BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
20430
Universidade de São Paulo

Keo 19/08/03 D

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MECANISMOS DE REAÇÃO
QUIMILUMINESCENTE ENTRE PEROXINITRITO
E METABÓLITOS CARBONÍLICOS**

Leandro de Oliveira Royer

Dissertação de Mestrado

PROF. DR. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
ORIENTADOR

SÃO PAULO
05 de Agosto de 2003

***“Mecanismos de reação
quimiluminescente entre peroxinitrito
e metabólitos carbonílicos”***

LEANDRO DE OLIVEIRA ROYER

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. ETELVINO JOSÉ HENRIQUES BECHARA
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. PAULO DI MASCIO
IQ – USP

Prof. Dr. MARCELO GANZAROLLI DE OLIVEIRA
IQ – UNICAMP

SÃO PAULO
05 DE AGOSTO 2003.

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

R891m Royer, Leandro de Oliveira
Mecanismos de reação quimiluminescente entre peroxinitrito
e metabólitos carbonílicos / Leandro de Oliveira Royer. --
São Paulo, 2003.
83p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Bechara, Etelvino José Henriques

1. Oxidação biológica 2. Radical livre : Bioquímica teórica
3. Quimiluminescência : Biofísica I. T. II. Bechara, Etelvino
José Henriques, orientador.

574.19258 CDD

Agradecimento

Agradeço ao Prof. Etelvino Bechara pela sólida orientação e imensa compreensão.

Agradeço ao Prof. Hugo Monteiro, Prof. José Riveros, Prof. Francisco Laurindo, Prof. Ana Campa e Prof. Heraldo de Souza pela ajuda e apoio.

Agradeço à Dra. Fernanda Knudsen pela amizade e orientação.

Agradeço à Dóris, ao Moacir e aos colegas de laboratório, bem como, aos amigos do Ciências Moleculares pela amizade.

Por fim, agradeço a minha família pelo apoio incondicional.

Resumo

O peroxinitrito é um oxidante versátil, sendo responsável por oxidações uni e bieletrônicas, adições nucleofílicas, nitrações, nitroações, hidroxilações e geração de oxigênio singlete, possuindo papéis fisiológicos e deletérios. Estudos de EPR captação de spin mostraram que compostos carbonílicos podem sofrer abstração de um elétron por peroxinitrito, seguida de consumo de oxigênio e quimiluminescência; p.ex., isobutiraldeído (IBAL), acetoacetona (AA), 3-metilacetoacetona (MAA), etil acetoacetato (EAA), etil 2-metilacetoacetato (EMAA) e succinilacetona (SA). A emissão de luz é provavelmente devida à espécies excitadas tripletes, formadas a partir da termólise de intermediários dioxetânicos. Os perfis de pH obtidos por consumo total de oxigênio e quimiluminescência em tampão fosfato, apontam o ânion peroxinitrito como oxidante e a forma enólica dos compostos carbonílicos como substratos. A análise de produtos sugere a ocorrência de uma reação em cadeia na presença de oxigênio. Estas reações podem ter importante papel biológico, considerando-se que (i) compostos carbonílicos são ubíquos em sistemas biológicos em condições fisiológicas e patológicas, (ii) peroxinitrito está relacionado a respostas fisiológicas e patológicas, (iii) carbonilas tripletes podem ser vistas como radicais alcóxil e, dessa forma, possuir papel deletério a biomoléculas.

Abstract

Peroxynitrite displays an ample repertoire of chemical reactions – one- and two-electron oxidations, nucleophilic addition, nitration, nitrosation, hydroxylation, and singlet oxygen generation – conferring it cell toxicity and signalling properties. Carbonyl compounds were shown by EPR spin-trapping to suffer one-electron abstraction by peroxynitrite, which is followed by oxygen consumption and chemiluminescence; e.g., isobutyraldehyde (IBAL), acetoacetone (AA), 3-methylacetoacetone (MAA), ethyl acetoacetate (EAA), ethyl 2-methylacetoacetate (EMAA) and succinylacetone (SA). Light emission probably arises from triplet species formed by the thermolysis of dioxetane intermediates. The pH profiles traced for oxygen uptake and chemiluminescence in phosphate buffer point to peroxynitrite anion as the oxidant and enolized carbonyls as the actual substrates. Product analysis suggests that a chain reaction occurs in the presence of oxygen. These reactions may play important biological roles considering that (i) carbonyl compounds are ubiquitous in biological systems under physiological and pathological conditions; (ii) peroxynitrite has been implicated in cell toxicity and signalling; (iii) triplet carbonyls may be viewed as alkoxyl radicals and, therefore, play a deleterious role in biomolecules.

Abreviaturas

2-P	2-Pentanona
AA	Acetoacetona
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
DBAS	9,10-Dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio
DBNBS	Ácido 3,5-Dibromo-4-nitrosobenzenosulfônico
DOVA	Ácido 4,5-dioxovalérico
DPAA	Difenilacetaldeído
DPAS	9,10-Difenilantraceno-2-sulfonato de sódio
EAA	Acetoacetato de etila
EMAA	2-Metilacetoacetato de etila
HRP	Peroxidase de raiz forte ("horseradish peroxidase")
HOMO	Orbital molecular ocupado mais alto ("Highest occupied molecular orbital")
IBAL	Isobutiraldeído
LUMO	Orbital molecular não ocupado mais baixo ("Lowest unoccupied molecular orbital")
MAA	3-Metilacetoacetona
MBK	2-Hexanona
MNP	2-Metil-2-nitrosopropano
NP	<i>neo</i> -Pentanal
PAA	Fenilacetaldeído
SA	Succinilacetona

Índice

1. Introdução	7
1.1 Compostos Carbonílicos em Sistemas Biológicos.....	7
1.1.1 Aldeídos	7
1.1.2 β -Cetoácidos	9
1.1.3 Cetonas.....	10
1.1.4 β -Dicetonas.....	11
1.2 Espécies Tripletas.....	13
1.2.1 Relevância Biológica.....	13
1.2.2 Geração de Espécies Tripletas	16
1.3 Peroxinitrito.....	18
1.3.1 Formação e Difusão	20
1.3.2 Reatividade.....	20
1.3.3 Peroxinitrito e Adição Nucleofílica.....	23
2. Justificativas e Objetivos.....	25
3. Materiais e Métodos	27
3.1 Reagentes	27
3.2 Preparo de Reagentes	27
3.3 Sínteses	28
3.3.1 Síntese de Peroxinitrito	28
3.3.2 Síntese de DBNBS	29
3.4 Métodos	29
3.4.1 Medidas de Emissão de Luz.....	29
3.4.2 Medidas de Consumo de Oxigênio.....	29
3.4.3 Medidas Espectrofotométricas	30
3.4.5 EPR-Captação de Spin	30
3.4.6 Análise de Produtos	30
3.4.6.1 Medidas de Eletroforese Capilar	30
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1 Aldeídos e β -Dicetonas.....	33
4.1.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência	33
4.1.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica	36
4.1.3 Análise de Produtos	43
4.2 β -Cetoésteres	48
4.2.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência	48
4.2.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica	55
4.2.3 Análise de Produtos	60
4.3 Succinilacetona	62
4.3.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência	62
4.3.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica	67
4.3.3 Análise de Produtos	68
5. Conclusões.....	72
6. Referências Bibliográficas	76

1. Introdução

1.1 Compostos Carbonílicos em Sistemas Biológicos

Compostos carbonílicos são ubíquos em sistemas biológicos, presentes como intermediários bioquímicos necessários para a manutenção da homeostase. Em condições patológicas, processos como a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, açúcares e aminoácidos (1) levam ao aumento da concentração desses compostos e também de produtos de sua adição a proteínas e DNA (2).

Crescentes evidências relacionam o acúmulo desses compostos e de seus adutos com o envelhecimento (3) e patologias como diabetes e doença de Alzheimer (4). O estresse oxidativo gerado por esses compostos, denominado "carbonyl stress", se atribui à sua oxidação, com formação de intermediários reativos como radicais livres (5) e espécies excitadas (6,7) que supostamente desempenham papel deletério em sistemas biológicos.

Algumas classes de compostos carbonílicos de relevância biológica são discutidas a seguir.

1.1.1 Aldeídos

Os aldeídos são compostos carbonílicos presentes universalmente em sistemas biológicos, alguns atuando como vitais

intermediários, como o gliceraldeído-3-fosfato, o piridoxal-5-fosfato e o retinal.

Outra fonte endógena importante de aldeídos é o processo de lipoperoxidação, que tem esses compostos como produtos secundários da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (8). Os principais aldeídos reativos formados nesse processo são o malonaldeído, 4-hidróxinonenal e 4-hidróxihexenal. Diversos efeitos biológicos têm sido atribuídos a esses compostos, incluindo o distúrbio da homeostase de cálcio em hepatócitos, a inibição da formação de microtúbulos, a inibição da síntese proteica e formação de adutos com proteínas e DNA (9).

Alguns aldeídos alifáticos de cadeia curta também possuem relevância biológica. O acetaldeído é gerado endogenamente através do metabolismo do etanol. Em ratos, a administração prolongada desse composto aumentou o número de tumores e apresentou efeitos carcinogênicos específicos em vários órgãos e tecidos (10). Efeito análogo foi demonstrado para o formaldeído. Este último, juntamente com o acetaldeído, é capaz de reagir com deoxiguanosina e DNA formando adutos (11). De fato, esses adutos foram detectados em células HL-60 tratadas com acetaldeído por 24 h (12). A formação de adutos de acetaldeído com proteínas também foi descrita (13) e detectada em cérebros de ratos tratados cronicamente com etanol (14). Nakao *et al.* demonstraram que o acetaldeído também pode ser oxidado por reagentes como peróxido de hidrogênio/Fe(II) e

peroxinitrito, produzindo intermediários reativos como o radical metila (15).

Os α -oxoaldeídos constituem outra importante classe de aldeídos gerados endogenamente com alta reatividade. Entre eles destaca-se o metilglioxal, formado durante o catabolismo da acetona e de aminoácidos como a treonina e glicina. Acumula-se em patologias como o diabetes e acredita-se que sua toxicidade esteja relacionada à reatividade que possui diante de proteínas e ácidos nucleicos (16).

O ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA) é um α -oxoaldeído, produto final da oxidação do ácido 5-aminolevulínico (ALA), um intermediário da biossíntese do grupo heme. Acumula-se principalmente no cérebro e fígado em porfirias hepáticas tais como a porfiria aguda intermitente, tirosinose e plumbismo . Di Mascio *et al.* demonstraram que DOVA é um eficiente agente alquilante de guanina (17), tanto em nucleosídeos quanto em DNA isolado, e também induz a quebra do plasmídeo pBR322 (18).

1.1.2 β -Cetoácidos

O acetoacetato é o principal β -cetoácido presente endogenamente em seres humanos, sendo um dos corpos cetônicos e uma das principais fontes de energia em músculo cardíaco e córtex renal. Forma-se principalmente a partir de acetil-CoA, mas também a partir da degradação de fenilalanina, leucina e tirosina.

