UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

*Estudo de Sondas Supressoras de
Quimiluminescência Biológica*

Adriana Correia de Velosa

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

SÃO PAULO
22 de dezembro de 2003

BIBLIOTECA

★

20673

★

INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005810

Ficha Catalográfica

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

Velosa, Adriana Correia de
V443e Estudo de sondas supressoras de quimiluminescência
biológica / Adriana Correia de Velosa -- São Paulo, 2003.
70p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Bechara, Etelvino José Henriques

1. Fotobioquímica 2. Radical livre : Bioquímica I. T.
II. Bechara, Etelvino José Henriques, orientador.

574.19121 CDD

“Estudo de sondas supressoras de quimiluminescência biológica”

ADRIANA CORREIA DE VELOSA

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 Química – Área: Química Orgânica

Aprovada por:

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

Prof. Dr. PAULO DI MASCIO
IQ – USP

Profa. Dra. ISELI LOURENÇO NANTE
UMC

SÃO PAULO
22 DE DEZEMBRO 2003.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aqueles que me ajudaram a realizar este trabalho ao longo destes anos. Não só aos que me ajudaram tecnicamente, mas aos que realmente me incentivaram a não desistir, que me fizeram rir e tocar a bola pra frente sem dar muita importância ao que os outros dizem, pois o que importa mesmo é o que você é e não o que os outros pensam de você!

Assim, agradeço aos meus amigos (por quê este machismo se a maioria é mulher??!!!) Paty, Lilian, Andréia, Carla, Flávio e Fábio, que já mudou de estatus...

Agradeço aos colegas de todos os laboratórios pelos quais passei, seja pedindo reagentes seja utilizando equipamentos ou mesmo só pentelhando.

Agradeço à Dóris, ao Carlos e ao Avishek pelas discussões não tão científicas assim e pelo apoio.

Agradeço ao prof. Paolo Di Mascio por permitir o uso do HPLC-Massa e ao prof. Maurício Baptista pelo uso do equipamento de detecção de oxigênio singlete no infravermelho.

Agradeço ainda ao prof. Josef Wilhem Baader pela co-orientação e ao prof. Etelvino Bechara pela orientação.

E claro, agradeço especialmente à FAPESP e ao CNPq que bancaram à mim e a este projeto.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Fotoquímica de compostos carbonílicos.....	2
1.1.1. Processos fotoquímicos primários de cetonas alquílicas.....	3
1.1.1.1. Clivagem α	4
1.1.1.2. Abstração de hidrogênio.....	5
1.1.1.3. Transferência de carga.....	5
1.2. Dienos conjugados como supressores de cetonas triplete.....	7
1.3. Fontes geradoras de compostos carbonílicos triplete.....	8
1.4. Ação biológica dos compostos carbonílicos triplete.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Equipamentos.....	16
3.2. Reagentes.....	17
3.3. Determinação de concentrações.....	17
3.4. Preparo de microsossomos e mitocôndrias de fígado de ratos.....	18
3.5. Inchamento mitocondrial.....	18
3.6. Preparações	
3.6.1. Tetrametil-1,2-dioxetano (TMD).....	18
3.6.2. Preparação do ácido <i>trans, trans</i> -2,4-pentadienóico (PDA).....	20
3.7. Tentativas de preparo do cloreto de 1,3-butadienil-trimetilamônio	
3.7.1. Preparação do etilcarbamato de <i>trans,trans</i> -2,4-butadieno (NPDA 1).....	21
3.7.2. Preparação do benzilcarbamato de <i>trans, trans</i> -1,3-butadieno (NPDA 2).....	22

3.7.3. Tentativa de preparo da <i>trans, trans</i> -1,3-butadienamina a partir do etilcarbamato de <i>trans, trans</i> -1,3-butadieno.....	22
3.7.4. Tentativa de preparo da <i>trans, trans</i> -1,3-butadienamina a partir do benzilcarbamato de <i>trans, trans</i> -1,3-butadieno.....	23
3.8. Determinação das constantes de supressão ($k_q\tau$) por diferentes dienos conjugados	
3.8.1. Supressão da acetona triplete gerada pela termólise do tetrametil-1,2-dioxetano.....	23
3.8.2. Supressão de acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/O ₂	24
3.9. Verificação da supressão do DBAS singlete por diferentes dienos conjugados.....	24
3.10. Experimentos no EPR.....	25
3.11. Estudo da interação do sorbato e do ácido <i>trans, trans</i> -2,4-pentadienóico com a acetona triplete gerada na termólise do tetrametil-1,2-dioxetano.....	25
3.12. Experimentos de supressão de oxigênio singlete por dienos conjugados.....	26
3.13. Testes de supressão de radicais peroxil por dienos conjugados.....	26
3.14. Testes de supressão de radicais hidroxil por dienos conjugados.....	26
3.15. Testes de supressão do ânion-radical superóxido.....	26
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Preparações	
4.1.1. Tetrametil-1,2-dioxetano.....	28
4.1.2. Ácido <i>trans, trans</i> -2,4-pentadienóico.....	29
4.1.3. Benzil e etil carbamato de <i>trans, trans</i> -1,3-butadieno.....	30
4.2. Experimentos de supressão da acetona triplete gerada pela termólise do tetrametil-1,2-dioxetano	
4.2.1. Determinação das constantes de supressão ($k_q\tau$) por dienos conjugados.....	31
4.3. Determinação de K_{SV} para a acetona gerada no sistema IBAL/HRP/O ₂	35
4.4. Experimentos de EPR.....	39
4.5. Estudo da interação do sorbato e do ácido <i>trans, trans</i> -2,4-pentadienóico com a acetona triplete gerada na termólise do tetrametil-1,2-dioxetano.....	43
4.6. Experimentos de supressão de oxigênio singlete por dienos conjugados.....	51
4.7. Testes de supressão de radicais peroxil por dienos conjugados.....	54
4.8. Análise de supressão de radical hidroxil pelos dienos.....	56

4.9. Análise de supressão do ânion-radical superóxido pelos dienos.....	57
4.10.Experimentos de inchamento de mitocôndria por DPAA.....	58
4.11.Experimentos de supressão de quimiluminescência de microssomos.....	60
 5. CONCLUSÕES.....	 62
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 63

RESUMO

Os compostos carbonílicos no estado triplete (CCT) são considerados espécies reativas de oxigênio uma vez que possuem comportamento químico semelhante ao de radicais alcóxil. Quando formadas em sistemas biológicos, estas espécies podem estar envolvidas tanto em processos benéficos quanto deletérios ao organismo, como é o caso da lipoperoxidação, onde CCT não só são gerados como também iniciam ou amplificam o processo.

Visando estudar a capacidade de dienos conjugados de suprimir a energia triplete de tais compostos, de forma a diminuir seus efeitos deletérios, determinou-se as constantes de supressão, para quatro diferentes dienos, de acetona triplete gerada pela termólise do tetrametil-1,2-dioxetano e pelo sistema enzimático isobutanal/ "horseradish peroxidase"/O₂. Todos os dienos apresentaram constantes de supressão de ordem difusional.

Foi analisada também a forma pela qual os dienos suprimem a acetona triplete e concluiu-se que tanto dienos com hidrogênios alílicos (2,4-hexadienoato e seu éster etílico), potencialmente abstraíveis, quanto dienos sem estes hidrogênios (2,4-pentadienoato e seu éster metílico), suprimem a acetona por um processo físico de transferência de energia, que leva à sua fotoisomerização *cis,trans*.

A reatividade destes dienos frente a espécies reativas de oxigênio comumente formadas em sistemas de lipoperoxidação, como o oxigênio singlete, radicais hidroxil, peróxil e superóxido, foi também testada, mostrando que nenhum dos dienos apresenta atividade sequestradora destas espécies.

Experimentos preliminares de lipoperoxidação em sistemas biomiméticos (mitocôndrias e microssomos isolados de fígado de rato), mostraram que o *trans, trans*-2,4-hexadienoato de etila

é capaz de inibir o inchamento mitocondrial induzido por benzofenona triplete e de suprimir a quimiluminescência de microssomos induzida por Fe^{2+} / ascorbato.

Concluiu-se assim que dienos conjugados, contendo ou não hidrogênios alílicos, podem ser usados como supressores específicos de compostos carbonílicos triplete em sistemas biológicos e contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de reação destes processos.

ABSTRACT

Triplet carbonyls can be named reactive oxygen species once they behave chemically as alkyloxyl radicals and therefore can potentially drive beneficial and deleterious processes in biological systems. In the case of lipid peroxidation, these species have been found not only to be reaction products but also to amplify the radical chain by hydrogen abstraction of polyunsaturated lipid molecules.

