio.

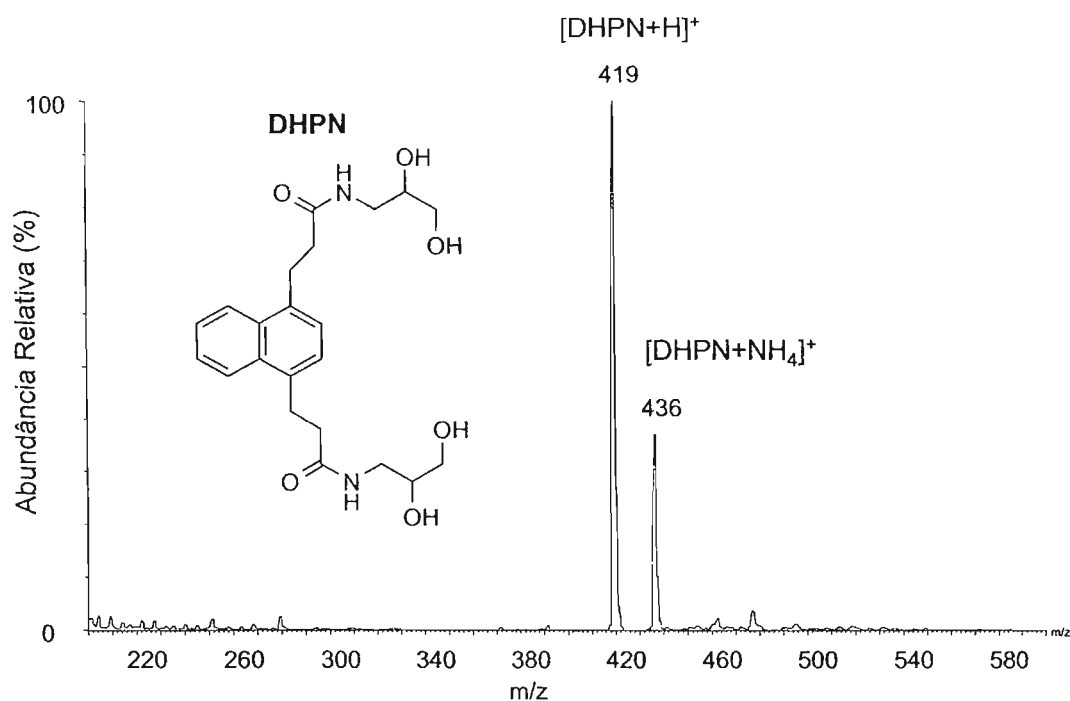


Figura VI.4 Espectro de massas do DHPN obtido no modo ESI⁺.

Anexo VII

8-Bromo-2'-desoxiguanosina

Como pode ser observado no cromatograma da figura VI.1A, no sólido obtido pela filtração havia praticamente o produto esperado (8-BrdGuo) e o material de partida (dGuo), sendo assim esse material foi usado na próxima etapa sem prévia purificação. Na figura VI.1B observa-se as diferenças nos espectros de UV da dGuo e da 8-BrdGuo. O espectro de massas (Figura VI.1D) foi obtido para as regiões mostradas no cromatograma da figura VI.1C e mostra a presença de dois picos referentes aos diferentes isótopos ^{79}Br e ^{81}Br incorporados na molécula, cuja abundância natural é aproximadamente 50% de cada um, e o mesmo se observa para os fragmentos resultantes da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda do açúcar.