Recentemente, Jain *et al.* estudaram a susceptibilidade à oxidação por Cu^{2+} de LDL e VLDL isoladas de plasma de pacientes diabéticos (19). Apenas as lipoproteínas isoladas de pacientes hipercetonúricos foram mais susceptíveis à oxidação (80% em relação a pacientes não diabéticos). Essa susceptibilidade apresentou boa correlação com os níveis plasmáticos de acetoacetato.

Em outro estudo, a adição de acetoacetato a células endoteliais em cultura resultou na inibição do crescimento dessas células e no aumento da lipoperoxidação (20). Entretanto, o mecanismo responsável por esses danos não foi identificado.

Outro β -cetoácido de interesse biológico é o 2-metilacetoacetato. Esse composto acumula-se em desordens do catabolismo da isoleucina onde há deficiência da enzima 2-metilacetoacetyl-CoA tiolase (21). Os indivíduos afetados apresentam crises agudas de acidose e aumento da excreção de 2-metilacetoacetato (22). As bases moleculares dos sintomas não são conhecidas.

1.1.3 Cetonas

A toxicidade de cetonas em humanos está relacionada principalmente com a exposição de trabalhadores industriais a esses compostos, usados geralmente como solventes. Os efeitos tóxicos da 2-hexanona (MBK) foram bastante estudados após a contaminação de vários trabalhadores indianos em 1973, que apresentaram um

quadro de neuropatia periférica (23). Após a exposição, a MBK também é encontrada no fígado e sangue, bem como em tecidos fetais. Estudos em leveduras demonstraram que esse composto induz a perda de cromossomos (24).

A butanona também induz a perda de cromossomos em leveduras (24) e a sua ação sinérgica com *n*-hexano foi apontada como a responsável pela toxicidade dos solventes utilizados por usuários viciados alemães (25). Esse efeito sinérgico também foi verificado na sua administração conjunta com a 2,5-hexanodiona (25), dicetona amplamente estudada pela sua potente neurotoxicidade.

Outras monocetonas, como a 3-heptanona, também são tóxicas e capazes de potenciar os efeitos de γ -dicetonas neurotóxicas (2,5-hexanodiona e 2,5-heptanodiona) (26). Apesar da conhecida toxicidade dessas cetonas, pouco sobre os seus mecanismos de ação foi descrito.

1.1.4 β -Dicetonas

As β -dicetonas foram pela primeira vez identificadas em tecidos e urina de humanos e animais em 1977. Os compostos isolados por Douglas et al. são 2,4-dicetonas homólogas, com cadeias entre 13 e 25 carbonos, constituindo uma classe de lipídios especial (27). Possuem propriedades antialérgicas e quelantes e, embora sejam ubíquos, as suas funções fisiológicas ainda não são conhecidas (28).

Estudos recentes sugerem que esses compostos também estão presentes nos inibidores de crescimento de tumores descritos por Szent-Gyorgy (29).

Exogenamente, as β -dicetonas podem ser encontradas em antioxidantes derivados de gengibre. Esses compostos são capazes de inibir a lipoperoxidação induzida por ferro em homogenatos de cérebro de rato, em um mecanismo envolvendo o grupo metileno existente entre as duas carbonilas (30). Resultados análogos foram descritos para a curcumina e tetrahidrocurcumina, compostos com propriedades antiinflamatórias e anticarcinogênicas (31,32). Além do grupo dicetônico esses compostos apresentam grupos fenólicos. Entretanto, parte das propriedades antioxidantes tem sido atribuída ao grupo β -dicetônico (33).

A succinilacetona (SA) é uma β -dicetona, metabólito da degradação oxidativa da tirosina, que se acumula nas tirosinemias, patologias caracterizadas por danos renais, hepáticos e neurológicos (34). Parte desses danos foi relacionada à formação de adutos entre a SA e aminoácidos, glutathiona reduzida e proteínas (35,36). Também atua como potente inibidor da DNA ligase (37) e da 5-aminolevulínico desidratase (34), esta última inibição gerando o acúmulo de ALA, um agente pró-oxidante (38).

1.2 Espécies Tripletes

1.2.1 Relevância Biológica

As moléculas orgânicas em seu estado fundamental apresentam todos os seus elétrons pareados. Quando há a promoção de um desses elétrons a um orbital desocupado de maior energia, forma-se um estado excitado. Dois estados excitados podem ser formados: i) os spins dos elétrons solitários são mantidos (estado singlete); ii) o spin do elétron promovido inverte-se (estado triplete). Ambos os estados diferem física e quimicamente do estado fundamental e também possuem caráter "biradicalar", uma vez que apresentam orbitais moleculares com apenas um elétron (Figura 1).

Figura 1. Configurações eletrônicas dos estados fundamental, singlete e triplete.

Os estados tripletes possuem maior vida-média ($> 10^{-8}$ s) em relação aos respectivos estados singletes, pois a transição para o estado fundamental (singlete) é proibida pelas regras de seleção de spin. Essa maior vida-média permite a participação dessas espécies

excitadas em eventos bimoleculares como reações químicas ou processos físicos (39) (Figura 2).

Entre os processos físicos de desativação dessas espécies estão a desativação não-radiativa, a fosforescência e a transferência da energia de excitação a um aceptor (40).

As reações químicas possíveis das espécies tripletes incluem: isomerização *cis-trans*, cicloadição a duplas ligações, rearranjos, abstração de hidrogênio, oxidação e clivagens Norrish tipo I e II (40).

Figura 2. Processos físicos e químicos de desativação de espécies tripletes.

Vários estudos evidenciaram a formação de espécies tripletes em sistemas biológicos bem como danos causados a biomoléculas por estas espécies. Adam *et al.* relataram danos em DNA tratado com dioxetanos, compostos geradores de espécies tripletes (41). Esses dioxetanos também induziram a quebra de DNA em fibroblastos e

células HL-60 (42). Resultado semelhante foi observado em bactérias.

A lipoperoxidação é outro processo deletério importante que pode ser iniciado por espécies tripletes. Em neutrófilos expostos a fenilacetaldeído (PAA), a lipoperoxidação observada foi associada à geração de benzaldeído triplete gerado pela oxidação de PAA por mieloperoxidase (43). Em mitocôndrias isoladas, a lipoperoxidação também foi associada a espécies tripletes, uma vez que foi fortemente inibida por sorbato (44), composto supressor de carbonilas tripletes. Usando outras fontes de espécies tripletes (dioxetanos e excitação óptica), Indig *et al.* demonstraram a formação de dienos conjugados a partir do ácido araquidônico (45).

Nantes *et al.* verificaram que a oxidação quimiluminescente de difenilacetaldeído (DPAA) à benzofenona triplete por mitocôndrias é promovida por citocromos e está relacionada com o colapso do potencial transmembrânico e com o inchaço mitocondrial observados (46). Recentemente, também se demonstrou que espécies excitadas geradas a partir de DPAA promovem danos oxidativos a fosfolipídios, proteínas e mtDNA isolados de mitocôndrias de fígado de rato (47).

1.2.2 Geração de Espécies Tripletes

Diferentes reações têm como produtos compostos carbonílicos tripletes. Uma dessas reações é a oxidação de "ene" hidroperóxidos por peroxidases ou peroxinitrito (48), produzindo intermediários dioxetânicos, cuja clivagem produz compostos carbonílicos no estado triplete.

O desproporcionamento de radicais alquilperoxil formados em cadeias de lipoperoxidação também produz compostos carbonílicos tripletes (49). Entretanto, o rendimento dessa reação é muito baixo ($< 0,01\%$) (50). Outra via foi identificada por De La Fuente e Lissi e consiste na dismutação de radicais alcóxil formados pela redução unieletrônica de alquilhidroperóxidos (6), gerando compostos carbonílicos tripletes com 10% de rendimento.

Por fim, a oxidação aeróbica de compostos carbonílicos catalisada por hemoproteínas também pode produzir compostos carbonílicos tripletes através da formação de intermediários dioxetânicos cuja clivagem produz aquelas espécies em alto rendimento (10-60%) (39,51).

Essa última via foi amplamente estudada por Cilento, Adam e Bechara, utilizando diferentes substratos (p.ex., DPAA, aldeídos lineares, malonaldeído e indóis) e catalisadores (HRP, mioglobina, citocromo c, mieloperoxidase, lipoxigenase e prostaglandina-H sintase) (51). A Figura 3 apresenta o mecanismo proposto para o caso do isobutiraldeído (IBAL). A reação é iniciada pela abstração do

hidrogênio enólico do substrato, formando o radical I. Por sua vez, esse radical reage com o oxigênio molecular, gerando um radical peroxil (II). Esse radical é convertido a um α -hidroperóxido pela abstração de um átomo de hidrogênio de outra molécula de substrato ou da própria enzima. A ciclização desse hidroperóxido forma o intermediário dioxetânico (III), que se cliva produzindo compostos carbonílicos, sendo um deles triplete. Mecanismo semelhante foi proposto por Becker *et al.* para a oxidação de *n*-butiraldeído e *iso*-butiraldeído por Cu(II) (52).

A reação depende fortemente da concentração de enol presente. Assim, compostos facilmente enolizáveis, como β -dicetonas, reagem rapidamente (53). Para compostos menos enolizáveis, a presença de tampão fosfato é importante, uma vez que catalisa o tautomerismo ceto-enólico (54).

Figura 3. Mecanismo de geração de espécies triplete pela oxidação de compostos carbonílicos por peroxidases.

A presença de grupos alquil na posição α à carbonila também determina a reatividade do substrato perante os catalisadores citados, pois diminui o potencial de oxidação desses compostos (55). Esse efeito pode ser verificado, por exemplo, nos compostos 2,4-pentanodiona ($E=2,53$ V) e 3-metil-2,4-pentanodiona ($E=1,99$ V) (55).

Também é interessante notar que essa via de reação, além de gerar intermediários radicalares e espécies excitadas, pode ter como produtos compostos carbonílicos potencialmente citotóxicos (p.ex., metilglioxal) (16) e genotóxicos (p.ex., DOVA) (17,18).

1.3 Peroxinitrito

O ânion peroxinitrito é formado em sistemas biológicos a partir da reação entre o ânion radical superóxido e o óxido nítrico, atuando como importante mediador da reatividade e toxicidade desses radicais (56). Oxidante potente e versátil, ele é capaz de reagir com todas as principais classes de biomoléculas, incluindo: i) antioxidantes como ascorbato (57), glutathione (58), α -tocoferol (59) e ácido úrico (60); ii) carboidratos (61); iii) lipídios (62); iv) ácidos nucleicos (63); v) proteínas como mieloperoxidase, HRP, álcool desidrogenase, aconitase, hemoglobina e citocromo c (64). Também atua como agente nitrante de compostos fenólicos (65) e de resíduos

de tirosina e triptofano. Além disso, age na nitrosilação de resíduos tiólicos (66).

Várias evidências indicam a formação e participação de peroxinitrito em diversos processos fisiológicos e patológicos como defesa do hospedeiro (67), sinalização celular (75), oxidação de LDL (70) e apoptose (68). Em neutrófilos e macrófagos, a sua produção está relacionada com a defesa do hospedeiro. Nas respostas inflamatórias, o peroxinitrito pode estimular a resposta celular ao estresse.