With the aim of finding efficient and reliable chemical probes for triplet carbonyls, we studied here the quenching properties of conjugated dienes, namely 2,4-hexadienoate and 2,4-pentadienoate anions and corresponding alkyl esters, upon triplet acetone generated either chemically (thermolysis of tetramethyl-1,2-dioxetane) or enzymically (aerobic oxidation of isobutanol/horseradish peroxidase). As expected, the quenching rate constants were found to be diffusion controlled, although those for the pentadienoate derivatives were 3-fold lower than those measured for the hexadienoates. Therefore, independently of the presence of allylic hydrogens in the diene probe, the triplet acetone quenching occurred by a physical process followed by *cis,trans*-isomerization, without hydrogen abstraction from the quencher.

The reactivity of the studied dienes towards oxygen reactive species known to be formed during lipid peroxidation, such as singlet oxygen, and peroxy, hydroxyl and superoxide radicals, was also investigated to assure they would not interfere with the radical lipoperoxidation chain. Indeed, none of the dienes showed antioxidant activity on classical model systems.

Preliminary experiments with model systems widely used to study lipid peroxidation showed that the *trans, trans*-ethyl sorbate can inhibit the mitochondrial swelling induced by enzymically formed triplet benzophenone and to quench the chemiluminescence of microsome preparations challenged with iron/ascorbate. This is in agreement with reported work showing

that the lipid peroxidation chain associated with mitochondria permeabilization and polyunsaturated fatty acid peroxidation is amplified by intermediate triplet carbonyl products.

Altogether our data indicate that conjugated dienes can be used as specific quenchers of triplet carbonyls formed in biological systems without reacting with other reactive intermediates.

ABREVIATURAS

CCT	compostos carbonílicos triplete
IBAL	isobutanal
HRP	peroxidase de raiz forte
TMD	tetrametil-1,2-dioxetano
HDA	ácido <i>trans, trans</i> -2,4-hexadienóico
HDE	<i>trans, trans</i> -2,4-hexadienoato de etila
PDA	ácido <i>trans, trans</i> -2,4-pentadienóico
PDM	2,4-pentadienoato de metila
MDA	malondialdeído
ISC	cruzamento intersistemas
DPAA	difenilacetaldeído
NBT	azul de nitrotetrazolium
DBAS	sulfonato de 9,10-dibromoantraceno
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
TBARS	espécies reativas com ácido tiobarbitúrico
AM	azul de metileno
BHT	<i>terc</i> -butil tolueno

1. INTRODUÇÃO

Compostos carbonílicos são hoje reconhecidos como importantes produtos ou mediadores químicos de lesão a biomoléculas e estruturas celulares. Formam-se *in vivo* como produtos de peroxidação de lipídios, proteínas e DNA e muitos deles são metabólitos da via degradativa de aminoácidos acumulados em situações de biossíntese deficiente ou inibição de enzimas destas vias. Entre eles, menciona-se produtos de peroxidação lipídica como n-hexanal, o 2,4-heptadienal, o malondialdeído e compostos α -dicarbonílicos oriundos de aminoácidos como o metilglioxal, o ácido 4,5-dioxovalérico e a succinilacetona.

Outra fonte potencial de compostos carbonílicos são os dioxetanos, que são peróxidos cíclicos tetratômicos, cuja homólise produz dois compostos carbonílicos, um deles no estado eletronicamente excitado predominantemente triplete. Por isso, a clivagem térmica de dioxetanos é dita quimiluminescente, embora seja classificada de “ultra-fraca” e portanto detectável apenas em “photon counter” ou com uso de sensibilizadores altamente fluorescentes.

Dioxetanos foram identificados como intermediários de reações de peroxidação lipídica, processos bioluminescentes e reações enzimáticas de vários substratos, catalisadas por hemoproteínas, como citocromo c, hemoglobina e peroxidase de raiz forte (“Fotoquímica sem luz”, segundo E. White e G. Cilento).

Considerando que compostos carbonílicos no estado triplete são suprimidos por colisão com dienos conjugados e o interesse em aplicá-los em sistemas químicos e biológicos, decidimos aprofundar o estudo de sua interação com o sorbato (2,4-hexadienoato) e, para comparação, o 2,4-pentadienoato, visando validar seu uso no estudo de sistemas quimiluminescentes de interesse biológico. Por isso, esta dissertação inicia-se com uma revisão da literatura sobre a fotoquímica de compostos carbonílicos e sua ocorrência e relevância biológicas.

1.1. Fotoquímica de compostos carbonílicos

Dentre os compostos que possuem o grupo carbonila, os mais estudados do ponto de vista fotoquímico, encontram-se as cetonas e os aldeídos, uma vez que absorvem luz no UV próximo, podem ser preparados com inúmeras variações estruturais e sofrem uma grande variedade de reações de utilidade sintética. Os estados eletronicamente excitados de mais baixa energia de aldeídos e cetonas são considerados como π,π^* e n,π^* , sendo o último, geralmente o de menor energia como mostra a figura 1.¹

Figura 1 – Estados eletrônicos de compostos carbonílicos.

Em cetonas e aldeídos alifáticos, a fraca absorção na região de $\lambda_{\text{máx}}$ entre 280 e 300nm representa uma transição $n \rightarrow \pi^*$, na qual um elétron do orbital não ligante do oxigênio é promovido ao orbital anti-ligante, π^* , resultando em um estado excitado que se assemelha a um diradical, tanto por suas propriedades físicas quanto químicas, sofrendo reações equivalentes às de um radical alcóxil, segundo Wagner.²

Tratando-se ainda de compostos alifáticos, pode-se dizer que embora possuam constantes

de cruzamento intersistema altas ($k_{isc} > 10^8 \text{ s}^{-1}$), formando estados triplete com altos rendimentos quânticos, outros processos de desativação como fluorescência e reações químicas, a partir do estado singlete de menor energia, são processos competidores.² Já em sistemas conjugados de cetonas e aldeídos, os coeficientes para o cruzamento intersistemas são apreciavelmente aumentados pela conjugação, e o rendimento quântico deste processo para cetonas e aldeídos arílicos, e ainda para enonas, é igual a 1 ou muito próximo a este valor.²

O estado excitado menos energético para sistemas conjugados, se π, π^* ou n, π^* , dependerá da natureza e da posição dos substituintes no anel ou na dupla ligação e também das características do solvente. Desta forma, substituintes doadores de elétrons, por exemplo, que estejam em conjugação com o grupo carbonílico, estabilizam a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do estado triplete e desestabilizam a transição $n \rightarrow \pi^*$, uma vez que aumentam a densidade eletrônica no grupo carbonílico.^{2, 3}

1.1.1. Processos fotoquímicos e fotofísicos primários de cetonas alquílicas

Todas as foto-reações de compostos carbonílicos alifáticos resultam das reações primárias do estado excitado n, π^* . A figura 2 ilustra algumas vias de desativação da carbonila triplete.⁴

Figura 2 – Modos de desativação da carbonila triplete. TE, transferência de energia; A,ceptor; BH, doador de hidrogênio.

1.1.1.1. Clivagem α

A clivagem α ou processo de Norrish Tipo I, é uma reação unimolecular que produz radicais. Ela ocorre através da quebra da ligação C-C α ao grupo carbonila excitado e geralmente no estado triplete. Os produtos isolados derivados deste processo primário, que diferem de acordo com a estrutura da cetona e das condições da reação, são atribuídos à reação de abstração de hidrogênio do solvente ou por desproporcionamento dos respectivos radicais formados. A descarbonilação do radical acil também pode ocorrer e é intensificada pelo aumento da temperatura ou pelo aumento da estabilidade do radical alquil produzido pela perda de CO.^{2, 5, 6}

1.1.1.2. Abstração de hidrogênio

Acredita-se que a reação de abstração de hidrogênio seja iniciada pelo ataque eletrofílico do orbital n , não ligante, semi-preenchido do oxigênio, no estado excitado n, π^* . Assim, espera-se que a reatividade de um átomo de hidrogênio frente a este processo aumente com (a) o aumento da densidade eletrônica no átomo de hidrogênio a sofrer abstração; (b) diminuição da força de ligação entre o hidrogênio e a cadeia, H-X; e (c) aumento da estabilidade do radical formado $X^\bullet$. Espera-se ainda, que aumente com a diminuição da energia de dissociação da ligação entre o doador e a cadeia.

A abstração de hidrogênio pode ser tanto inter- quanto intramolecular. Sendo intramolecular, a reação de abstração do hidrogênio γ ao grupo carbonílico, com consequente ciclização do diradical formado, ou sua clivagem, é também conhecida como processo de Norrish Tipo II.^{2, 3, 5, 6}

1.1.1.3. Transferência de carga

Todos os estados eletronicamente excitados podem ser oxidados ou reduzidos mais facilmente do que o estado fundamental. Assim, os compostos carbonílicos sofrem reduções unieletrônicas razoavelmente rápidas para formar um ânion radical cetil relativamente estável.