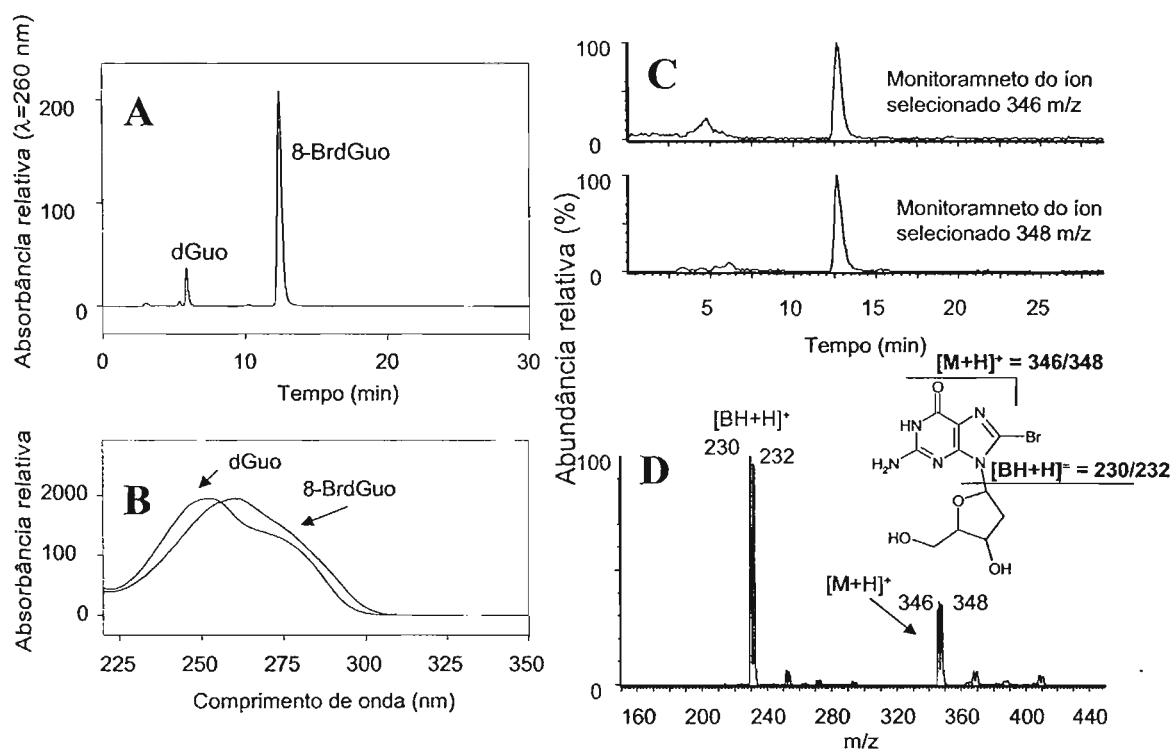


Figura VII.1 (A) Cromatograma para amostra do sólido obtido na síntese da 8-BrdGuo. **(B)** Espectros de UV obtidos para os picos indicados no cromatograma. **(C)** Cromatograma obtido selecionando o íon com $m/z=348$ e 346 (8-BrdGuo) para análise no modo ESI+/MS. **(D)** Espectro de massas no modo ESI+/MS referente a 8-BrdGuo.

Anexo VIII

8-Metoxi-2'-desoxiguanosina

Como pode ser observado no cromatograma da figura VIII.1A, no sólido obtido pela filtração havia praticamente o produto esperado (8-MeOdGuo) e pequenas quantidades dos materiais inicialmente presentes na reação (dGuo e 8-BrdGuo). Na figura VIII.1B observa-se as diferenças nos espectros de UV da dGuo, 8-BrdGuo e 8-MeOdGuo. O espectro de massas (Figura VIII.1C) mostra um sinal em $m/z = 298$ referente à molécula protonada e o respectivo fragmento em $m/z = 182$ referente à perda do açúcar pela quebra da ligação *N*-glicosídica no processo de ionização.