O peroxinitrito também está envolvido na ativação de vias de sinalização celular (69). Em vários tipos celulares (células epiteliais, hepáticas, fibroblastos, células endoteliais, células de neuroblastoma e neutrófilos) é capaz de ativar proteínas da família MAP quinase (p38, JNK e ERK $\frac{1}{2}$). Além da ativação dessas vias de sinalização, o peroxinitrito também induz a expressão de genes de estresse como *c-fos* e heme oxigenase-1.

O peroxinitrito é um relevante mediador das modificações oxidativas em LDL (70). Tanto a fração lipídica quanto a proteica da LDL podem ser oxidadas e nitradas por peroxinitrito. O processo de oxidação envolve a oxidação da parte protéica, as reações de propagação da oxidação lipídica, a perda de antioxidantes e a formação de adutos entre proteínas e lipídios.

1.3.1 Formação e Difusão

Em sistemas biológicos o ânion peroxinitrito é formado principalmente a partir do óxido nítrico e do ânion radical superóxido, numa reação que possui constante de segunda ordem semelhante à constante de difusão (71).

O ânion peroxinitrito está em equilíbrio com a sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6,6$) (72). Assim, em condições biológicas, tanto o ânion peroxinitrito quanto o ácido peroxinitroso estão presentes, sendo a proporção entre eles dependente do pH local. É importante ressaltar que essas espécies possuem reatividade e propriedades difusionais diferentes.

Tanto o ânion peroxinitrito quanto o ácido peroxinitroso podem difundir-se através de membranas biológicas. O ácido peroxinitroso difunde-se passivamente através de bicamadas lipídicas. Já o ânion peroxinitrito atravessa a membrana por canais iônicos (73).

1.3.2 Reatividade

Os efeitos biológicos do peroxinitrito são promovidos por diferentes tipos de reação e espécies radicalares: oxidações diretas, nitração, nitrosação, dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e radical carbonato (74).

Peroxinitrito pode reagir diretamente com biomoléculas, promovendo oxidações mono e bieletrônicas que possuem constantes

de reação de segunda ordem entre 10^3 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ (73). Entre essas reações encontram-se as oxidações de hemoproteínas como citocromo c^{2+} , oxyhemoglobina e peroxidase (10^4 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$) e de tióis de baixo peso molecular (glutathiona e cisteína -10^3 $M^{-1}s^{-1}$).

O peroxinitrito é estável em pHs alcalinos, mas o ácido peroxinitroso sofre homólise ($k=0,17$ s^{-1} a 37 °C, pH 7,4), gerando o radical hidroxila ($\cdot OH$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) com um rendimento de 30%. O restante do ácido peroxinitroso isomeriza-se diretamente a nitrato (71). Processos como peroxidação lipídica e quebra de fitas de DNA têm sido atribuídos a esses radicais derivados de peroxinitrito. Também a oxidação e hidroxilação de resíduos de tirosina e a oxidação de grupos tiólicos de alto e baixo peso molecular estão parcialmente relacionadas a esses radicais (74).

Outra via de reação importante na reatividade de peroxinitrito é a nitração de resíduos de tirosina e triptofano, resíduos de guanina e de grupos alifáticos de ácidos graxos. Essas nitrações são catalisadas por metais de transição, metaloproteínas e dióxido de carbono. A nitração de resíduos de tirosina tem recebido especial atenção, uma vez que a presença desses resíduos nitrados foi detectada em proteínas (LDL, tirosina hidroxilase, MnSOD, glutamina sintetase e prostaciclina sintetase) isoladas de tecidos de pacientes (75). A detecção de 3-nitrotirosina é utilizada como evidência da geração de peroxinitrito em sistemas biológicos. A sua formação envolve

mecanismos radicalares, como a formação do radical tirosil, por radicais oriundos do peroxinitrito, e a sua recombinação com $\cdot\text{NO}_2$.

Estudos recentes sugerem que a nitrosação de resíduos tiólicos seja uma modificação pós-translacional ubíqua, reguladora da função proteica (76). De fato, como a fosforilação, é uma modificação reversível e específica, permitindo que a função protéica seja modulada em resposta a estímulos.

A nitrosação dependente de peroxinitrito possui baixo rendimento, mas pode ser relevante em determinadas condições. Kuo *et al.* descreveram a nitrosação de proteínas (BSA, DNase-I, ceruloplasmina, catalase e hemoglobina) tratadas com peroxinitrito (77). Resultado semelhante foi descrito por Viner *et al.* para a ATPase dependente de cálcio do retículo endoplasmático (78).

A reatividade do peroxinitrito em sistemas biológicos é amplamente modulada por dióxido de carbono, uma vez que este está presente em concentrações importantes (1-2 mM) em fluidos biológicos e reage rapidamente com peroxinitrito ($k_2=4,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37 °C). A reação entre CO_2 e peroxinitrito produz o aduto nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO_2^-), cuja homólise ($t_{1/2} < 1 \mu\text{s}$) forma duas importantes espécies reativas: o radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) e dióxido de nitrogênio com rendimento de 35% (71).

O ânion radical carbonato é um potente oxidante unieletrônico ($E^\circ=1,78 \text{ V}$ em pH 7.0) cujos mecanismos de reação envolvem, principalmente, transferências de elétrons e abstrações de hidrogênio

(71). Em sistemas biológicos, reage especialmente com glutathione, proteínas e ácidos nucleicos. Também é capaz de oxidar resíduos de tirosina, formando o radical tirosil, que rapidamente reage com $\cdot\text{NO}_2$, formando 3-nitrotirosina. Esse último mecanismo explica o efeito catalítico de CO_2 sobre a nitração de biomoléculas por peroxinitrito.

1.3.3 Peroxinitrito e Adição Nucleofílica

De modo análogo à reação com CO_2 , o peroxinitrito reage com compostos carbonílicos como aldeídos (79). O mecanismo descrito para a reação entre aldeídos e peroxinitrito envolve o ataque nucleofílico do ânion peroxinitrito à carbonila do aldeído, formando um aduto intermediário. A ligação O—O desse aduto pode sofrer cisão homolítica ou heterolítica e cerca de 70% dos radicais ou ions assim formados recombina-se, produzindo nitrato e o aldeído original. Embora em baixo rendimento, há importante formação de radicais, conforme demonstrado por Nakao *et al.* para o caso do acetaldeído, onde há a formação de radical metila (15).

O radical formado pela homólise da ligação O—O pode sofrer cisão β , gerando um ácido orgânico e um radical alquil que, por sua vez, pode reagir com oxigênio, produzindo um radical peroxil que é aniquilado através da reação de Russell. Mecanismo semelhante foi descrito por Vásquez-Vivar *et al.* para a reação entre peroxinitrito e piruvato, resultando na descarboxilação deste último e na produção do radical $\text{CO}_2^{\cdot-}$ (80). É interessante notar que, embora os

intermediários para o sistema aldeído/peroxinitrito ($k_2=344-680 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} - (15,79)$) sejam semelhantes aos observados na reação entre CO_2 e peroxinitrito ($k_2=4,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), os primeiros não são capazes de catalisar a nitração de compostos por peroxinitrito (79).

Já a reatividade entre cetonas e peroxinitrito é menor e varia significativamente (acetona – $k_2=4,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; biacetilo – $k_2=1,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (81). A formação de radicais é relativamente baixa, com apenas 10% do composto original gerando radicais (82).

2. Justificativas e Objetivos

A reação entre peroxinitrito e aldeídos alifáticos foi recentemente descrita por Nakao *et al.* (15) e Uppu *et al.* (79) para o acetaldeído e propanaldeído, respectivamente. A reação é iniciada pelo ataque nucleofílico do ânion peroxinitrito ao grupo carbonila do composto e tem como principais produtos nitrato e o próprio aldeído. Dessa forma, parte do aldeído presente age como catalisador da decomposição do peroxinitrito. Entretanto, também há a formação de outros produtos como ácidos orgânicos, H_2O_2 e radicais intermediários. Mecanismo semelhante foi descrito para a reação entre cetonas e peroxinitrito (81).

Nesse trabalho examinamos se o peroxinitrito, em competição com a adição nucleofílica a compostos carbonílicos enolizáveis, pode agir como oxidante unieletrônico da forma enólica desses compostos, iniciando uma reação aeróbica quimiluminescente semelhante às descritas para a oxidação desses compostos por HRP/ H_2O_2 (39). Os dois mecanismos estão exemplificados nas Figuras 3 (p. 17) e 4 (p. 26) para a oxidação de isobutiraldeído (IBAL).

A nossa hipótese é que compostos carbonílicos i) facilmente enolizáveis ou cuja enolização possa ser catalisada por fosfato, e que ii) possuam um substituinte alquil na posição alfa, e portanto, menor potencial de redução, reagem com peroxinitrito preferencialmente pela via dioxetânica.

Figura 4. Oxidação de compostos carbonílicos iniciada pela adição nucleofílica de peroxinitrito

O objetivo inicial é elucidar o mecanismo de reação com os substratos modelos acetoacetona, isobutiraldeído, 3-metilacetoacetona, *neo*-pentanal e 2-pentanona. Baseado nesses dados o estudo é ampliado à succinilacetona e aos ésteres do acetoacetato e do 2-metilacetoacetato, todos eles acumulados em erros do metabolismo humano.

Esquema 1. Estruturas moleculares dos compostos estudados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Ácido sórbico, ácido succínico, biacetilo, Chelex-100, nitrito de sódio, peroxidase tipo VI, succinilacetona e 2-metil-2-nitrosopropano foram fornecidos pela Sigma Chemical Co.. Acetoacetato de etila, acetoacetona, ácido 3,5-dibromosulfanílico, 3-metilacetoacetona, 2-metilacetoacetato de etila, isobutanal, *neo*-pentanal e 2-pentanona foram fornecidos pela Aldrich. Acetato de sódio, ácido clorídrico, bicarbonato de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de sódio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio foram fornecidos pela Merck.

Os reagentes 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) e 9,10-difenilantraceno-2-sulfonato de sódio (DPAS) foram gentilmente cedidos pelo professor Josef Wilhelm Baader e sintetizados conforme procedimento descrito por Catalani *et al.* (83).

3.2 Preparo de Reagentes

Todas as soluções foram preparadas em água deionizada (Millipore Milli-Q) e os tampões pré-tratados com Chelex[®].

As soluções aquosas de peroxidase foram preparadas pela dissolução da massa adequada de enzima em água e sua

concentração determinada espectrofotometricamente (HRP - $\epsilon_{403} = 1,02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (84)).

As concentrações das soluções de H_2O_2 , DBAS e DPAS foram determinadas espectrofotometricamente ($\epsilon_{240}(\text{H}_2\text{O}_2) = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (85).; $\epsilon_{405}(\text{DBAS}) = 7750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{397}(\text{DPAS}) = 8050 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (83)).

Peroxinitrito foi dosado espectrofotometricamente em NaOH 1 M ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo Hughes et al. (86).

As soluções de acetoacetona (AA), acetoacetato de etila (EAA), isobutanal (IBAL), 2-metilacetoacetato de etila (EMAA), 3-metilacetoacetona (MAA), *neo*-pentanal (NP) e 2-pentanona (2-P) foram preparadas a partir dos reagentes recém-destilados.