As cetonas excitadas, embora sejam fortes agentes oxidantes, não parecem participar de reações redox mas sim formar complexos de transferência de carga (CT) com quase todos os doadores de elétron. Não há evidências, entretanto, de que estes exciplexes se dissociem de volta à cetona excitada ou emitam fosforescência, mas sim podem sofrer rearranjos químicos e decaimento sem emissão de radiação. Duas classes de reações que aparentemente envolvem estes intermediários são a cicloadição de cetonas triplete à olefinas e sua redução por aminas.^{2, 6}

No caso das interações de cetonas triplete com olefinas, existe uma competição entre os processos de abstração de hidrogênio da olefina gerando seu dímero, simples transferência de

energia para esta (isomerização) e cicloadição à sua dupla ligação formando um oxetano.

A fotoisomerização de olefinas pode-se dar conceitualmente por três mecanismos:

- a) transferência clássica (vertical) da energia de excitação eletrônica da cetona para a olefina, produzindo a olefina eletronicamente excitada, que decai subseqüentemente para ambos os isômeros (*cis* e *trans*);
- b) transferência de energia não clássica da cetona excitada para a olefina, produzindo um estado excitado não espectroscopicamente observável, que decai para a olefina nas formas *cis* e *trans*;
- c) adição da cetona excitada à dupla ligação da olefina produzindo um intermediário instável, semelhante a um 1,4-diradical, que, conseqüentemente decai regenerando a cetona no seu estado fundamental e a olefina tanto na forma inicial quanto na geometricamente isomerizada.⁶

Na realidade, a supressão de cetonas triplete por olefinas envolve a formação de um tipo de complexo que pode entrar em colapso formando um 1,4 - diradical, e a estabilidade deste complexo determinará a estereoseletividade de formação do oxetano. Este complexo parece possuir pequeno caráter de transferência de carga uma vez que há um aumento na constante de supressão (k_q) à medida que se aumenta o número de substituintes sacadores de elétrons, porém quando os substituintes são doadores de elétrons, como o grupo alquila por exemplo, o valor de k_q é aumentado de um fator de aproximadamente 4 e a relação entre $\log k_q$ e IP (potencial de ionização) é linear.^{7, 8}

Essa competição entre transferência de energia e formação do complexo é determinada pela energia de excitação da cetona e pela relativa deficiência de elétrons da cetona triplete n, π^* . A transferência de energia predomina para olefinas deficientes de elétrons para todas as cetonas com energia triplete (E_T) pelo menos tão baixa quanto 68 kcal.mol^{-1} . Já a formação do complexo de transferência de carga predomina para olefinas ricas em elétrons e cetonas com $E_T < 75 \text{ kcal.mol}^{-1}$.⁷

1.2. Dienos conjugados como supressores de cetonas triplete

Para ser um supressor específico ideal para estados triplete, o supressor deve ter sua energia do primeiro estado excitado triplete inferior à energia T_1 do substrato e, além disso, seu estado excitado S_1 deve ser superior ao S_1 do mesmo (figura 3). Isto assegura uma supressão triplete praticamente controlada por difusão, se não houver outros modos de supressão além de transferência de energia. Além disso, o supressor excitado deve ser quimicamente inerte e capaz de dissipar a energia de excitação muito rapidamente.¹

Figura 3 – Diagrama de energia para um supressor triplete ideal.

Os compostos que mais se enquadram neste perfil energético são as olefinas, os dienos conjugados e polienos superiores além dos hidrocarbonetos aromáticos. Inúmeros autores têm utilizado dienos conjugados, que possuem $E_T(T_1)$ igual ou abaixo de 60 kcal.mol^{-1} , como interceptadores de cetonas triplete, que possuem $E_T(T_1)$ de 60 a 80 kcal.mol^{-1} .^{2, 3, 9-15}

O mecanismo de supressão por olefinas pode ser tomado como modelo para dienos conjugados, uma vez que estes também sofrem reações de cicloadição, formação de complexos de transferência de carga e isomerização *cis*, *trans* por transferência de energia.^{9, 13, 16}

1.3. Fontes geradoras de compostos carbonílicos triplete

A geração de um composto carbonílico no estado eletronicamente excitado triplete, por um processo outro que não a excitação ótica, foi conseguida em 1969 por Kopecky e Mumford com a síntese do primeiro 1,2-dioxetano.¹⁷

1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas são anéis peroxídicos de quatro membros, cuja clivagem leva a formação de um dos produtos no estado excitado, o que é decorrente da grande exotermicidade desta reação pela liberação da energia contida na tensão do anel, pela quebra da fraca ligação oxigênio-oxigênio (32 kcal.mol^{-1}) e pela formação de duas ligações (carbonila) muito fortes.¹⁸

Na decomposição térmica de 1,2-dioxetanos e 1,2-dioxetanonas (figura 4), que segue via um mecanismo concertado unimolecular, onde a quebra das ligações oxigênio-oxigênio e carbono-carbono pode ocorrer simultaneamente ou em duas etapas via intermediário diradicalar, observa-se a formação preferencial de estados excitados triplete n, π^* (até 50 % de rendimento quântico) e baixos rendimentos de formação de estados excitados singlete (<1 % de rendimento quântico).^{18, 19}

Figura 4 - Decomposição térmica de 1,2-dioxetanos

Porém, quando o anel peroxídico apresenta substituintes ricos em elétrons, o mecanismo muda para o CIEEL (“chemically initiated electron exchange luminescence”) e altos rendimentos do composto carbonílico no estado singlete são alcançados, como é o caso da dioxetanona

intermediária da luciferina no fenômeno da bioluminescência do vagalume.^{20,21}

Uma outra via de quimiexcitação de compostos carbonílicos é a oxidação enzimática de aldeídos lineares catalisada por hemoproteínas como a “horseradish peroxidase” (HRP),^{22, 23,24} a mieloperoxidase,²⁵ o citocromo c²⁶ e a lipoxigenase de soja.²⁷

A figura 5 mostra o mecanismo de reação para o sistema isobutanal (IBAL)/ HRP/ O₂, que gera acetona no estado triplete. A autooxidação do IBAL gera um perácido que é responsável pela oxidação da HRP (Fe III) ao composto I (Fe V), o qual reage com a forma enólica do IBAL formando o composto II (Fe IV) e um radical de carbono que pela inserção de uma molécula de oxigênio torna-se um radical peroxil. Este radical por sua vez abstrai um hidrogênio da enzima e em seguida cicliza para um intermediário dioxetânico que cliva gerando ácido fórmico e acetona triplete. A enzima é regenerada por abstração de hidrogênio de algum resíduo de carboidrato ou de etanol usado para a solubilização do substrato.

A conhecida reação de Russell entre dois radicais peroxil,²⁸ desde que não sejam terciários, leva também à formação de CCT (<0,01%) ou de oxigênio singlete (10%) em sistemas biológicos (Figura 6).^{29, 30} O desproporcionamento de radicais alcóxil também pode gerar compostos carbonílicos triplete embora com baixa eficiência, como mostra a figura 7.^{20, 31}

Figura 5 – Mecanismo de geração de acetona triplete pelo sistema IBAL/HRP/O₂

Figura 6 – Geração de CCT através da reação de Russell

Figura 7 – Desproporcionamento de radicais alcóxil com formação de CCT

1.4. Ação biológica dos compostos carbonílicos triplete

As espécies triplete, devido à natureza proibitiva da requerida mudança de spin do estado excitado triplete para o estado fundamental singlete, possuem um tempo de vida maior ($\tau > 10^{-8}\text{s}$) quando comparadas às espécies singlete ($\tau < 10^{-8}\text{s}$), estando deste modo mais propensas a participar de eventos bimoleculares, como reações químicas ou processos físicos com biomoléculas, mesmo quando estas últimas estão presentes em baixas concentrações.²⁰

De fato, a quimiluminescência (QL) é um processo que aparece associado ao estresse oxidativo e que pode ser usado como ferramenta analítica para sua identificação.³² Vários

trabalhos mostram que essa luminescência é decorrente da emissão tanto de CCT como de oxigênio singlete gerados durante o processo de peroxidação.^{32, 33, 34} Essa emissão ultra-fraca pode ainda ser monitorada nos mais variados sistemas biológicos ou biomiméticos de peroxidação, que vão desde observação *in vivo* de QL de pele de ratos expostos à radiação UVA³³ e de órgãos como cérebro e fígado, também de ratos, após ingestão aguda de etanol,³⁴ até homogenatos,^{35, 36, 37} microsossomos^{38, 39} e mitocôndrias destes mesmos órgãos submetidos ao estresse, passando por QL de urina humana⁴⁰ e de lipossomos.⁴¹