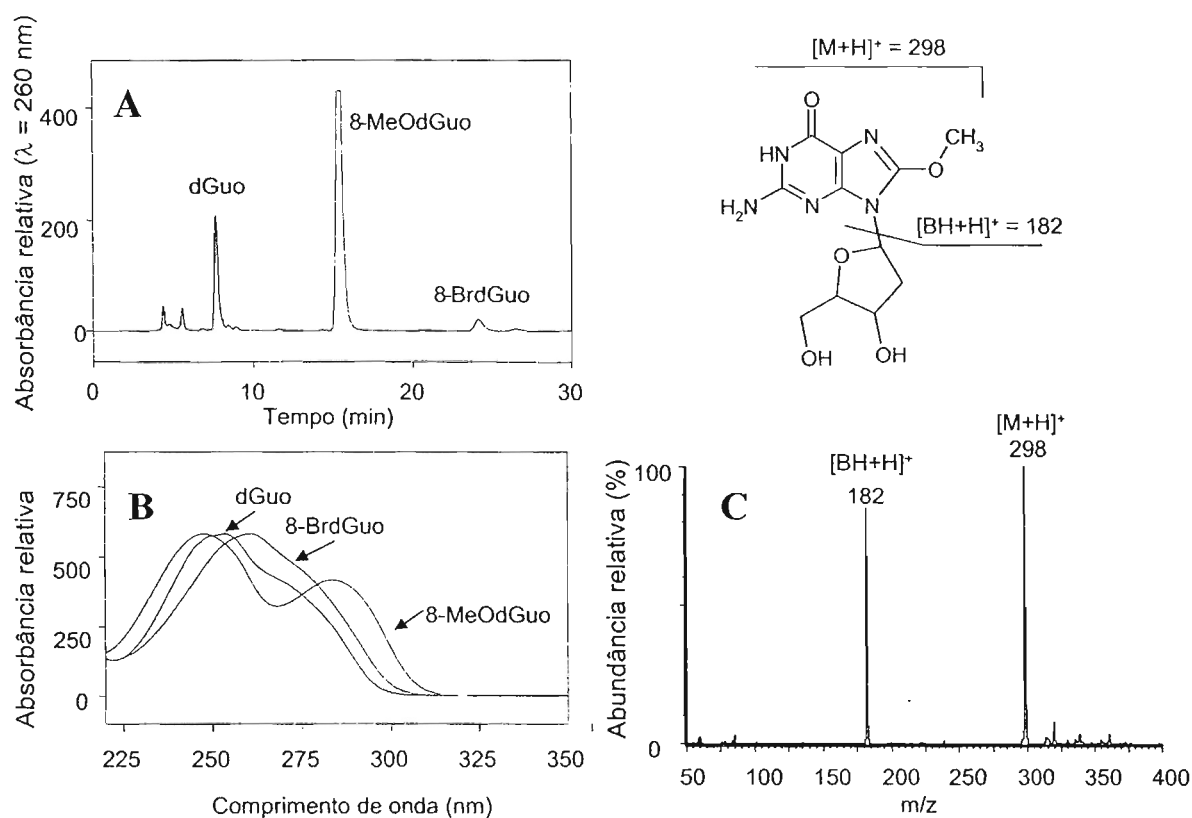


Figura VIII.1 (A) Cromatograma obtido para amostra do produto resultante da síntese da 8-MeOdGuo (B) Espectro de UV referente aos picos indicados no cromatograma. (C) Espectro de massas no modo ESI⁺ referente a 8-MeOdGuo.

O espectro de RMN de próton em DMSO-d₆ (2,6 ppm) apresenta os seguintes sinais: δ (ppm) 6,45 (s, 2H, 2-NH₂), 6,16 (t, 1H, J=6,5 Hz, 1'-H), 5,28 (d, 1H, J=4,2 Hz, 3'-OH), 4,97 (t, 1H, J=5,6 Hz, 5'-OH), 4,4 (m, 1H, 3'-H), 4,1 (s, 3H, -OCH₃), 3,84(m, 1H, 4'-H), 3,55 (m, 2H, 5'-Ha e Hb), 2,95 (m, 1H, 2'-Ha), 2,1 (m, 1H, 2'-Hb).

Anexo IX

***N*²-isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina**

Como pode ser observado no cromatograma da figura IX.1, no sólido obtido havia praticamente o produto esperado (*N*²-ibu-8-MeO-dGuo). E no espectro de UV (Figura IX.2) se observa um deslocamento do espectro para comprimento de onda maior.