3.3 Sínteses

3.3.1 Síntese de Peroxinitrito

Inicialmente, com o auxílio de uma bomba peristáltica, reagiu-se NaNO_2 (0,6 M) com H_2O_2 em meio ácido (HCl 0,7 M) a 4 °C, formando o ácido peroxinitroso (87). Uma vez que o ácido formado é muito instável em meio ácido ($t_{1/2} < 1 \text{ s}$), adicionou-se à mistura de reação uma solução básica (NaOH 1,5 M). O excesso de peróxido foi removido adicionando-se dióxido de manganês à solução final sob agitação por 1h a 4 °C. A seguir, a solução foi transferida para frascos

Falcon e mantida a $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, o peroxinitrito foi retirado e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Síntese de DBNBS

Prepara-se uma solução 10 mM de ácido 3,5-dibromosulfanílico em ácido acético glacial contendo 10 mM de acetato de sódio e 70 mM de H_2O_2 . A solução é mantida a temperatura ambiente por 14 dias e, então, filtrada, e o sólido lavado com ácido acético e recristalizado de etanol (88).

3.4 Métodos

3.4.1 Medidas de Emissão de Luz

Os experimentos de quimiluminescência foram realizados em um contador de fótons Hamamatsu, modelo C-767, acoplado à uma fotomultiplicadora Thorn EMI (9658AM) mantida a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um refrigerador termoelétrico FACT50 (Thorn EMI Electron Tubes Inc). A aquisição foi realizada através do software MCS32 (Ortec). Também foram realizados experimentos em um luminômetro da Biorbit (modelo 1251).

3.4.2 Medidas de Consumo de Oxigênio

O consumo de oxigênio foi monitorado em um sistema polarográfico Yellow Spring Instruments (Modelo 53). Todos os experimentos foram realizados a 25 ou 37 $^{\circ}\text{C}$ e iniciados com a adição

de peroxinitrito ou peróxido de hidrogênio. O pH final da mistura da reação foi verificado nas reações iniciadas pela adição de alíquotas de soluções alcalinas de peroxinitrito. Assumiram-se as seguintes concentrações saturantes de oxigênio: 250 μM a 25 °C e 220 μM a 37 °C (89).

3.4.3 Medidas Espectrofotométricas

Espectros de absorção e medidas cinéticas foram obtidos em espectrofotômetros Beckman, modelo DU-70, ou Hitachi, modelo U-2000.

3.4.5 EPR-Captação de Spin

Os experimentos de EPR foram realizados à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em um espectrômetro Bruker EMX. O pH final da mistura da reação foi verificado nas reações iniciadas pela adição de alíquotas de soluções alcalinas de peroxinitrito.

As simulações foi feita utilizando o software WINSIM descrito por Duling (90).

3.4.6 Análise de Produtos

3.4.6.1 Medidas de Eletroforese Capilar

As análises de produto por eletroforese capilar foram feitas pelo laboratório da Prof. Marina Tavares, IQ-USP.

As análises dos produtos de reação de AA, IBAL e MAA foram realizadas em um equipamento Perkin-Elmer, modelo 270A-HT, com detector de UV/Vis ajustado a 254 nm e a temperatura mantida a 25 °C. A aquisição e análise dos dados foram feitas pelo software Turbochrom. A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida da Polymicro Technologies (75 µm d.i., 360 µm d.e. e comprimento 72 cm). A janela de detecção de 0,2 cm foi criada a 50 cm do início do capilar. As amostras foram injetadas pelo método hidrodinâmico, a 5 mmHg por 1-5 s. Foi utilizado cromato de sódio 10 mM como eletrólito e hexadeciltrimetilamônio 0,2 mM como modificador.

As análises dos produtos das reações com EAA, EMAA e SA foram realizadas em um equipamento P/ACE da Beckman Instruments com controlador de temperatura e aquisição de dados feita pelo programa System Gold. A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida da Polymicro Technologies (75 µm d.i., 360 µm d.e. e comprimento 57 cm). A janela de detecção foi criada a 50 cm do início do capilar. O ácido 3,5-dinitrobenzóico 10 mM pH 5,5 foi utilizado como tampão e brometo de tetradeciltrimetilamônio 0,5 mM como modificador. A análise foi feita a 254 nm, com voltagem a -8 kV e a temperatura no interior do cartucho mantida a 30 °C. O capilar foi condicionado no início do experimento com NaOH 1 mM, água deionizada e tampão por 5, 5 e 20 min, respectivamente. O condicionamento entre as corridas foi feito com tampão por 2 min.

Para essas análises, alíquotas de peroxinitrito e HCl foram depositadas separadamente nas paredes internas de um tubo de microcentrífuga contendo 1 mL de solução do substrato. O tubo foi agitado vigorosamente e o pH final verificado (Condição 1). Algumas análises foram feitas em frascos com agitação magnética, adicionando-se peroxinitrito lentamente (Condição 2).

4. Resultados e Discussão

4.1 Aldeídos e β -Dicetonas

4.1.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência

As Figuras 5 e 6 apresentam o consumo total de oxigênio e a intensidade máxima de quimiluminescência da reação entre IBAL e peroxinitrito. O consumo varia com a concentração de reagentes e possui boa correlação com a quimiluminescência sensibilizada por DBAS, umceptor de espécies tripletes, sugerindo que estes processos estão relacionados.

Figura 5. Consumo total de oxigênio e intensidade máxima de quimiluminescência por diferentes concentrações de IBAL na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 25 °C.

Figura 6. Consumo total de oxigênio e intensidade máxima de quimiluminescência por IBAL (20 e 10 mM, respectivamente) em diferentes concentrações de peroxinitrito em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 25 °C.

A adição de 9,10-difenil-2-antracenosulfonato (DPAS), sensitizador apenas de espécies singletes, ao sistema IBAL/peroxinitrito não alterou a emissão, excluindo portanto a natureza singlete da espécie gerada.

A reação entre peroxinitrito e *neo*-pentanal (NP), análogo não enolizável do IBAL, não consumiu oxigênio (Figura 7). De forma análoga, a reação de cetonas pouco enolizáveis como a 2-pentanona (2-P) com peroxinitrito apresentou baixo consumo de oxigênio, indicando uma correlação entre enolização e consumo de oxigênio. De fato, a oxidação dos compostos mais enolizáveis acetoacetona (AA) e 3-metilacetoacetona (MAA) (concentração enólica em meio aquoso: AA – 15,9%; MAA – 2,8%) (91) consumiu completamente o oxigênio do meio (Figura 7).

Figura 7. Consumo de oxigênio por AA, IBAL, MAA, NP e 2-P (10 mM) tratados com peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 25 °C.

Figura 8. Perfil de pH do consumo total de oxigênio por MAA 1 mM tratado com peroxinitrito 0,5 mM em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 25 °C.

O perfil de pH desse consumo é mostrado na Figura 8 para a 3-metilacetoacetona. O gráfico obtido possui ótima correlação com a curva de titulação do ácido peroxinitroso (87), indicando o ânion peroxinitrito como a espécie iniciadora da oxidação.

4.1.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Os estudos de EPR foram realizados com o objetivo de detectar e identificar os intermediários radicalares. Os resultados obtidos para o IBAL, utilizando-se o captador DBNBS, são apresentados na Figura 9.

Figura 9. Espectro de EPR dos adutos-radicais de DBNBS obtidos após 3 min de incubação à temperatura ambiente de DBNBS 20 mM e de IBAL 10 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 na presença de peroxinitrito 0,5 mM (A,B) e HCO_3^- 20 mM (B). Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 320 ms; ganho, $1 \cdot 10^6$.

O espectro observado possui dois adutos: um sexteto ($a_N=1,45$ mT; $a_H=0,97$ mT) e um triplete ($a_N=1,45$ mT).

O sexteto pode ser atribuído a um radical secundário ($\bullet\text{CH}(\text{CH}_3)_2\text{-DBNBS}$) cuja formação é prevista pela rota de adição nucleofílica (Figura 4). Por sua vez, o triplete é atribuível ao radical terciário ($\bullet\text{IBAL}$), formado pela abstração de um hidrogênio da forma enólica do substrato (Figura 3 - (I)), embora não se possa excluir que seja originário da oxidação do "ene" aduto entre DBNBS e IBAL por peroxinitrito.

A adição de bicarbonato ao meio resultou na diminuição da intensidade do sinal. Resultado semelhante foi observado para o consumo de oxigênio e quimiluminescência do sistema, indicando que a reação não é iniciada pelo aduto ONOO-CO_2^- ou por um de seus produtos de decomposição, como o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Nenhum aduto foi detectado utilizando-se o captador MNP.

Para compostos pouco enolizáveis, como o acetaldeído, são esperados somente os radicais previstos pela adição nucleofílica. De fato, Nakao *et al.* detectaram apenas o radical previsto por essa rota ($\bullet\text{CH}_3$), utilizando o captador DBNBS. A detecção de radicais previstos tanto pela rota de adição nucleofílica quanto pela rota de oxidação unieletrônica indica a ocorrência e a competição entre essas duas vias para o sistema IBAL/peroxinitrito.

A Figura 10 apresenta os resultados do estudo de EPR para o sistema MAA/peroxinitrito.

O espectro obtido é composto por um triplete ($a_N=1,52$ mT), que pode ser atribuído ao aduto do radical terciário $\bullet\text{MAA}$, formado a

Figura 10. Espectros de EPR dos adutos-radicais obtidos após 4 min de incubação à temperatura ambiente de MNP 10 mM e MAA 10 mM (A-C e E) ou biacetilo 10 mM (D) na presença de peroxinitrito 0,5 mM (A-B e D) ou HRP 10 μ M/ H_2O_2 0,5 mM (C) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2. Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 320 ms (A-C e E) e 163,8 ms (D); ganho, $5 \cdot 10^4$ (A e D) e $5 \cdot 10^5$ (B, C e E).

partir da abstração de um hidrogênio da forma enólica do composto. Aumentando-se o ganho é possível detectar um segundo aduto, com constante de acoplamento hiperfino menor ($a_N = 0,83$ mT), sendo atribuível ao radical acetil (Figura 10B). Esse radical também pôde ser formado a partir da adição nucleofílica de peroxinitrito ao biacetilo (Figura 10D e 11).

Figura 11. Geração de radical acetil através da adição nucleofílica de peroxinitrito ao biacetilo.

Para evidenciar que ambos adutos podem ser gerados a partir da oxidação unieletrônica do composto, utilizou-se o sistema HRP/H₂O₂ como oxidante (Figura 10C). De fato, o espectro obtido foi o mesmo, corroborando as atribuições acima. O outro aduto presente nesse espectro também está presente no controle e é devido a uma impureza presente na solução do próprio captador (di-*t*-butilnitróxido – $a_N=1,72$ mT) (92).

A Figura 12 apresenta o espectro obtido para a oxidação de AA por HRP/H₂O₂ na presença de MNP.

O espectro detectado é composto por um triplete ($a_N=1,54$ mT) e um sexteto ($a_N=1,46$ mT; $a_H=0,33$ mT) (Figura 12A). As Figuras 12B-D apresentam as simulações desses dois adutos em conjunto e isoladamente.