Entretanto, como se sabe, a emissão de radiação não é a única via de desativação seguida por estas espécies quando em sistemas biológicos. Embora Adam *et al.*⁴² tenham demonstrado que a acetona triplete gerada enzimaticamente a partir de IBAL/HRP seja responsável por apenas uma parte dos danos oxidativos observados em DNA, este mesmo grupo observou que a acetona e a acetofenona tripletes, quando geradas pela decomposição térmica de 1,2-dioxetanos,⁴³ ou irradiadas na presença de DNA,⁴⁴ levam à formação de dímeros de pirimidina, à quebra da fita de DNA e à formação de resíduos de 8-hidroxiguanina. Os mecanismos propostos para tais danos baseiam-se na transferência de energia T-T para o DNA com seu subsequente rearranjo intramolecular, na transferência de energia T-T para o O₂ presente no meio com geração de oxigênio singlete (responsável pela formação dos resíduos de 8-hidroxiguanina) e por último, na oxidação direta de purinas do DNA por transferência de elétron ou por abstração de hidrogênio causada pela espécie carbonílica excitada levando à formação do radical de DNA.⁴⁴

A formação de radical de guanina decorrente da supressão de acetona triplete por DNA e polinucleotídeos, foi também observada por Song *et al.*⁴⁵ Trabalhos mais recentes revelam que as cetonas triplete podem ser divididas em dois grupos quando comparadas em sua atividade fotooxidativa de bases de DNA. Um dos grupos oxida diretamente o substrato por transferência de elétron ou abstração de hidrogênio, enquanto que o outro pode sofrer ainda clivagem α gerando

radicais alquil que em seguida tornam-se peroxil, e que seriam os responsáveis pelos danos observados.^{46,47}

No caso da peroxidação lipídica, as espécies carbonílicas triplete não somente são resultado da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), como também podem atuar como amplificadoras ou iniciadoras desse processo através da abstração de um hidrogênio duplamente alílico do ácido graxo como mostra a figura 8.⁴⁸⁻⁵¹

Figura 8 – Amplificação da cadeia de reações de peroxidação de PUFA por CCT

Esse processo foi demonstrado a partir do consumo de benzofenona triplete e geração de hidroperóxidos de ácido linoléico em diferentes solventes e sistemas micelares, onde foi possível

também observar que o $^1\text{O}_2$, resultante da transferência de energia T-T, é uma outra espécie reativa responsável pela peroxidação.⁵²⁻⁵⁵

Indig *et al.*⁵¹ observaram a indução de peroxidação lipídica em micelas de ácido araquidônico iniciada por acetona triplete, através da formação de dienos conjugados e de TBARS.⁵¹

Foi observado por Nascimento *et al.*^{56,57} que leucócitos polimorfonucleares eram peroxidados quando expostos à fenilacetaldeído e IBAL também por um processo enzimático semelhante ao da HRP, porém catalisado pela mieloperoxidase presente nas células.

A oxidação quimiluminescente de difenilacetaldeído (DPAA) à benzofenona promovida pelos citocromos presentes em mitocôndrias, levou ao colapso do potencial transmembrânico e ao inchamento mitocondrial.⁴⁸ Este mesmo sistema de DPAA/ citocromos também provocou danos oxidativos a fosfolípidos, proteínas e mtDNA.⁵⁰

A perda de atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase causada pela diminuição da fluidez de membrana, perda de resíduos de triptofano e pela formação de bitirosina e malondialdeído (MDA) decorrentes da peroxidação lipídica iniciada por acetona triplete no sistema IBAL/ HRP, foi relatada por Obsil *et al.*^{58,59}

Usando 3-indol acetato como substrato para a HRP em pHs baixos, Duran *et al.*⁶⁰ relatou que a formação de 3-indol aldeído triplete induzia a lipoperoxidação de microsossomos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo desenvolver sondas (dienos conjugados) supressoras específicas de compostos carbonílicos triplete envolvidos em processos como lipoperoxidação, comparar sua eficiência com relação à diferença de cargas e verificar o processo pelo qual ocorre a supressão, se química ou fisicamente. Para tanto utilizou-se o tetrametil-1,2-dioxetano (TMD) e o sistema IBAL/HRP/O₂ como fontes de acetona triplete e, como dienos, o éster etílico (HDE) e o ácido 2,4-hexadienóico (ácido sórbico - HDA) e o éster metílico (PDM) e o ácido 2,4-pentadienóico (PDA).

Estes estudos foram planejados para o par 2,4-hexadienoato/ 2,4-pentadienoato, com o intuito de se verificar se os hidrogênios alílicos do primeiro dieno poderiam ser, indesejavelmente, abstraídos por radicais intermediários de peroxidação de lipídios e proteínas, onde se pretende que a ação supressora do dieno seja atribuível exclusivamente às espécies carbonílicas triplete.

Estruturas dos dienos:

trans, trans-2,4-hexadienoato
(HDA)

trans, trans-2,4-hexadienoato de etila
(HDE)

trans, trans-2,4-pentadienoato
(PDA)

2,4-pentadienoato de metila
(PDM)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em um equipamento UV/Visível da Beckman Instruments (modelo DU 70). Os experimentos de quimiluminescência foram realizados em um contador de fótons Hamamatsu, modelo C-767, acoplado a uma fotomultiplicadora Thorn EMI (9658AM) mantida a -12°C por um refrigerador termoelétrico FACT50 (Thorn EMI Electron Tubes Inc). A aquisição foi realizada através do software MCS32 (Ortec). As medidas de fluorescência foram feitas no Espectrofluorímetro Spex.

Os espectros de EPR foram obtidos em um equipamento Bruker EMX operando à temperatura ambiente.

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento de HPLC da Waters Co., usando-se um detector PDA (modelo 996) e uma bomba (modelo 515), à temperatura ambiente.

Os experimentos de supressão de oxigênio singlete foram realizados em um equipamento para emissão de luz no infra-vermelho desenvolvido pela Edinburg Analytical Instruments composto por um laser Nd:YAG da Continuum (Surelite III) operando em 532 nm, por uma lâmpada de pulso de Xe e acoplado a uma fotomultiplicadora da Hamamatsu (modelo R5509) resfriada a -80°C com nitrogênio líquido. Para selecionar o comprimento de onda usou-se um monocromador da Bentham Instruments (M300) e para receber os dados uma placa de interface F900 e MSA.

Os espectros de massa foram obtidos em um sistema de HPLC da Shimadzu (SPD 10 AVVP) conectado a um injetor automático (SIL-10ADVP), a um detector UV-Visível (SPD 10 AVVP) e a um espectrômetro de massa Quattro II da Micromass trabalhando no modo negativo de ionização por “eletron spray” (ES⁻) e com uma voltagem de cone de 20 V.

3.2. Reagentes

O 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato de sódio (DBAS) foi fornecido pelo Prof^o Dr. Josef Wilhem Baader do IQ-USP e recristalizado de água segundo a literatura.¹² Todos os demais reagentes utilizados são da Sigma, Aldrich, Merck ou Acros, de alta pureza (PA) e foram tratados por métodos descritos na literatura antes de serem utilizados.⁶¹

Todas as soluções tampão e solventes (grau cromatográfico) utilizados nos experimentos de supressão foram tratados com resina Chelex[®] e EDTA, respectivamente, para evitar que ocorresse decomposição escura do dioxetano que é catalisada por íons metálicos como Fe²⁺.^{19, 62} O isobutanol foi destilado, sob nitrogênio usando-se uma coluna Vigreux, antes do uso para evitar a presença do perácido resultante de sua auto-oxidação.⁶³

3.3. Determinação de concentrações

A determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do tetrametil-1,2-dioxetano (TMD) foram realizadas espectrofotometricamente, segundo a literatura,⁶⁴ em $\lambda = 353$ nm com $\epsilon = 2,55 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

As soluções de DBAS foram preparadas dissolvendo-se o sal primeiramente em suficiente quantidade de metanol (10% do volume final da solução) e então avolumadas com água Milli – Q. A concentração das soluções foi determinada espectrofotometricamente em $\lambda = 405$ nm com $\epsilon = 7750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.¹²

A concentração do ácido 2,4-pentadienóico (PDA) foi também determinada espectrofotometricamente em $\lambda = 242$ nm com $\epsilon = 24800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.⁶⁵

A concentração de HRP⁶⁶ foi determinada usando-se $\epsilon = 1,02 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 403 nm. A concentração de citocromo *c* foi determinada através da absorbância do pico Soret em 408 nm⁶⁷ com $\epsilon = 104,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a do azul de metileno⁶⁸ em $\lambda = 660$ nm com $\epsilon = 81,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4. Preparo de microssomos e mitocôndrias de fígado de ratos