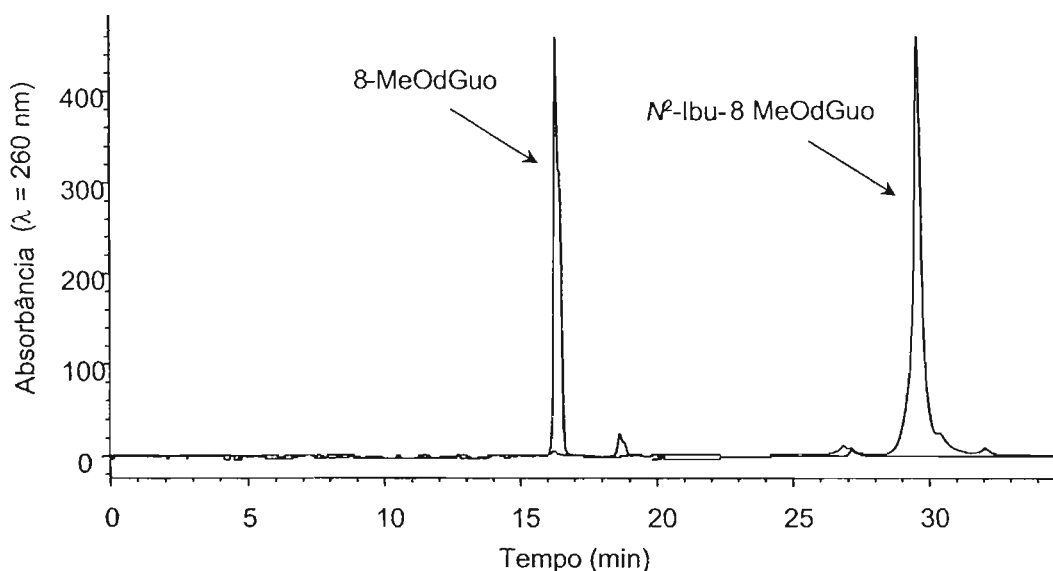


Figura IX.1 Cromatogramas obtidos para amostra do produto obtido na síntese da *N*²-ibu-8-MeOdGuo com detecção por espectrofotometria no UV a 260 nm e comparação com o tempo de retenção do material de partida.

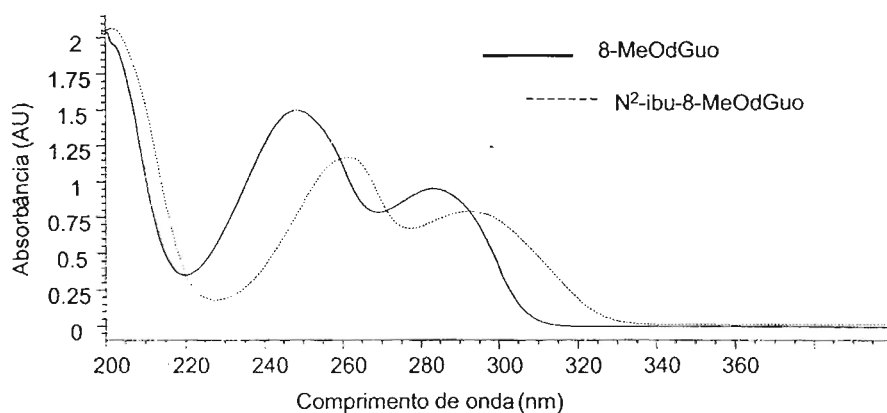


Figura IX.2 Espectro UV obtido para 8-MeOdGuo e *N*²-ibu-8-MeOdGuo.

O espectro de massas no modo ESI+ com analisador por captura de íons (Figura IX.3A) mostra a presença do sinal referente ao íon molecular $[M+H]^+$ em $m/z = 368$ e o fragmento resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda do açúcar $[BH+H]^+$ em $m/z = 252$. O espectro de massas no modo ESI- com analisador por captura de íons (Figura IX.3B) mostra a presença do sinal referente ao íon molecular em $[M-H]^-$ $m/z = 366$, o fragmento em $m/z = 351$ resultante da quebra da ligação éter do grupo metoxi e o fragmento em $m/z = 296$ resultante da quebra da ligação amida do grupo isobutilil.