O sexteto pode ser atribuído ao radical de carbono (Figura 13A) gerado pela abstração de um hidrogênio da forma enólica do

Figura 12. Espectros de EPR dos adutos-radicais obtidos após 2 min de incubação à temperatura ambiente de MNP 10 mM e AA 10 mM (A) na presença de HRP 0,2 mg/mL e H_2O_2 1 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2. O espectro B é a simulação do espectro A; C e D são as simulações do triplete e do sexteto respectivamente. Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 0,5 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, $4,48 \cdot 10^4$.

Figura 13. Radical ressonante formado pela oxidação aeróbica de AA por peroxinitrito/O₂ ou HRP/H₂O₂.

Figura 14. Espectros de EPR dos adutos-radicais obtidos após 2 min de incubação à temperatura ambiente de MNP 20 mM e AA 10 mM (A) na presença de HRP 0,2 mg/mL e H₂O₂ 1 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2. O espectro em B é a simulação do espectro A; C é a simulação do sexteto. Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 0,5 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, 4,48.10⁵.

substrato (Figura 3). Por sua vez, o triplete detectado é atribuível ao enolato desse radical (Figura 13B).

A oxidação de AA por HRP/H₂O₂ foi descrita por Mason *et al.* embora em tampão acetato, pH 4,6. Nesse estudo também foram detectados um triplete e um sexteto, com constantes de acoplamento hiperfino semelhantes (tripleto - $a_N=1,58$ mT/ sexteto - $a_N=1,46$ mT; $a_H=0,34$ mT), que foram atribuídos aos mesmos radicais citados acima.

Aumentando-se a concentração do captador e o ganho, é possível detectar outro aduto, ainda não identificado (Figura 14). Esse sexteto possui constantes de acoplamento $a_N=1,63$ mT e $a_H=2,00$ mT.

Os mesmos adutos presentes na oxidação de AA por HRP/H₂O₂ foram detectados utilizando-se peroxinitrito como oxidante (Figura 15), indicando que esses radicais não são oriundos da rota de adição nucleofílica. Há outro aduto presente no espectro, ainda não identificado. É importante notar que esses radicais são instáveis, uma vez que após 5 min há a diminuição da intensidade do sinal (Figura 15B).

Figura 15. Espectros de EPR dos adutos-radicais obtidos após 2 min de incubação à temperatura ambiente de MNP 20 mM e AA 10 mM (A) na presença de peroxinitrito 0,5 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2. O espectro em B foi obtido após 7 min de incubação. Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 0,5 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, $4,48 \cdot 10^5$.

4.1.3 Análise de Produtos

O mecanismo apresentado na Figura 3 propõe a propagação da oxidação dos compostos carbonílicos enolizáveis e a formação de ácidos orgânicos como produtos da reação. Assim, a determinação desses produtos foi realizada com o objetivo de verificar se essa propagação ocorre na oxidação desses compostos por peroxinitrito.

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises de produtos das reações entre IBAL ou 2-P e peroxinitrito.

Para a 2-P, a relação entre acetato produzido e peroxinitrito adicionado foi igual a 0,28 em pH 11. Esse valor é semelhante ao obtido para a reação entre acetaldeído e peroxinitrito (0,17 em pH 6,7 (15) e 0,19 em pH 7,0 (79)) cujo mecanismo de reação preponderante é a adição nucleofílica. Da mesma forma, espera-se que apenas a rota de adição nucleofílica seja operante na oxidação da 2-P por peroxinitrito devido à sua baixa enolização.

Tabela 1. Análise de Produtos para as reações entre IBAL ou 2-P e peroxinitrito.

Substrato	Número de Experimentos	RCO ₂ ⁻ (mM)	RCO ₂ ⁻ /ONOO ⁻ (mol/mol)
Formiato			
IBAL (pH 7,5)	3	0,32 ± 0,03	0,64
IBAL (pH 11)	6	0,66 ± 0,11	1,32
Acetato			
2-P (pH 7,5)	3	ND	-
2-P (pH 11)	3	0,14 ± 0,04	0,28

Condições experimentais: IBAL e 2-P, 10 mM; peroxinitrito, 0,5 mM.

Os resultados obtidos para o IBAL são significativamente diferentes e indicam uma propagação da reação, principalmente em pH alcalino. É importante notar que esses experimentos foram feitos na ausência de tampão fosfato, catalisador tanto da enolização quanto da adição nucleofílica de peroxinitrito a compostos carbonílicos.

O maior rendimento de produtos observado em pH alcalino para a oxidação do IBAL pode ser explicado pela maior enolização desse composto nesse pH. O aumento do rendimento não pode ser explicado pela maior concentração do ânion peroxinitrito em pH alcalino pois, em pH 7,5, cerca de 88% do peroxinitrito já está presente na forma aniônica.

A Tabela 2 apresenta os resultados da análise de produtos para a oxidação das β -dicetonas estudadas.

Tabela 2. Análise de Produtos das reações entre AA ou MAA e peroxinitrito.

Substrato	Número de Experimentos	RCO_2^- (mM)	$\text{RCO}_2^-/\text{ONOO}^-$ (mol/mol)
Acetato			
AA (pH 7,5)	3	$0,50 \pm 0,02$	1,0
AA (pH 11)	6	$1,20 \pm 0,10$	2,4
MAA (pH 7,5)	3	$1,40 \pm 0,30$	2,8
MAA (pH 11)	3	$6,36 \pm 0,87$	12,7

Condições experimentais: AA e MAA 10 mM; peroxinitrito 0,5 mM

O rendimento de produtos em pH 11 foi significativamente maior, especialmente para o MAA. Como descrito acima para o IBAL, essa diferença é provavelmente devida à maior enolização desses compostos em pH alcalino.

A relação entre produto formado e peroxinitrito adicionado para ambos compostos foi maior do que a observada para a 2-pentanona, acetaldeído e IBAL, indicando uma correlação entre a enolização e a propagação da reação, como previsto pela rota proposta na Figura 3.

É importante notar que o rendimento de produtos para MAA foi de 3 a 5 vezes maior do que o observado para AA. Esse resultado sugere que a alquilação do carbono vicinal à carbonila determina a extensão da cadeia ("chain length") de reação desses compostos.

Tabela 3. Propriedades Físico-Químicas do IBAL, AA e MAA

Propriedade	IBAL	AA	MAA
K_e	1,8.10 ⁻⁴ ^a	0,19 ^b	0,029 ^b
E_{pa} (V)	> 2,75	2,53	1,99
pK_a	11,6 ^c	8,87 ^d	10,65 ^d

K_e – constante de equilíbrio de enolização; pK_a – constante de dissociação do enol; E_{pa}, potencial anódico. ^a Ref. 93. ^b Ref. 91. ^c Ref. 94. ^d Ref. 54.

Os resultados descritos acima podem ser explicados com base nos dados da Tabela 3. A facilidade de enolização do composto carbonílico determina o mecanismo de sua reação com peroxinitrito, o que pôde ser evidenciado pela existência ou não de consumo de oxigênio, pelos diferentes radicais intermediários detectados para cada um dos compostos e pela análise dos produtos. Além disso, a reatividade também é modificada pela alquilação do carbono vicinal à carbonila, alterando não só a extensão da reação, como visto pelo

maior consumo de oxigênio e formação de produtos, mas também a estabilidade dos radicais gerados (AA vs MAA).

4.2 β -Cetoésteres

4.2.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência

O consumo de oxigênio durante a oxidação de acetoacetato de etila (EAA) ou 2-metilacetoacetato de etila (EMAA) dependeu tanto da concentração do próprio substrato (Figura 16) quanto da concentração de peroxinitrito (Figura 17). A depleção total do oxigênio dissolvido na presença de 0,5 mM de peroxinitrito foi obtida com 2,5 e 5 mM de EAA e EMAA, respectivamente. Esse consumo é compatível com as constantes de enolização desses metabólitos (K_e : EAA – 0,022; EMAA – $\sim 10^{-3}$) (55).

Figura 16. Efeito da concentração de substrato sobre o consumo total de oxigênio na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 100 mM por EAA (♦) ou EMAA (●) em pH 7,2 a 37 °C.

Figura 17. Efeito da concentração de peroxinitrito sobre o consumo total de oxigênio na presença de EAA (♦) ou EMAA (•) (2,5 e 5 mM respectivamente) em tampão fosfato 100 mM pH 7,2 a 37 °C.

A oxidação de ambos os metabólitos por peroxinitrito é quimiluminescente, como mostrado para o EAA na Figura 18.

Conforme observado para as β -dicetonas acima, tanto o consumo de oxigênio (Figura 19) quanto a quimiluminescência (Figura 20) da oxidação desses compostos por peroxinitrito foram inibidas pela adição de bicarbonato ao meio, excluindo assim a participação do aduto ONOO-CO_2^- ou um de seus produtos de decomposição no processo de consumo de O_2 .

As Figuras 21 e 22 apresentam os perfis de pH do consumo de oxigênio e da intensidade de quimiluminescência de EAA e EMAA iniciados pela adição de peroxinitrito.

Figura 18. Emissão direta total de diferentes concentrações de EAA na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 19. Efeito da adição de bicarbonato sobre o consumo total de oxigênio por EAA (•) ou EMAA (♦) (1,25 e 3,25 mM respectivamente) na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 20. Efeito da adição de bicarbonato (20 mM) sobre a quimiluminescência do sistema EAA (10 mM)/peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 21. Perfil de pH da quimiluminescência (♦) e do consumo total de oxigênio (●) por EAA (10 e 0,75 mM respectivamente) na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 500 mM a 37 °C.

Figura 22. Perfil de pH da quimiluminescência (♦) e do consumo total de oxigênio (●) por EMAA (10 e 2 mM respectivamente) na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 500 mM a 37 °C.

Para ambos os metabólitos o gráfico obtido para o consumo de oxigênio descreve a curva de titulação do ácido peroxinitroso, indicando o ânion peroxinitrito como iniciador da oxidação.

Entretanto, a quimiluminescência direta desses metabólitos responde de maneira distinta a variações do pH do meio. Para o EMAA, a emissão direta possui boa correlação com o consumo total de oxigênio, apresentando maior intensidade em pHs alcalinos. Perfil de pH diferente foi obtido para a quimiluminescência de EAA, cuja intensidade é máxima em pH 7,2 e diminui com o aumento do pH.

Perfil semelhante foi descrito por Yang *et al.* para a constante de pseudo-primeira ordem da reação entre peroxinitrito e biacetilo (81). Esses autores demonstraram que a reação de cetonas pouco ou não enolizáveis com peroxinitrito em tampão fosfato ocorre por duas vias: i) adição direta do ânion peroxinitrito à carbonila; ii) adição catalisada por H_2PO_4^- do ânion peroxinitrito à carbonila (Figura 23).

$$\text{veloc.} = k_2[\text{cetona}][\text{ONOO}^-] + k_3[\text{cetona}][\text{H}_2\text{PO}_4^-][\text{ONOO}^-]$$

Figura 23. Vias de reação entre peroxinitrito e cetonas não enolizáveis.

O aumento do pH do meio diminui a concentração de H_2PO_4^- , explicando assim a diminuição da constante em pHs alcalinos.

Dessa forma, a queda da intensidade de emissão pode ser explicada pela menor concentração do ânion H_2PO_4^- , catalisador tanto da enolização quanto da adição nucleofílica de peroxinitrito a compostos carbonílicos.