Ratos mantidos em jejum durante uma noite foram sacrificados por guilhotinamento. Em seguida retirou-se o fígado que foi lavado com água deionizada e picotado. Homogeneizou-se o tecido em meio contendo sacarose 0,25 M, HEPES 10 mM e EGTA 1mM a 4°C e pH 7,2. A suspensão resultante foi então centrifugada por 10 min a 1000 g e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi filtrado através de gaze e centrifugado novamente por 10 min. a 10.000 g. O sedimento é ressuspensão na mesma solução anterior e centrifugado por mais 10 min à mesma velocidade e o sedimento resultante é agora ressuspensão em um meio contendo sacarose 125 mM, HEPES 10 mM e KCl 65 mM. Para o preparo dos microssomos, segue-se o procedimento acima e ao invés de coletar o sedimento da 2ª centrifugação, coleta-se o sobrenadante ao qual adiciona-se CaCl_2 e procede-se segundo Piergiacomì *et al.*⁶⁹

3.5. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi acompanhado através do decréscimo de turbidez em 520 nm, segundo Nantes *et al.*⁴⁸

3.6. Preparações

3.6.1. Tetrametil-1,2-dioxetano (TMD)

(Cuidado: peróxidos, em especial o peróxido de hidrogênio, devem ser trabalhados em condições de segurança adequados, uma vez que são potencialmente explosivos)

O tetrametil-1,2-dioxetano foi preparado segundo o método de Kopecky¹⁷ a partir do 2,3-dimetil-2-butenos (1), que se processa em três etapas : preparação da solução de H_2O_2 anidro em éter, síntese do β -bromohidroperóxido correspondente ao composto 1 e a sua ciclização com óxido de prata produzindo o dioxetano.

- Preparação da solução de H_2O_2

Quarenta mililitros de solução aquosa de H_2O_2 60% foram extraídos com éter etílico (3 x 30 mL). A fase etérea foi seca sob MgSO_4 em geladeira por aproximadamente 24 h, filtrada e sua concentração estimada em aproximadamente em 7,6 M.

- Síntese do 2-bromo-2,3-dimetil-3-hidroperoxibutano (2)

Uma amostra de 7,47 g do composto **1** foi adicionada a um balão de 50 mL a -20°C , contendo 70 mL de uma solução etérea de H_2O_2 , sendo a temperatura final abaixada para -40°C . Seguiu-se então a adição lenta (~ 1 h) de 12,72 g de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína (DBH) sob constante agitação. Ao término da adição, a solução foi deixada sob agitação até que a temperatura subisse a 0°C , temperatura na qual ficou por mais 1 h em agitação. A solução foi então lavada com soluções saturadas geladas de NaHCO_3 (2x), H_2O (3x) e NaCl (1x). Entre as lavagens, a presença de H_2O_2 foi monitorada através de TLC em diclorometano (DCM) e revelada com solução 10 % de KI. A solução etérea foi seca sob MgSO_4 anidro por 1 noite em geladeira, então filtrada e o solvente evaporado. O BHP foi recristalizado de pentano, dissolvido a temperatura ambiente e cristalizado a -20°C , fornecendo 11,51 g do produto puro ($\eta = 65,7\%$); ^1H -RMN (CDCl_3): um singlete em $\delta = 1,48$ ppm integrando para 6 hidrogênios relativo ao carbono β e um singlete em $\delta = 1,85$ ppm também integrando para 6 hidrogênios relativo ao carbono α ao grupo peróxido.

- Ciclização do BHP com óxido de prata

O óxido de prata foi obtido através da reação estequiométrica do nitrato de prata e de hidróxido de sódio realizada no escuro para evitar a formação de Ag° e geralmente um dia antes de sua utilização. O precipitado de cor marrom escuro foi lavado excessivamente com

água e seco sob vácuo na presença de KOH.

Cerca de um grama de BHP foi dissolvido em 25 mL de DCM e a solução em seguida transferida para um balão de 125 mL em banho de gelo e protegido da luz com papel alumínio. Adicionou-se então 3,28 g de Ag₂O ao balão e deixou-se a solução sob vigorosa agitação magnética por aproximadamente 1 h, a baixa temperatura (0°C). Após esse período, a solução foi filtrada e lavada 2x com água gelada e 1x com solução gelada e saturada de NaCl. A fase orgânica foi então seca sob MgSO₄ anidro por cerca de 10 min em banho de gelo, filtrada e o solvente retirado. O TMD obtido foi então recristalizado de pentano a -30°C rendendo uma massa de 67,0 mg (η = 6,5%) de cristais finos em forma de agulha de coloração amarela. ¹H-RMN (CDCl₃): um singlete em δ = 1,51 ppm equivalente às 4 metilas do composto.

3.6.2. Preparação do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico (PDA)⁷⁰

Cerca de 41 g de piridina foram adicionados a um balão de 250 mL de três bocas sob agitação mecânica e fluxo de argônio. Foram então adicionados 42,79 g de ácido malônico sob agitação vigorosa e durante cerca de 30 min. Após esse período, foram adicionados, por meio de um funil, 25,2 g de acroleína ao longo de 30 min. O desprendimento de CO₂ começa imediatamente após a adição da acroleína e termina aproximadamente 4 horas depois, período este em que a solução fica sob refluxo. Segue-se então a acidificação da mistura com H₂SO₄ 25% em erlenmeyer e banho de gelo. A solução obtida foi então extraída por 4x com 50 mL de DCM, a fase orgânica seca sob MgSO₄ por 10 min e concentrada a aproximadamente 1/3 do seu volume. Após ter sido deixada em freezer a -10°C por mais de 24 h, a solução concentrada forneceu cristais brancos que foram então filtrados e secos em dessecador sob P₂O₅. A massa total de cristais do composto puro obtida foi de 2,85 g (η = 7%). ¹H-RMN (CDCl₃): multipletos de 5,1 – 5,8 ppm relativo aos 2 H do C5, dubleto em δ = 5,9 ppm, J = 15 Hz relativo a 1 H no C2,

múltiplo de 6,2 – 6,8 ppm relativo a 1H no C4, dupla de dubletos em $\delta = 7,4$ ppm relativo a 1H no C3.

3.7. Tentativas de preparo do cloreto de 1,3-butadienil-trimetilamônio

3.7.1. Preparação do etilcarbamato de *trans,trans*-2,4-butadieno (NPDA 1)⁷⁰

A um balão de 50 mL de 3 bocas, equipado com uma barra de agitação magnética, um termômetro e um funil de adição, e sob fluxo de argônio, foram adicionados 1 g de ácido *trans,trans*-2,4-pentadienóico, 1,7 mL de trietilamina e 6 mL de acetona. A solução resultante foi agitada e resfriada a -10°C em banho de gelo seco/etanol, à qual foi adicionada uma solução contendo 1 mL de etilcloroformato em 5 mL de acetona por aproximadamente 30 min. Após o término da adição, a solução foi agitada por mais 30 min em baixa temperatura. Adicionou-se então, por um período de 20 min, uma solução gelada de 1,3 g de azida de sódio em 4 mL de água. A mistura resultante foi agitada por mais um período de 10-15 min a -10°C e diluída em um funil de separação de 250 mL contendo 50 mL de água gelada e a acil azida então extraída com 6 porções de 20 mL de tolueno. A porção de tolueno extraída foi então seca com MgSO_4 anidro por 20 min, filtrada e concentrada a 1/3 do volume. Em outro balão de 125 mL de 3 bocas, equipado com sistema de agitação mecânica, um funil de adição de 10 mL, um sistema de destilação e uma manta de aquecimento, foram adicionados 1,05 mL de álcool etílico, 25 mg de *tert*-butilcatecol e 5 mL de tolueno. A solução contendo a azida de acila foi adicionada, no escuro, ao balão com o tolueno em refluxo por um período de 30 min. Após este período a

solução foi agitada por mais 30 min e então resfriada. O tolueno foi totalmente removido em um rotaevaporador e o resíduo foi cristalizado a partir uma mistura de hexano/éter (2:1). Duas recristalizações foram feitas desta mistura de solventes, resultando em 0,480 g de cristais de coloração amarela ($\eta = 6,8\%$) caracterizados como o produto. ^1H -RMN (CDCl_3): multipletto entre 5,3 e 6,9 ppm relativo aos 3H dos carbonos 1, 2 e 3, um multipletto de 4,5 – 5,1 ppm relativo aos 2H do C4, um quarteto com $J = 7 \text{ Hz}$ em $\delta = 4,13 \text{ ppm}$ relativo aos 2 H do grupo OCH_2 e um triplete com $J = 7 \text{ Hz}$ em $\delta = 1,23 \text{ ppm}$ relativo ao grupo CH_3 .