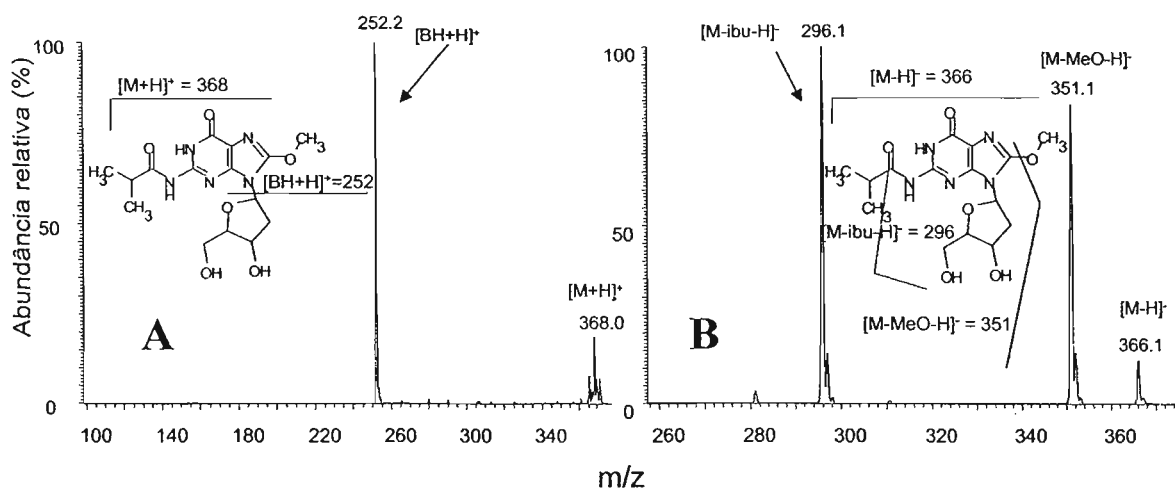


Figura IX.3 (A) Espectro de massas obtido no modo ESI+ com fragmentação do íon selecionado no MS1. **(B)** Espectro de massas obtido no modo ESI- com fragmentação do íon selecionado no MS1.

O espectro de RMN de próton em DMSO- d_6 (2,6 ppm) apresenta os seguintes sinais: δ (ppm) 9,66 (s, 1H, 1-NH), 9,15 (s, 1H, 2-NH), 6,25 (t, 1H, J=6,7 Hz, 1'-H), 5,32 (d, 1H, J=4,5 Hz, 3'-OH), 4,84 (t, 1H, J=5,5 Hz, 5'-OH), 4,43 (m, 1H, 3'-H), 4,12 (s, 3H, -OCH₃), 3,84(dt, 1H, 4'-H), 3,55 (m, 2H, 5'-Ha e Hb), 3,17 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2,95 (m, 1H, 2'-Ha), 2,1 (m, 1H, 2'-Hb), 1,25 (d, 6H, J=6,6Hz. C(CH₃)₂).

Anexo X

5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-N²-isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina

No cromatograma da fração obtida após purificação na coluna de sílica (Figura X.1) havia praticamente o produto esperado (5'-DMTr-N²-ibu-8-MeOdGuo). E o espectro de UV (Figura X.2) deixa de apresentar as bandas de absorção bem definidas em função da presença do grupo tritila.

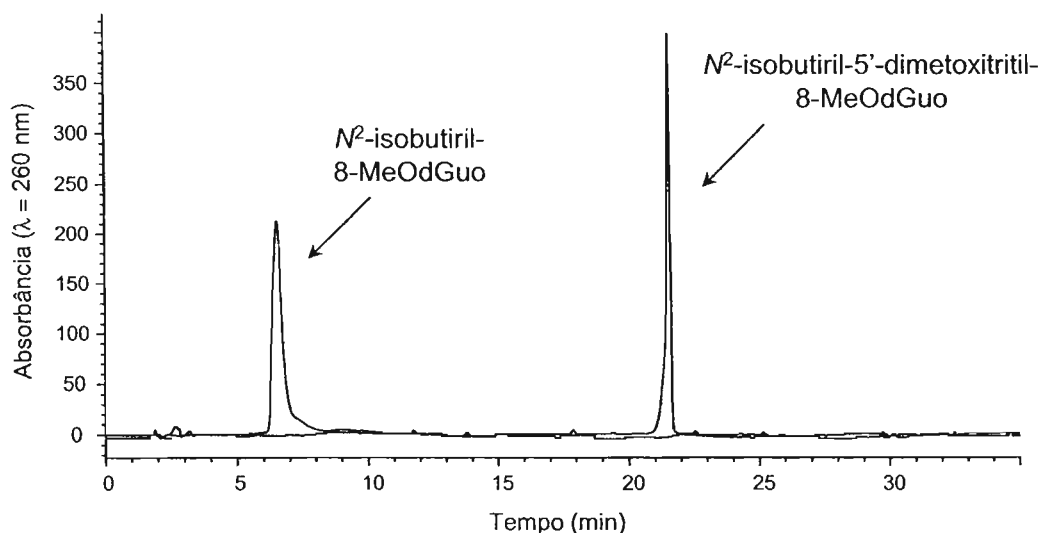


Figura X.1 Cromatogramas obtidos para amostra da fração purificada em coluna de sílica da síntese da 5'-DMTr-N²-ibu-8-MeOdGuo com detecção por espectrofotometria no UV a 260 nm e comparação com o tempo de retenção do material de partida.