Figura 24. Efeito da concentração de tampão fosfato (pH 7,2) sobre a emissão total de EAA (♦) ou EMAA (•) (ambos 10 mM) na presença de peroxinitrito (0,5 mM) a 37 °C.

Assim, o diferente comportamento das emissões de EAA e EMAA frente a variações no pH pode ser visto como respostas distintas desses metabólitos ao fosfato. De fato, a emissão devida à oxidação desses metabólitos responde de forma distinta a variações na concentração de tampão fosfato utilizado (Figura 24). A emissão do sistema EMAA/peroxinitrito não variou significativamente com a alteração da concentração de fosfato. Como o E° de EAA é mais positivo que o de EMAA, é possível que a cinética de reação do primeiro substrato seja governada pela enolização do substrato (catalisada por fosfato), sendo determinada pela facilidade de oxidação no caso do EMAA.

Esse efeito da concentração do tampão fosfato também foi verificado para o consumo de oxigênio (Figura 25). Para ambos os metabólitos há um aumento na concentração do consumo de oxigênio com o aumento da concentração de tampão fosfato.

Figura 25. Efeito da concentração de tampão fosfato pH 7,2 sobre o consumo total de oxigênio por EAA (♦) ou EMAA (•), ambos 1 mM, na presença de peroxinitrito 0,5 mM a 37°C.

4.2.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica

Para o estudo dos radicais intermediários foram utilizados os captadores MNP e DBNBS. Os resultados obtidos para o sistema

Figura 26. Espectros de EPR obtidos após 1 min de incubação de EMAA (10 mM) e peroxinitrito (1 mM) na presença de MNP 10 mM (A), 20 (mM) ou 60 mM (C) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente. O experimento (D) foi realizado na ausência de EMAA. Condições instrumentais: potência, 20,12 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, $2 \cdot 10^5$.

EMAA/peroxinitrito na presença de MNP são apresentados na Figura 26.

Apenas um triplete ($a_N=1,54$ mT) é detectado a baixas concentrações de MNP (10 mM) (Figura 26A). Aumentando-se a concentração do captador há um aumento na intensidade do triplete e também a detecção de um outro triplete ($a_N=0,83$ mT) (Figura 26B,C).

O aduto de maior constante hiperfina pode ser atribuído ao radical terciário $\bullet$ EMAA formado a partir da abstração de um hidrogênio da forma enólica do substrato, previsto pelo mecanismo de oxidação unieletrônica (Figura 3). O outro aduto é atribuível a um radical do tipo acil, que pode ser formado a partir da quebra da ligação carbonila-carbonila dos produtos formados (biacetilo ou piruvato de etila) no estado excitado triplete, no caso, o radical acetil. Esse mesmo tipo de radical foi descrito acima para a oxidação de MAA por peroxinitrito.

A Figura 27 apresenta os espectros obtidos utilizando-se o sistema HRP/H₂O₂ como oxidante. O espectro (Figura 27A) é idêntico ao obtido com peroxinitrito, indicando que os radicais detectados são formados pelo mecanismo de oxidação unieletrônica.

A adição de sorbato, um supressor de espécies tripletes, causou o desaparecimento do sinal devido ao radical acil (Figura 27B), sugerindo que as atribuições feitas para esse radical estão corretas.

Figura 27. Espectros de EPR obtidos após 4 min de incubação de EMAA (10 mM), HRP (0,5 μ M), H₂O₂ (0,5 mM) e MNP (10 mM) na ausência (A) ou presença (B) de sorbato (5 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente. Condições instrumentais: potência, 20,17 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 163,84 ms; ganho, $5 \cdot 10^4$.

Os espectros obtidos para a oxidação de EAA por peroxinitrito na presença de MNP são apresentados na Figura 28.

Utilizando-se 20 mM de MNP nenhum aduto é detectado (não mostrado). O aumento da concentração de MNP permite a detecção de dois adutos: um triplete ($a_N=1,63$ mT) e um sexteto ($a_N=1,62$ mT; $a_H=1,97$ mT), compondo um espectro semelhante ao obtido para a oxidação de AA por peroxinitrito (Figura 15). Assim, o triplete foi atribuído ao enolato do radical $\cdot$ EAA. O sexteto possui constantes de acoplamento muito semelhantes as obtidas para a oxidação de AA por peroxinitrito, sugerindo que o mesmo radical esteja presente nos dois sistemas. Esse aduto também foi detectado na oxidação de AA

Figura 28. Espectros de EPR obtidos após 1 min de incubação de EAA 10 mM e peroxinitrito 1 mM na presença de MNP 60 mM (A) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente. B é a simulação do espectro A. Condições instrumentais: potência, 20,17 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, $2 \cdot 10^5$.

Figura 29. Espectro de EPR obtido após 1 min de incubação de EAA 10 mM e peroxinitrito 0,5 mM na presença de DBNBS 20 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente. Condições instrumentais: potência, 20,17 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 163,84 ms; ganho, $2 \cdot 10^5$.

por HRP/H₂O₂, indicando que esse aduto não é formado pelo mecanismo proposto na Figura 4. Ambos os adutos são instáveis em tampão fosfato, com desaparecimento do sinal após 10 min (não mostrado). Essa instabilidade não foi observada para os adutos obtidos para o sistema EMAA/peroxinitrito.

A Figura 29 apresenta os resultados obtidos para o sistema EAA/peroxinitrito utilizando o captador DBNBS. Apenas o aduto correspondente ao radical $\cdot\text{CH}_3$ ($a_N=1,41$ mT; $a_H=1,35$ mT; $a_{H(m)}=0,070$ mT) foi detectado, resultado que evidencia a participação do mecanismo de adição nucleofílica na oxidação de EAA por peroxinitrito, uma vez que a formação desse radical é prevista por essa via (Figura 4). Esse radical não foi detectado no sistema EMAA/peroxinitrito/DBNBS, o que indica a prevalência da abstração unieletrônica na oxidação de EMAA por peroxinitrito.

4.2.3 Análise de Produtos

A Tabela 4 apresenta os resultados da análise dos produtos da oxidação de EAA e EMAA por peroxinitrito em água (pH=7,1).

A relação $\text{RCO}_2^-/\text{peroxinitrito}$ obtida para o EAA e EMAA (0,69 e 1,29, respectivamente) foi inferior à observada para os respectivos análogos β -dicetônicos AA e MAA (1,0 e 2,8) no pH estudado (Tabela 2). Esse resultado é o esperado pois a concentração enólica dos β -cetoésteres em meio aquoso é menor do que a observada para as β -dicetonas. Entretanto, esse valor está bem acima do observado para

Tabela 4. Análise de Produtos das reações entre EAA ou EMAA e peroxinitrito

Substrato	Número de Experimentos	RCO₂⁻ (mM)	RCO₂⁻/ONOO⁻ (mol/mol)
Acetato			
EAA (pH 7,1)	3	0,69 ± 0,01	0,69
EMAA (pH 7,1)	3	1,39 ± 0,07	1,39

Condições experimentais: EAA e EMAA, 10 mM; peroxinitrito, 1 mM.

compostos pouco enolizáveis, como acetaldeído, cuja relação é de apenas 0,19.

A produção de acetato foi maior para a oxidação de EMAA, apesar de sua menor enolização. Esse dado pode ser explicado, como visto acima para AA e MAA, pelo menor potencial anódico do EMAA (2,56 V) em relação a EAA (>3,2 V), sendo, portanto, mais facilmente oxidado. Esse resultado sugere que a alquilação do carbono vicinal às carbonilas determina a extensão da cadeia de reação da oxidação dos metabólitos carbonílicos.

4.3 Succinilacetona

4.3.1 Consumo de Oxigênio e Quimiluminescência

A reação entre SA e peroxinitrito consome oxigênio, sendo esse consumo dependente da concentração de ambos os reagentes (Figuras 30 e 31). A depleção total do oxigênio dissolvido foi obtida com 0,5 mM de SA na presença de 0,5 mM de peroxinitrito. Conforme visto acima, este consumo é coerente com a enolização esperada de uma β -dicetona. Esse consumo também pôde ser observado utilizando-se os sistemas citocromo *c*/H₂O₂ ou hemoglobina/H₂O₂ como oxidante, possuindo esses sistemas cinéticas mais lentas (Figura 32).

Figura 30. Efeito da concentração de peroxinitrito sobre o consumo total de oxigênio por SA 0,5 mM em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 31. Efeito da concentração de SA sobre o consumo total de oxigênio desse substrato na presença de peroxinitrito 0,5 mM em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 32. Consumo de oxigênio por SA 1,5 mM na presença de H₂O₂ 0,5 mM e citocromo c 30 μM (—) ou hemoglobina 22 μM (—) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 a 37 °C.

O sistema SA/peroxinitrito é quimiluminescente e a intensidade de sua quimiluminescência aumenta com o aumento da concentração de peroxinitrito, como mostra a Figura 33.

Figura 33. Efeito da concentração de peroxinitrito sobre a quimiluminescência total de SA 0,5 mM em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Conforme observado para os metabólitos carbonílicos descritos acima, a adição de bicarbonato ao meio de reação inibiu tanto o consumo de oxigênio quanto a quimiluminescência do sistema (Figura 34).

A Figura 35 apresenta a variação do consumo de oxigênio e da quimiluminescência do sistema SA/peroxinitrito com o pH.

Figura 34. Efeito da adição de bicarbonato (20 mM) sobre a quimiluminescência do sistema SA (0,5 mM)/peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 500 mM, pH 7,2 a 37 °C.

Figura 35. Perfil de pH da quimiluminescência (•) e do consumo total de oxigênio (♦) por SA (0,5 e 0,2 mM respectivamente) na presença de peroxinitrito (0,5 mM) em tampão fosfato 500 mM a 37 °C.

O maior consumo e emissão em pH mais alcalino indicam o ânion peroxinitrito como iniciador da oxidação. As curvas obtidas possuem ótima correlação, novamente sugerindo que os dois processos estão relacionados.

A Figura 36 apresenta a variação do consumo total de oxigênio e da quimiluminescência do sistema SA/peroxinitrito com a concentração do tampão fosfato.

Figura 36. Efeito da concentração de tampão fosfato pH 7,2 sobre a quimiluminescência (♦) e o consumo total de oxigênio (•) por SA (0,5 e 0,2 mM, respectivamente) na presença de peroxinitrito 0,5 mM a 37 °C.

O consumo de oxigênio por SA aumentou com a concentração de tampão fosfato. Conforme descrito acima, o fosfato catalisa tanto a adição nucleofílica quanto a enolização. Assim, esse maior consumo

pode ser devido: i) ao aumento da concentração de intermediários radicalares gerados pela adição nucleofílica; ii) à maior concentração da forma enólica no equilíbrio tautomérico do substrato.

Analogamente ao observado para o consumo de oxigênio, há uma dependência entre a quimiluminescência e a concentração de tampão fosfato. O aumento de 10 vezes da concentração de tampão triplicou a intensidade de quimiluminescência do sistema, apontando uma correlação entre o consumo de oxigênio e a quimiluminescência do sistema.

4.3.2 Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Figura 37 apresenta os espectros de EPR obtidos para o sistema SA/peroxinitrito utilizando-se o captador MNP.