3.7.2. Preparação do benzilcarbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno (NPDA 2)

O procedimento descrito para o NPDA 1 foi seguido com as seguintes alterações:

- utilizou-se álcool benzílico ao invés do álcool etílico; e
- o resíduo oleoso (1,5 g) foi cristalizado a partir de uma mistura de 1:9 de acetato de etila-hexano fornecendo uma massa de 232 mg de cristais amarelos. ^1H -RMN (CDCl_3): multipletto entre 4,8 e 5,0 ppm relativo a 2 H do C 4, um singletto em 5,2 ppm relativo aos 2 H do grupo $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, um multipletto de 5,4 a 5,8 ppm relativo aos hidrogênios do C 2 e do NH, um multipletto de 6,2 a 6,5 ppm relativo ao hidrogênio do C 3, um dubletto em 6,7 ppm relativo ao H do C 1 e um singletto em 7,3 ppm referente aos hidrogênios do anel aromático.

3.7.3. Tentativa de preparo da *trans, trans*-1,3-butadienamina a partir do etilcarbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno⁷¹

A um balão de 50 mL de fundo redondo foram adicionados 120 mg de NaH em 5 mL de dimetilformamida (DMF) sob N_2 e à temperatura ambiente e mais 0,19 mL de etanotiol em 1 mL

de DMF. Quando a solução estava clara (~15 min), 283 mg de etilcarbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno em 5 mL de DMF foram adicionados rapidamente via seringa. A solução resultante, de coloração avermelhada, ficou sob agitação magnética por 30 min e depois tratada com 100 mL de água gelada. A suspensão leitosa obtida foi então extraída com éter etílico (3 x 100 mL), sendo os extratos etéreos combinados, lavados com água (2 x 50 mL), secos e rotaevaporados fornecendo 279 mg de um sólido amarelo, identificado como o composto de partida.

3.7.4. Tentativa de preparo da *trans, trans*-1,3-butadienamina a partir do benzilcarbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno⁷¹

A um balão de 50 mL de fundo redondo foram adicionados 60 mg de NaH em 5 mL de dimetilformamida (DMF) sob N₂ e à temperatura ambiente e mais 0,1 mL de etanotiol em 1 mL de DMF. Quando a solução estava clara (~15 min), 153 mg de benzilcarbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno em 5 mL de DMF foram adicionados rapidamente via seringa. A solução resultante, de coloração avermelhada, ficou sob agitação magnética por 30 min e depois tratada com 100 mL de água gelada. A suspensão leitosa obtida foi então extraída com éter etílico (3 x 100 mL), sendo os extratos etéreos combinados, lavados com água (2 x 50 mL), secos e rotaevaporados fornecendo 145 mg de um sólido amarelo, identificado como o composto de partida.

3.8. Determinação das constantes de supressão ($k_q\tau$) por diferentes dienos conjugados

3.8.1. Supressão da acetona triplete gerada pela termólise do tetrametil-1,2-dioxetano

A determinação de $k_q\tau$ em meio aquoso para o sorbato (HDA) e para o *trans, trans*-2,4-pentadienoato (PDA) foi realizada em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo 100 μ M de EDTA, usando-se 200 μ M de TMD e 10 μ M de DBAS a 37°C.

A determinação de $k_q\tau$ em meio aquoso para o metanoato de 2,4-pentadienoila (PDM) e para o etanoato de *trans, trans*-2,4-hexadienoila (HDE) foi feita em tampão fosfato 0,01 M pH

7,4 contendo 100 μM de EDTA, usando-se 200 μM de TMD e 10 μM de DBAS a 37°C em um volume final de 6 mL.

As soluções estoque de TMD foram preparadas em acetonitrila, numa concentração de 15 mM. As soluções estoque de HDA e PDA foram feitas em água e a de PDM e de HDE em metanol.

Os experimentos de supressão foram feitos da seguinte maneira: as soluções contendo o supressor, o DBAS e o EDTA eram aquecidas até a temperatura indicada e então o TMD era adicionado através de microseringa. A intensidade de emissão era monitorada como luz total no “photon counter”.

3.8.2. Supressão de acetona triplete gerada pelo sistema IBAL/HRP/O₂

A determinação de $k_q\tau$ para os diferentes dienos foi feita em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo 1 mM de EDTA, 1,7 μM de HRP, 33,8 mM de IBAL e 760 μM de H₂O₂ a 37°C em um volume final de 6 mL.

A solução estoque de IBAL foi feita em etanol (1:5), a de HDA e PDA em água e a de PDM em metanol.

Os experimentos de supressão foram feitos da seguinte maneira: à solução tampão termostatzada, contendo o dieno e o EDTA, era adicionado o IBAL, que ficava sob agitação por cerca de 3 min. Em seguida, juntava-se HRP e a reação era disparada com H₂O₂. Para realização dos cálculos, usou-se a intensidade máxima obtida próximo ao ponto de consumo total de oxigênio.

3.9. Verificação da supressão do DBAS singlete por diferentes dienos conjugados

Como controle, soluções contendo 10 μM de DBAS e dienos em diferentes concentrações à temperatura ambiente, foram excitadas em 310 nm para soluções aquosas e a diferença de intensidade foi acompanhada pelo espectro de emissão do DBAS em solução aquosa traçado de

360 nm a 560 nm.

3.10. Experimentos no EPR

Para se tentar captar o radical possivelmente formado pela abstração do hidrogênio alílico do sorbato ou mesmo decorrente do seu mecanismo de supressão, realizou-se uma série de experimentos com diferentes captadores de spin tais como: 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), α (1-oxo-4-piridil) *N*-tercbutilnitrona (POBN) e 5,5-dimetil-*N*-oxo-1-pirrolina (DMPO), sendo o primeiro um captador tanto de radicais de oxigênio quanto de carbono, e os dois últimos captadores de radicais de oxigênio.⁷²

As soluções estoque dos “spin traps” foram feitas em água, com exceção do MNP (200mM) que foi preparada em acetonitrila.

Os experimentos foram realizados em solução tampão fosfato 100 mM pH 7,4 contendo 20 mM de “spin trap”, 1 mM de TMD e 1 mM de sorbato.

Realizou-se os experimentos incubando-se as soluções contendo a mistura acima descrita por cerca de 1 hora a 80°C. Soluções contendo somente o “spin trap”, o TMD ou o sorbato foram submetidas ao mesmo procedimento para se verificar se existia algum sinal proveniente de uma possível oxidação ocorrida a alta temperatura. Os mesmos experimentos foram realizados também em temperatura ambiente.

3.11. Estudo da interação do sorbato e do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico com a acetona triplete gerada na termólise do tetrametil-1,2-dioxetano

Os experimentos foram realizados usando-se 1 mM de TMD e diversas concentrações dos dienos (50-500 μ M) em água normalmente aerada, sob N₂ e sob O₂, sendo a termólise feita a 80°C por um período de 1,5 h e a 37°C por 4 dias. Para a análise de produtos, foi utilizada uma coluna de fase reversa YMC-ODS-Aq da Waters, 5 μ m, 250 mm X 4,6 mm com uma fase móvel de 7:3 de tampão acetato pH 4,2 4 mM – acetonitrila, com um fluxo de 0,7 mL/min e

monitoradas por absorção em 255 nm. A irradiação dos dienos foi feita em água usando-se uma concentração de 300 μM dos compostos que foram expostos a luz UV de um espectrofluorímetro (250 nm) por três horas.

3.12. Experimentos de supressão de oxigênio singlete por dienos conjugados

Os experimentos foram realizados usando-se 3,7 μM de azul de metileno em solução tampão Pi 50 mM pH 7,4 para um volume final de 1,5 mL numa cubeta de fluorescência. A cubeta era irradiada em 532 nm por um feixe de laser com uma quantidade de 500 pulsos de 4 mJ de energia e a fosforescência do oxigênio singlete observada em 1270 nm, sua emissão monomol.

3.13. Testes de supressão de radicais peroxil por dienos conjugados

Diferentes concentrações dos dienos foram adicionadas a solução tampão Pi 50 mM pH 7,4 contendo 20 μM de citocromo *c* e a reação disparada pela adição de 25 mM de *t*-BuOOH. A cinética da reação foi acompanhada por um período de 6 minutos em 408 nm, região de absorbância do pico Soret do citocromo *c*.