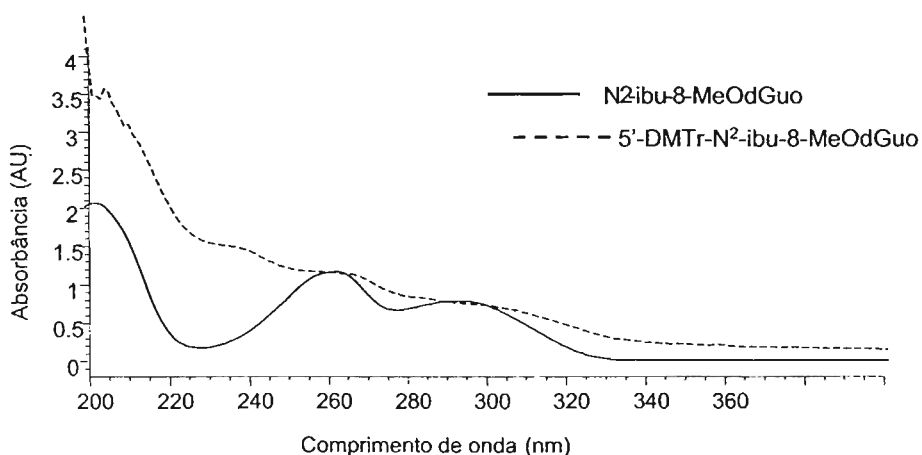


Figura X.2 Espectro UV obtido para N²-ibu-8-MeOdGuo e 5'-DMTr-N²-ibu-8-MeOdGuo.

O espectro de massas no modo ESI+ com analisador por captura de íons (Figura X.3A) mostra a presença do sinal referente à molécula com íon sódio $[M+Na]^+$ em $m/z = 692$ e o fragmento resultante da perda do grupo tritila $[M+Na-DMTr]^+$ em $m/z = 388$ e o grupo tritila $[DMTr]^+$ em $m/z = 303$. O espectro de massas no modo ESI- com analisador por captura de íons (Figura X.3B) mostra a presença do sinal referente ao íon molecular $[M-H]^-$ em $m/z = 668$, a molécula com íon cloreto $[M+Cl]^-$ em $m/z = 704$ e o fragmento resultante da perda do grupo tritila $[M-DMTr]^-$ em $m/z = 366$.

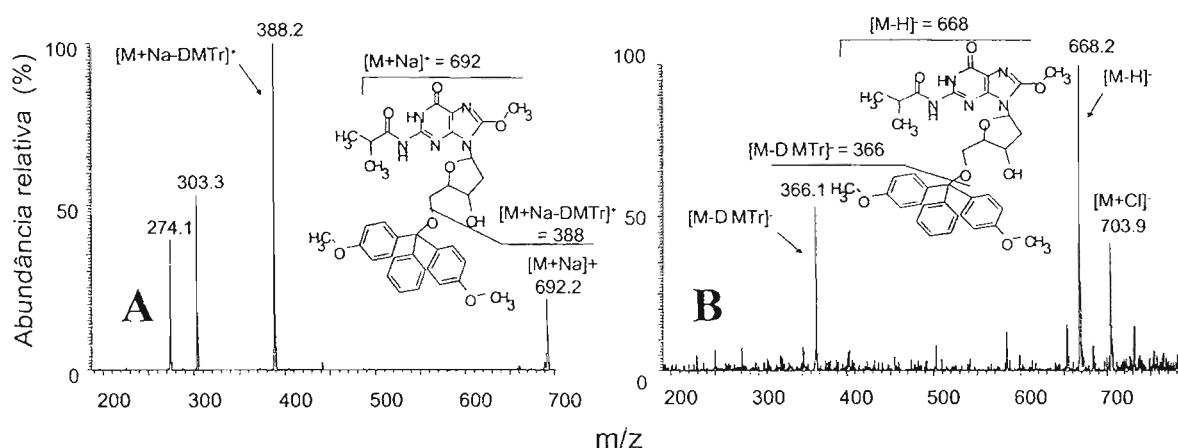


Figura X.1 (A) Espectro de massas obtido no modo ESI+ com fragmentação do íon selecionado no MS1. **(B)** Espectro de massas obtido no modo ESI- com fragmentação do íon selecionado no MS1.