O espectro é composto por três adutos: um sexteto e dois tripletes. Um dos tripletes ($a_N=1,71$ mT) é devido à oxidação do próprio captador (Figura 37A e 38C). O outro triplete possui constante de acoplamento hiperfino $a_N=1,63$ mT e pode ser atribuído ao enol do radical gerado a partir da abstração de um hidrogênio do substrato.

O sexteto ($a_N=1,63$ mT; $a_H=1,92$ mT) ainda não foi identificado, mas é muito semelhante aos detectados para as oxidações de AA ($a_N=1,63$ mT; $a_H=2,0$ mT) e EAA ($a_N=1,62$ mT; $a_H=1,97$ mT) por peroxinitrito, indicando o mesmo tipo de radical nos três sistemas.

Figura 37. Espectros de EPR obtidos após 1 min (A) ou 10 min (B) de incubação de SA 10 mM e peroxinitrito 1 mM na presença de MNP 60 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,2 à temperatura ambiente. Condições instrumentais: potência, 20,17 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 81,92 ms; ganho, $6,32 \cdot 10^5$.

Esse aduto também foi detectado na oxidação de AA por HRP/H₂O₂, indicando que esse radical é formado pelo mecanismo de oxidação unieletrônica.

Os dois adutos detectados são bastante instáveis e após 10 minutos apenas o aduto devido à oxidação do próprio captador está presente (Figura 37B).

4.3.3 Análise de Produtos

A oxidação de SA pode gerar dois ácidos orgânicos distintos (acetato e succinato) (Figura 39). Os experimentos para a identificação e determinação da concentração desses ácidos foram

Figura 38. Simulações do espectro de EPR para o sistema SA/peroxinitrito (A). B é a simulação desse espectro na ausência do aduto devido à oxidação do captador (C).

realizados na ausência de tampão fosfato e em duas condições distintas. Na Condição 1 a oxidação é iniciada misturando-se rapidamente todo o peroxinitrito com a solução de SA, mantendo-se o sistema fechado. Por sua vez, a Condição 2 consiste na adição

Figura 39. Produtos formados pela oxidação unieletrônica de SA por peroxinitrito.

lenta de peroxinitrito ao meio, mantendo-se o sistema aberto e sob agitação. Em ambas as condições o pH da mistura de reação está entre 7,1 e 7,2. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5. Análise de produtos da reação entre SA e peroxinitrito

SA	RCO_2^- (mM)	RCO_2^- (mM)	$\text{RCO}_2^-/\text{ONOO}^-$ (mol/mol)
	Acetato	Succinato	
Condição 1	$0,40 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,04$	1,34
Condição 2	$11,00 \pm 0,21$	$0,56 \pm 0,02$	11,56

Condições Experimentais: SA, 10 mM; peroxinitrito, 0,5 mM (Condição 1) ou 1 mM (Condição 2).

A relação $\text{RCO}_2^-/\text{peroxinitrito}$ obtida para a oxidação de SA por peroxinitrito foi igual a 1,34 na condição 1. Esse valor é coerente com o descrito acima para a oxidação de β -dicetonas nas mesmas condições experimentais (AA e MAA) (Tabela 2), indicando uma propagação da reação de oxidação. Além disso, sugere a ocorrência de outro mecanismo de oxidação, uma vez que o valor esperado para a adição nucleofílica é significativamente menor ($\sim 0,19$).

Em uma condição que favorece a reoxigenação do meio (sistema aberto sob agitação) o rendimento de produtos foi cerca de 8,5 vezes maior, confirmando o fato de a disponibilidade de oxigênio governar a propagação da reação.

5. Conclusões

Compostos carbonílicos em geral, cujo principal mecanismo descrito de oxidação por peroxinitrito é a adição nucleofílica, possuem baixo consumo de oxigênio quando submetidos ao tratamento com peroxinitrito em meio aerado. Entretanto resultados obtidos para os compostos estudados nesta dissertação mostram que a oxidação por peroxinitrito consome oxigênio, consumo que está relacionado com a enolização do substrato (Figura 7), evidenciando a ocorrência de outro mecanismo de reação além da adição nucleofílica.

De fato, os estudos de EPR para o IBAL evidenciaram adutos de radicais que podem ser originados por duas vias diferentes (Figura 3 e 4), indicando a competição entre essas duas rotas.

A necessidade da enolização pôde ser confirmada nos estudos com β -dicetonas, cuja concentração enólica em meio aquoso é maior. As reações desses substratos com peroxinitrito mostraram a formação de produtos acima da concentração de peroxinitrito adicionado e, dessa forma, a propagação da reação. Esse resultado indica a forma enólica desses compostos como o substrato da oxidação. Além disso, apenas radicais esperados pelo mecanismo de oxidação unieletrônica foram detectados, corroborando a relação entre enolização e consumo de oxigênio com o mecanismo de oxidação unieletrônica.

O estudo com as β -dicetonas também mostrou que a alquilação do carbono α possui forte efeito sobre a reação, como visto pelo maior rendimento de produtos para a oxidação de MAA em relação a AA. Também é importante notar que os compostos α -alquilados apresentaram adutos mais intensos e estáveis (Figuras 10,15,26 e 28).

Todas as reações estudadas são quimiluminescentes e possuem forte correlação com o consumo de oxigênio. O estudo de quimiluminescência para o sistema IBAL/peroxinitrito indica que as espécies excitadas formadas encontram-se no estado triplete. A formação das espécies no estado triplete também pode ser evidenciada pela formação do radical acetil nesses sistemas.

A oxidação desses compostos foi fortemente inibida pela presença de CO_2 . Esse resultado exclui a participação do radical carbonato no mecanismo de reação. O ânion peroxinitrito pode ser atribuído como a espécie iniciadora da reação, conforme observado nos experimentos de perfil de pH para o consumo de oxigênio e quimiluminescência.

Em conjunto esses dados confirmam a hipótese de trabalho e indicam que a enolização e a α -alquilação desses compostos modula a reatividade dos compostos carbonílicos frente ao peroxinitrito, permitindo a ocorrência de outro mecanismo de reação.

Além dos dois mecanismos propostos, uma terceira via, combinando as duas anteriores, pode ser proposta para explicar os

Figura 40. Proposta de mecanismo de oxidação de compostos carbonílicos por peroxinitrito.

dados obtidos. A oxidação poderia ser iniciada pelo ataque nucleofílico do ânion peroxinitrito à carbonila do composto carbonílico (Figura 40). A seguir, poderia ocorrer a reforma do composto original e a produção de nitrato ou a homólise da ligação O-O e a formação do radical oxil, como proposto pelo mecanismo de adição nucleofílica. Por sua vez, esse radical pode sofrer clivagem β, originando um radical de carbono que pode ser aniquilado (Reação de Russell) como proposto pelo mecanismo da Figura 4, ou iniciar a reação de oxidação unieletrônica, abstraindo um hidrogênio da forma enólica do composto.

Independentemente do mecanismo de reação proposto, é interessante notar que a oxidação de compostos carbonílicos por peroxinitrito produz radicais intermediários potencialmente tóxicos como radicais de carbono, radicais oxil e radicais peroxil, além de espécies tripletes. É importante lembrar ainda que, embora esse trabalho não tenha estudado a sua formação, o mecanismo de oxidação proposto prevê a formação de α -oxoaldeídos reativos, como DOVA e metilglioxal. Dessa forma, a reatividade desses compostos frente a peroxinitrito pode contribuir para a elucidação das bases moleculares das patologias onde há o acúmulo desses metabólitos, como tirosinemia (succinilacetona), diabetes (acetoacetato) e isoleucinemia (2-metilacetoacetato).

6. Referências Bibliográficas

- 1 Stadtman, E.R. (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **928**, 22-38.
- 2 Marnett, L.J. (2002) Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, **181-182**, 219-222.
- 3 Ulrich, P., Corami, A. (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 1-21.
- 4 Piclo, M.J., Montine, T.J., Amarnath, V., Neely, M.D. (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **184**, 187-197.
- 5 Yim, H.-S., Kang, S.-O., Hah, Y.-C., Chock, P.B., Yim, M.B. (1995) Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. *J. Biol. Chem.*, **270**, 28228-28233.
- 6 De La Fuente, J.R., Lissi, E.A. (1992) Excited Carbonyl Formation in the Combination and Disproportionation of Free Radicals. *J. Biolum. Chemilum.*, **7**, 27-35.
- 7 Cilento, G., Baptista, R.C., Brunetti, I.L. (1994) Triplet carbonyls: from photophysics to biochemistry. *J. Mol. Struct.*, **324**, 45-48.
- 8 Comporti, M. (1998) Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Rad. Res.*, **28**, 623-635.
- 9 Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 81-128.
- 10 Soffritt, M., Belpoggi, F., Lambertin, L., Lauriola, M., Padovani, M., Maltoni, C. (2002) Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **982**, 87-105.
- 11 Cheng, G., Shi, Y., Sturla, S.J., Jalas, J.R., McIntee, E.J., Villalta, P.N., Wang, M., Hecht, S.S. (2003) Reactions of formaldehyde plus acetaldehyde with deoxyguanosine and DNA: formation of cyclic deoxyguanosine adducts and formaldehyde cross-links. *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 145-1523.
- 12 Inagaki, S., Esaka, Y., Deyashiki, Y., Sako, M., Goto, M. (2003) Analysis of DNA adducts of acetaldehyde by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **987**, 341-347.
- 13 Conduah B., J.E., Shuker, D.E., Farmer, P.B. (1998) Stable acetaldehyde-protein adducts as biomarkers of alcohol exposure. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 136-142.
- 14 Upadhyya, S.C., Ravindranath, V. (2002) Detection and localization of protein-acetaldehyde adducts in rat brain after chronic ethanol treatment. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **26**, 856-863.

-
- 15 Nakao, L.S., Ouchi, D., Augusto, O. (1998) Oxidation of acetaldehyde by peroxyxynitrite and hydrogen Peroxide/Iron(II). Production of acetate, formate, and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1010-1018.
- 16 Kalapos, M.P. (1994) Methylglyoxal toxicity in mammals. *Toxicol. Lett.*, **73**, 3-24.
- 17 Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H., Bechara, E.J., Cadet, J., Di Mascio, P. (1998) DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 150-157.
- 18 Di Mascio, P., Teixeira, P.C., Onuki, J., Medeiros, M.H., Dornemann, D., Douki, T., Cadet, J. (2000) DNA damage by 5-aminolevulinic and 4,5-dioxovaleric acids in the presence of ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 368-374.
- 19 Jain, S.K., McVie, R., Jaramillo, J.J., Chen, Y. (1998) Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL+VLDL in type-I diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 175-181.
- 20 Jain, S.K., Kannan, K., Lim, G. (1998) Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 1083-1088.
- 21 Aramaki, S. Lehot, D. Sweetman, L., Nyhan, W.L., Winter, S.C., Middleton, B. (1991) Urinary excretion of 2-methylacetoacetate, 2-methyl-3-hydroxybutyrate and tiglylglycine after isoleucine loading in the diagnosis of 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **14**, 63-74.
- 22 Fontaine, M., Briand, G., Ser, N., Armelin, I., Rolland, M.O., Degand, P., Vamecq, J. (1996) Metabolic studies in twin brothers with 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *Clin. Chim. Acta*, **255**, 67-83.
- 23 Bos, P.M., De Mik, G., Bragt, P.C. (1991) Critical review of the toxicity of methyl n-butyl ketone risk from occupational exposure. *Am. J. Ind. Med.*, **20**, 175-194.
- 24 Zimmerman, F.K., Scheel, I., Resnick, M.A. (1989) Induction of chromosome loss by mixtures of organic solvents including neurotoxins. *Mutat. Res.*, **224**, 287-303.
- 25 Yu, R.C., Hattis, D., Landaw, E.M., Froines, J.R. (2002) Toxic kinetic interaction of 2,5-hexanedione and methyl ethyl ketone. *Arch. Toxicol.*, **75**, 643-652.
- 26 O'Donoghue, J.L., Krasavage, W.J., Divincenzo, G.D., Katz, G.V. (1984) Further studies on ketone neurotoxicity and interactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 201-209.
- 27 Douglas, D.E., Francis, L.E., Melville, K.I. (1978) The isolation and identification of 2,4-diketones present in human and animal tissues and in urine. *Can. J. Biochem.*, **56**, 691-696.
- 28 Douglas, D.E. (1991) Higher aliphatic 2,4-diketones: a ubiquitous lipid class with chelating properties, in search of a physiological function. *J. Lipid Res.*, **32**, 553-558.
- 29 Douglas, D.E. (2002) Retene revisited. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 1429-1431.