3.14. Testes de supressão de radicais hidroxil por dienos conjugados

Diferentes concentrações de dienos foram adicionadas a solução tampão fosfato 50 mM pH 7,4 contendo desoxiribose 12 mM, H_2O_2 6 mM, Fe^{2+} 800 μM e colocadas sob agitação a 37°C por 30 min. Em seguida adicionou-se 5 μL HCl 50% e aqueceu-se a fervura por 20 min.⁷³ Após esse tempo, alíquotas de 20 μL foram injetadas num sistema de HPLC com uma coluna aminofásica usando-se como fase móvel uma mistura acetonitrila/ tampão Tris 30 mM (1:9) e fluxo de 1 mL/ min onde o enolato do malondialdeído sai com um tempo de 3,7 min e absorve em 267 nm.⁷⁴

3.15. Testes de supressão do ânion-radical superóxido

Diferentes concentrações de dienos foram adicionadas a tampão de 2,2-aminometil-1-propanol 50 mM pH 10,1 na presença de 63 μM de supróxido de potássio, 100U de catalase e 250

uM de azul de nitrotetrazolium (NBT). A cinética de redução do NBT foi acompanhada em espectrofotômetro em 560 nm.⁷⁵

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparações

4.1.1. Tetrametil-1,2-dioxetano

O tetrametil-1,2-dioxetano foi preparado segundo o método clássico de Kopecky,¹⁷ onde bromo eletrofílico é adicionado à dupla ligação do tetrametiletileno em meio a peróxido de hidrogênio e posterior ciclização do respectivo β -bromohidroperóxido formado através da ação de um sal de prata (figura 9).

A síntese do β -bromohidroperóxido foi realizada com rendimento de 65,7%, e a partir deste, a síntese do TMD foi realizada com rendimento o de 12,4%.

Figura 9 – Rota sintética do tetrametil-1,2-dioxetano.

A pureza do composto foi analisada por ^1H -RMN e por iodometria sendo igual a 98%. A determinação espectrofotométrica é essencial para a averiguação da pureza do composto, uma vez que para o TMD, a reação colorimétrica completa-se em ~15 min à temperatura ambiente,

enquanto que para outros peróxidos, a cinética da reação é mais lenta. Estes peróxidos podem ser β -bromohidroperóxido residual ou ainda o hidroperóxido alílico correspondente.

4.1.2. Ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico

A preparação deste composto não estava inicialmente prevista, entretanto, devido à sua saída dos catálogos de comercialização de reagentes, ela se fez necessária.

Pelo método de Overman,⁷⁰ uma base retira o próton do carbono secundário do ácido malônico, formando um carbânion que ataca a carbonila do aldeído conjugado numa reação de Michael seguindo-se uma reação de eliminação e descarboxilação fornecendo o ácido 2,4-pentadienóico como mostra a figura 10. De três vezes em que foi realizada a preparação, o melhor rendimento obtido foi de 20,3%. ¹H-RMN (CDCl₃): 5,1 – 5,8 ppm (m, 2H no C-5), 5,9 ppm (d, J = 15 Hz, 1 H no C-2), 6,2 – 6,8 ppm (m, 1H no C-4), 7,4 ppm (d de d, 1H no C-3).

O ponto de fusão do PDA foi determinado encontrando-se um valor entre 69 – 72°C, que está de acordo com o encontrado na literatura.⁶⁵ Além disso, a análise espectrofotométrica do composto em água em $\lambda = 242\text{nm}$ forneceu uma concentração semelhante à determinada por pesagem.

Figura 10 – Rota sintética do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico.

4.1.3. Benzil e etil carbamato de *trans, trans*-1,3-butadieno

As tentativas de preparação de um carbamato a partir do PDA foram realizadas por uma modificação da degradação de Curtius, segundo Overman, como mostra a figura 11.

Objetivando-se o preparo de um dieno conjugado de carga positiva, optou-se pela produção de um sal de amônio quaternário uma vez que a carga positiva independeria do pH do meio, possibilitando o estudo desta sonda em sistemas biomiméticos de lipoperoxidação. A literatura pesquisada, porém, não contém uma rota de preparação de tal composto, assim a idéia foi chegar à butadienamina para, em seguida, quaternizá-la formando o composto necessário para os estudos. Para tal, utilizou-se um procedimento no qual aminas, que não toleram meio ácido, protegidas por formação de um carbamato com o álcool 9-metanolantraceno são liberadas pelo ataque de uma base forte (tiolato) e posterior hidrólise.⁷¹ Embora tenha-se tentado a preparação de um carbamato a partir de um álcool derivado daquele usado na referência, a tentativa foi infrutífera visto que tal composto se mostrou insolúvel nas condições de reação.

Figura 11 – Rota sintética para *trans, trans*-1-*N*-acilamino-1,3-dienos.

Assim, tentou-se aquele mesmo procedimento mesmo que para um carbamato diferente. Infelizmente o resultado não foi o esperado, pois mesmo mudando-se de etil para benzil carbamato, este ainda possui um mau grupo de partida o que comprometeu o sucesso da reação.

4.2. Experimentos de supressão da acetona triplete gerada pela termólise do tetrametil-1,2-dioxetano

4.2.1. Determinação das constantes de supressão ($k_q\tau$) por dienos conjugados

Para se comparar a eficiência de supressão de acetona triplete gerada por TMD entre os ânions 2,4-hexadienoato (HDA) e o 2,4-pentadienoato (PDA), realizaram-se dois experimentos de supressão em tampão fosfato a 37° monitorados pela emissão do DBAS em $\lambda = 435$ nm. A relação entre I_0/I e concentração do supressor nos dá o valor de $k_q\tau$ segundo a equação de

Stern-Volmer: $I_0/I = 1 + k_q\tau[Q]$. As figuras 12 e 13 mostram estes resultados para o 2,4-hexadienoato e para o 2,4-pentadienoato, respectivamente.

Figura 12 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de acetona triplete gerada na termólise de TMD 200 μM por sorbato em tampão fosfato normalmente aerado a 37°C.

O valor obtido pela inclinação da reta nos fornece K_{SV} que, para a supressão de acetona triplete em meio aquoso com HDA, foi de $4,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, valor bem próximo ao encontrado na literatura¹² que é de $4,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, e para o PDA de $4,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Considerando-se o tempo de vida da acetona triplete em água normalmente aerada $\tau = 1,2 \text{ } \mu\text{s}$,¹² obtêm-se um $k_q = 3,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para HDA e $3,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para PDA, que são valores ligeiramente menores que a constante difusional do meio $k_{dif} = 6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹³

Figura 13 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de acetona triplete gerada na termólise de TMD 200 μ M por PDA em tampão fosfato normalmente aerado a 37°C.

Pela linearidade dos gráficos obtidos para ambos os dienos, pode-se afirmar que na faixa de concentração de supressor utilizada (micromolar), não há supressão de outra espécie excitada, como acetona singlete por exemplo ($\phi^T/\phi^S = 1,0.10^3$ a partir de TMD).¹³

Dentre os dienos propostos para serem estudados, o éster metílico do PDA, a saber PDM ($K_{SV} = 1,7.10^3 \text{ M}^{-1}$), foi o único que apresentou valores de K_{SV} mais baixos (figura 14), para acetona gerada tanto na termólise do TMD quanto pelo sistema enzimático (veja seção 4.3), cerca de 1/3 do valor encontrado para os outros dois dienos, o HDA e o PDA.

Pensando-se ser essa menor eficiência de supressão uma característica dos ésteres de dienos conjugados, fez-se a determinação de K_{SV} para o 2,4-hexadienoato de etila (HDE), entretanto verificou-se que este éster é tão eficiente quanto o ânion sorbato (figura 15) com uma $K_{SV} = 4,1.10^3 \text{ M}^{-1}$. Para se explicar a contento este resultado, é necessário que se determine os

potenciais de ionização dos dienos em água e se verifique a relação entre o $\log k_q$ e o P.I. dos dienos. Esta relação deve ser linear se a supressão ocorrer por formação de um complexo de transferência de carga (CT) como é o caso da supressão de acetona triplete por aminas, alcenos e aromáticos.^{19, 62}

Considerando-se o tempo de vida da acetona triplete em água aerada como $\tau = 2 \mu s$,¹² tem-se os seguintes valores de k_q : $1,4 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ para o PDM e $3,4 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ para o HDE. Não houve necessidade de se corrigir o valor de k_{SV} para supressão de fluorescência em nenhum dos dois casos, pois os dienos não mostraram supressão do DBAS singlete.

Figura 14 - Gráfico de Stern-Volmer em tampão fosfato 10 mM a 37°C para PDM usando-se 200 μM de TMD.

Figura 15 – Gráfico de Stern-Volmer em tampão fosfato 10 mM a 37°C para HDE usando-se 200 μM de TMD.

4.3. Determinação de K_{SV} para a acetona gerada no sistema IBAL/HRP/O₂

Para se estabelecer as condições experimentais usadas na determinação de K_{SV} para a acetona triplete gerada neste sistema, vários experimentos foram realizados mudando-se as concentrações de HRP, IBAL, H₂O₂, EDTA e do tampão, além da ordem de adição e tempo de incubação do IBAL. As condições escolhidas são as que apresentaram um valor de intensidade de emissão alto para o maior tempo de reação.