O espectro de RMN de próton em DMSO- d_6 (2,6 ppm) apresenta os seguintes sinais: δ (ppm) 7,41-6,84 (m, 13H, aromáticos do grupo tritila), 9,15 (s, 1H, 2-NH), 6,3 (t, 1H, $J=6,7$ Hz, 1'-H), 5,32 (d, 1H, $J=4,5$ Hz, 3'-OH), 4,48 (m, 1H, 3'-H), 4,08(dt, 1H, 4'-H), 3,96 (s, 3H, $-OCH_3$), 3,81 (s, 6H, OCH_3 do grupo tritila), 3,27 (m, 2H, 5'-Ha e Hb), 3,15 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2,82 (m, 1H, 2'-Ha), 2,1 (m, 1H, 2'-Hb), 1,25 (d, 6H, $J=6,7$ Hz. $C(CH_3)_2$).

Anexo XI

3'-O-[(2-cianoetoxi)(diisopropilamino)fosfino]-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-N²-isobutiril-8-metoxi-2'-desoxiguanosina

Observa-se no espectro de massas da figura XI.1, a presença majoritária do sinal em $m/z = 892$ referente à molécula com íon sódio e o sinal em $m/z = 908$ referente à molécula com íon potássio.

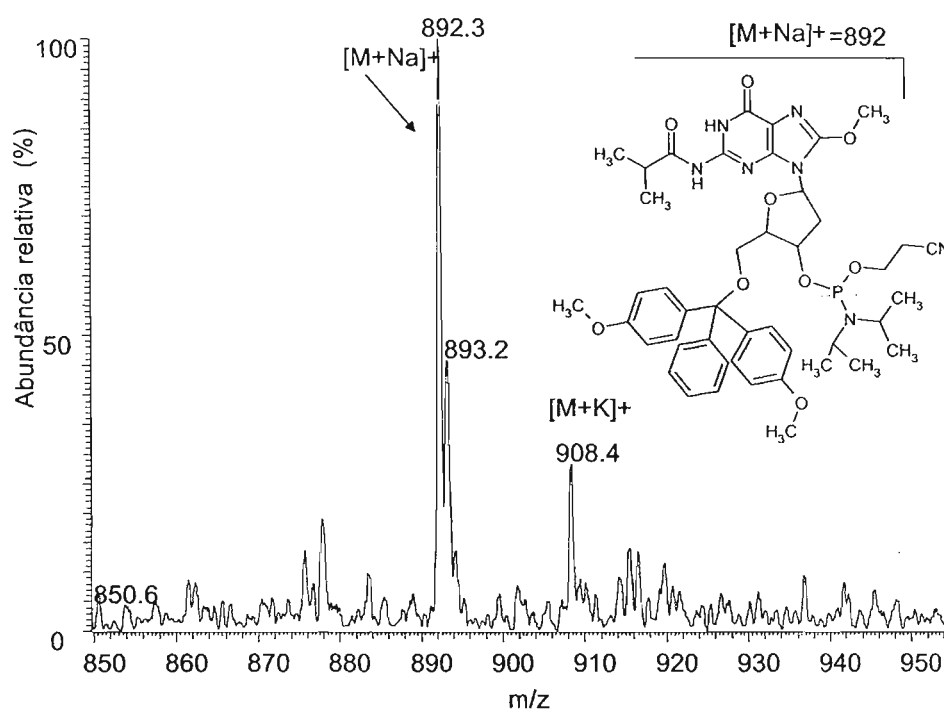


Figura XI.1 Espectro de massas obtido para o sinton da 8-MeOdGuo no modo ESI⁺ no analisador por captura de íons.