-
- 30 Patro, B.S., Rele, S., Chintalwar, G.J., Chattopadhyay, S., Adhikari, S., Mukherjee, T. (2002) Protective Activities of some phenolic 1,3-diketones against lipid peroxidation: possible involvement of the 1,3-diketone moiety. *Chembiochem.*, **3**, 364-370.
- 31 Jovanovic, S.V., Steenken, S., Boone, C.W., Simic, M.G. (1999) H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **121**, 9677-9681.
- 32 Jovanovic, S.V., Boone, C.W., Steenken, S., Trinoga, M., Kasley, R.B. (2001) How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **123**, 3064-3068.
- 33 Sugiyama, Y., Kawakishi, S., Osawa, T. (1996) Involvement of the beta-diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 519-525.
- 34 Lindblad, B., Lindstedt, S., Steen, G. (1977) On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4641-4645.
- 35 Manabe, S., Sassa, S., Kappas, A. (1985) Hereditary tyrosinemia. Formation of succinylacetone-amino acid adducts. *J. Exp. Med.*, **162**, 1060-1074.
- 36 Jorquera, R., Tanguay, R.M. (1997) The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **232**, 42-48.
- 37 Prieto-Alamo, M.J., Laval, F. (1998) Deficient DNA-ligase activity in the metabolic disease tyrosinemia type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12614-12618.
- 38 Bechara, E.J. (1996) Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**, 841-851.
- 39 Cilento, G. (1995) Enzymatic generation of electronically excited triplet species: Photochemistry without light. *Cienc. Cult.*, **47**, 312-319.
- 40 Turro, N.J. (1978) *Modern Molecular Photochemistry*, University Press, Menlo Park, California.
- 41 Adam, W., Saha-Moller, C.R., Schonberger, A., Berger, M., Cadet, J. (1995) Formation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine in the 1,2-dioxetane-induced oxidation of calf thymus DNA: evidence for photosensitized DNA damage by thermally generated triplet ketones in the dark. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 231-238.
- 42 Adam, W., Beinhauer, A., Mosandl, T., Saha-Moller, C., Vargas, F., Epe, B., Muller, E., Schiffmann, D., Wild, D. (1990) Photobiological studies with dioxetanes in isolated DNA, bacteria, and mammalian cells. *Environ. Health Perspect.*, **88**, 89-97.
- 43 Nascimento, A.L.T.O., Cilento, G. (1987) Generation of electronically excited states *in situ*. Polymorphonuclear leukocytes treated with phenylacetaldehyde. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 137-141.

-
- 44 Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1996) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2929-2934.
- 45 Indig, G.L., Campa, A., Bechara, E.J.H., Cilento, G. (1988) Conjugated diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem. Photobiol.*, **48**, 719-723.
- 46 Nantes, I., Cilento, G., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E. (1995) Chemiluminescent diphenylacetaldehyde oxidation by mitochondria is promoted by cytochromes and leads to oxidative injury of the organelle. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 522-527.
- 47 Almeida, A.M., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E., Nantes, I.L. (1999) Diphenylacetaldehyde-generated excited states promote damage to isolated rat liver mitochondrial DNA, phospholipids, and proteins. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 744-751.
- 48 Timmins, G.S., Santos, R.E., Whitwood, A.C., Catalani, L.H., Di Mascio, P., Gilbert, B.C., Bechara, E.J.H. (1997) Lipid peroxidation-dependent chemiluminescence from cyclization of alkylperoxyl radicals to dioxetane radical intermediates. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1090-1096.
- 49 Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 79-110.
- 50 Mendenhall, G.D., Sheng, X.C., Wilson, T. (1991) Yields of excited carbonyl species from alkoxyl and from alkylperoxyl radical dismutation. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8976-8977.
- 51 Cilento, G., Adam, W. (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 103-114.
- 52 Becker, T.W., Krieger, G., Witte, I. (1998) Different DNA damaging species as a result of oxidation of *n*-butyraldehyde and *iso*-butyraldehyde by Cu(II) . *Free Rad. Res.*, **29**, 25-34.
- 53 Bechara, E.J.H., Soares, C.H. (1982) Enzymatic generation of triplet biacetyl. *Photochem. Photobiol.*, **30**, 101-110.
- 54 Bruice, P.Y. (1990) Role of the acidity of the ketone in determining the mechanism of enolization *via* proton abstraction from ketone carbinamine or imine: Catalysis of the enolization of 2,4-pentanedione and 3-methyl-2,4-pentanedione by oxyanions and by primary, secondary and tertiary amines. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 7361-7368.
- 55 Christoff, M. "Oxidação aeróbica de beta-dicetonas, alfa-alquil substituídas, em presença de hemoglobina", Dissertação de Mestrado, Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechra, IQ-USP, 1990.
- 56 Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Rubbo, H. The biological chemistry of peroxynitrite. In: Ignarro, L.J., Nitric Oxide: biology and pathobiology. New York, Academic Press, p.57-89, 2000.
- 57 Bartlett, D., Church, D.F., Bounds, P.L., Koppenol, W.H. (1995) The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 85-92.

-
- 58 Lemerrier, J.N., Squadrito, G.L., Pryor, W.A. (1995) Spin trap studies on the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**, 31-39.
- 59 Hogg, N., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (1994) The oxidation of alpha-tocopherol and trolox by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 153-158.
- 60 Santos, C.X., Anjos, E.I., Augusto, O. (1999) Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **372**, 285-294.
- 61 Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Lizasoain, L., Su, Y., Knowles, R.G., Radomski, M.W., Moncada, S. (1995) The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 1999-2004.
- 62 Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 481-487.
- 63 Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.*, **424**, 37-49.
- 64 Radi, R. (1998) Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 720-721.
- 65 Lemerrier, J.N., Padmaja, S., Cueto, R., Squadrito, G.L., Uppu, R.M., Pryor, W.A. (1997) Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 160-170.
- 66 Van Der Vliet, A., Hoen, P.A., Wong, P.S., Bast, A., Cross, C.E. (1998) Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30255-30262.
- 67 Rohn, T.T., Nelson, L.K., Sipes, K.M., Swain, S.D., Jutila, K.L., Quinn, M.T. (1999) Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. *J. Leukoc. Biol.*, **65**, 59-70.
- 68 Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C. (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett.*, **140-141**, 113-124.
- 69 Klotz, L.-O., Schroeder, P., Sies, H. (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 737-743.
- 70 Rubbo, H., Trostchansky, A., Botti, H., Batthyány, C. (2002) Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol. Chem.*, **383**, 547-552.
- 71 Augusto, O., Bonini, M.G., Amanso, A.M., Linares, E., Santos, C.C.X., Menezes, S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 841-859.

72 Squadrito, G.L., Pryor, W.A. (2002) Mapping the reaction of peroxynitrite with CO₂: energetics, reactive species, biological implications. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**, 885-895.

73 Radi, R. (1998) Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 720-21.

74 Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A. (2001) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 463-488.

75 Monteiro, H.P. (2002) Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation-dependent signaling events? *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 765-773.

76 Mannick, J.B., Schonhoff, C.M. (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.*, **408**, 1-6.

77 Kuo, W.N., Kocis, J.M. (2002) Nitration/S-nitrosation of proteins by peroxynitrite-treatment and subsequent modification by glutathione S-transferase and glutathione peroxidase. *Mol. Cell. Biochem.*, **233**, 57-63.

78 Viner, R.I., Williams, T.D., Schoneich, C. (1999) Peroxynitrite modification of protein thiols: oxidation, nitrosylation, and S-glutathiolation of functionally important cysteine residue(s) in the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Biochemistry*, **38**, 12408-12415.

79 Uppu, R.M., Winston, G.W., Pryor, W.A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1331-1337.

80 Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 786-794.

81 Yang, D., Tang, Y.-C., Chen, J., Wang, X.-C., Bartberger, M.D., Houk, K.N., Olson, L. (1999) Ketone-catalyzed decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1976-11983.

82 Merényi, G., Lind, J., Goldstein, S. (2002) The rate of homolysis of adducts of peroxynitrite to the C=O double bond. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 40-48.

83 Catalani, L.H., Wilson, T., Bechara, E.J.H. (1987) Two water-soluble fluorescence probes for chemiexcitation studies: sodium 9,10-dibromo and 9,10-diphenylanthracene-2-sulfonate. Synthesis, properties and application to triplet acetone and tetramethyldioxetane. *Photochem. Photobiol.*, **45**, 273-281

84 Ohlsson, P.I., Paul, K.G. (1976) The molar absorptivity of horseradish peroxidase. *Acta Chem. Scand. Ser.*, **B30**, 373-375.

85 Beers JR., R.F., Sizer, J.W. (1952) A spectrometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.

86 Hughes, M.N., Nicklin, H.G. (1968) The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acids. *J. Chem. Soc. A*, 450-456.

-
- 87 Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1620-1624.
- 88 Kaur, H., Leung, K.H.W., Perkins, M.J. (1981) A water-soluble, nitroso-aromatic spin-trap. *J.C.S. Chem. Comm.*, 142-143.
- 89 Robinson, J., Cooper, J.M. (1970) Method of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibrations of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.*, **33**, 390-399.
- 90 Duling, D.R. (1994) Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J. Magn. Reson.*, **104**, 105-110.
- 91 Alcais, P., Brouillard, R. (1972) Influence of structure on β -diketo-enol equilibria: a kinetic study by the relaxation technique. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2*, 1214-1219.
- 92 Mottley, C., Robinson, R.E., Mason, R.P. (1991) Free radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 153-160.
- 93 Baader, W.J., Bohne, C., Cilento, G., Dunford, B.H. (1985) Peroxidase-catalyzed formation by triplet acetone and chemiluminescence of isobutyraldehyde and molecular oxygen. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10217-10225.
- 94 Chiang, Y., Kresge, A.J., Walsh, P.A. (1986) Generation of simple enols in aqueous-solution from alkali-metal enolates. Some chemistry of isobutyraldehyde enol. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6314-6320.