As figuras 16, 17 e 18 mostram a variação da intensidade de acordo com a concentração do supressor usado. Pode-se observar que há um aumento de intensidade ao longo do tempo de reação chegando-se a um máximo em *ca* 3,5 min após o que ocorre uma queda brusca deste valor. Esse aumento da intensidade ao longo do tempo é explicado pela supressão da acetona triplete pelo O₂ dissolvido no meio, que, conforme é consumido pelo sistema, tem sua ação supressora diminuída^{10,76, 77}. Observa-se ainda que conforme se aumenta a concentração do dieno no sistema, essa mudança de intensidade ao longo do tempo é reduzida, chegando a ficar praticamente constante durante a reação em concentrações de 800 μM de dieno. Isto se atribui

ao fato de que em altas concentrações do dieno, a supressão da acetona triplete pelo O_2 não é mais limitante e, por isso, o seu consumo ao longo da reação não faz com que a intensidade de emissão da acetona aumente.

Figura 16 – Variação temporal da intensidade de emissão do sistema IBAL/HRP/ O_2 em função da concentração de PDA.

Figura 17 – Variação temporal da intensidade do sistema IBAL/HRP/ O_2 em função da concentração de PDM.

Figura 18 – Variação temporal da intensidade de emissão do sistema IBAL/HRP/O₂ em função da concentração de HDA.

As figuras 19, 20 e 21 mostram a relação entre I_0/I e a concentração dos dienos obtidas com os valores de intensidade máxima. Os valores de K_{SV} obtidos são: $4,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o HDA, $6,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o PDA e $1,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ para o PDM.

Figura 19 – Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de acetona triplete gerada no sistema IBAL/HRP/O₂ por sorbato a 37°C.

Figura 20 – Gráfico de Stern–Volmer para a supressão de acetona triplete gerada no sistema IBAL/HRP/O₂ por PDA a 37°C.

Figura 21 – Gráfico de Stern–Volmer para a supressão de acetona triplete gerada no sistema IBAL/HRP/O₂ por PDM a 37°C.

Os valores de k_q para o sistema enzimático não podem ser calculados pois não se sabe

exatamente o tempo de vida da acetona triplete por este gerada. Sabe-se que o valor de τ situa-se entre 2 μs (meio aerado) e 22 μs (meio deaerado) uma vez que a acetona é gerada dentro da enzima e que portanto se encontra protegida, embora não completamente.⁷⁷

Como indica a Tabela I, os valores de K_{SV} obtidos para o sistema químico são próximos aos obtidos para o sistema enzimático. Provavelmente essa similaridade é decorrente do fato que, sendo o tempo de vida da acetona aumentado pela proteção da enzima, o k_q deve ser diminuído devido à barreira imposta pela proteína à entrada do supressor. Veja nos trabalhos de Bechara e Cilento.^{10,24}

Tabela I – Valores de K_{SV} obtidos para a supressão de acetona triplete, gerada química e enzimaticamente, por diferentes dienos em sistema aquoso a 37° C

Dienos	K_{SV} obtida para o sistema IBAL/HRP/O ₂ (M ⁻¹)	K_{SV} obtida pela termólise de TMD (M ⁻¹)
sorbato	4,4.10 ³	4,2.10 ³
2,4-pentadienoato	6,1.10 ³	4,7.10 ³
2,4-hexadienoato de etila	*	4,1.10 ³
2,4-pentadienoato de metila	1,8.10 ³	1,7.10 ³

* experimento não realizado

4.4. Experimentos de EPR

É conhecido o fato de compostos carbonílicos triplete reagirem rapidamente com hidrogênios duplamente alílicos, como é o caso da reação da acetona triplete, gerada pela termólise de TMD, com o ácido araquidônico propagando a reação de lipoperoxidação.⁵¹

Uma vez que o sorbato é utilizado para inibir o processo de inchamento de mitocôndrias induzido por fosfato,⁴⁹ acredita-se que ele aja como um supressor de compostos carbonílicos triplete envolvidos no processo, e que amplificam a lipoperoxidação. Entretanto, não se sabe ao certo, se essa inibição se dá por uma supressão física, ou por uma supressão química com abstração do hidrogênio alílico do sorbato, o que geraria um radical, estabilizado por ressonância, que sofreria inserção de oxigênio e posterior desproporcionamento (figura 22), ou ainda se se dimerizaria.

Para se verificar se havia envolvimento de radicais livres no processo de supressão, seja pelo processo acima descrito, ou pela formação de um intermediário diradicalar envolvido na formação de um oxetano, foram realizados alguns experimentos onde a termólise do TMD foi feita na presença de sorbato e de diferentes captadores de spin. As figuras 23, 24 e 25 mostram os resultados obtidos com MNP, POBN e DMPO, respectivamente.

Na ausência de sorbato:

Na presença de sorbato:

Figura 22 – Possíveis rotas de reação para a supressão de acetona triplete por sorbato.

Figura 23 – Espectros de EPR obtidos, realizados em triplicata, usando-se MNP como captador e após 1 h de incubação a 80°C.

Figura 24 – Espectros de EPR , realizados em triplicata, obtidos usando-se POBN como captador e após 1 h de incubação a 80°C.

Figura 25 - Espectros de EPR , realizados em triplicata, obtidos usando-se DMPO como captador e após 1 h de incubação a 80°C.

Como pode-se observar, nenhum sinal foi obtido, para qualquer dos captadores usados, que possa indicar a formação de um radical na presença do sorbato. O sinal obtido com o DMPO atribui-se ao aduto-radical gerado na oxidação do captador. O mesmo foi feito em relação ao tripleto obtido com o MNP. Já na presença de POBN, observou-se um sexteto, que não se sabe ao certo a origem, uma vez que este sinal continua presente mesmo com o aumento da concentração de sorbato para 20 mM. Entretanto, quando realizado à temperatura ambiente, o sinal desapareceu, indicando que este não é decorrente de qualquer reação entre o TMD e o captador.

Algumas possibilidades de origem do sinal são, um aduto-radical formado pela acetona triplete, embora a intensidade do sinal tenha se mantido constante em concentrações mais altas de sorbato, ou ainda um aduto-radical formado durante a decomposição do dioxetano.

4.5. Estudo da interação do sorbato e do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico com a acetona triplete gerada na termólise do tetrametil-1,2-dioxetano

Os cromatogramas obtidos para as misturas de reação entre o HDA ou o PDA e a acetona

triplete, gerada a partir do TMD, mostraram que a concentração dos produtos de reação aumenta conforme o aumento da concentração dos dienos antes do processo de supressão. Entretanto a concentração de acetona gerada após a termólise não diminui, o que é incoerente com um processo de supressão químico, onde deve haver o consumo deste composto.

Experimentos comparativos de supressão realizados sob nitrogênio e sob oxigênio não mostraram diferença em relação à intensidade dos picos dos produtos, mostrando que estes não são derivados de reações com oxigênio singlete possivelmente gerado durante o processo, mesmo porque, à temperatura de 80°C a concentração de oxigênio dissolvida na água é muito pequena o que torna sua geração improvável. Além disso, experimentos realizados a 37°C não apresentaram nenhum pico adicional, mostrando que mesmo quando da maior probabilidade de formação de O_2^{1*} , este não reage com os dienos.

Uma vez que o perfil cromatográfico e as medidas de concentração dos produtos não foram suficientes para a caracterização de uma supressão química, houve a necessidade de se realizar experimentos de espectroscopia de massa para se identificar os produtos formados a partir da supressão.

Da fragmentação obtida a partir dos picos dos produtos e dos reagentes no espectrômetro de massa, percebe-se que todos apresentam o mesmo íon molecular, $m/z = 97$ para PDA e $m/z = 111$ para HDA (figuras de 26 a 30).

Figura 26 – Espectro de massa obtido a partir do pico com tempo de retenção igual a 9 minutos obtido após supressão de acetona triplete, gerada na termólise de TMD, por ácido *trans, trans*-2,4-hexadienóico (HDA). Fase móvel: 7:3 de tampão 4mM de acetato de amônio, ácido acético pH = 4,2/ acetonitrila.

Figura 27 - Espectro de massa obtido a partir do pico do ácido *trans, trans*-2,4-hexadienóico (HDA) com tempo de retenção igual a 9,8 minutos obtido após supressão de acetona triplete. Fase móvel: 7:3 de tampão 4 mM de acetato de amônio, ácido acético pH = 4,2/ acetonitrila.

A obtenção dos espectros de absorção (figuras 31 e 32) em conjunto com os dados obtidos nos espectros de massa, permite-nos concluir que os produtos de supressão gerados após a termólise do TMD, nada mais são do que isômeros *cis,trans* dos respectivos dienos. A confirmação foi obtida através da irradiação dos dienos e sua análise cromatográfica que mostrou a obtenção de dois picos com tempos de retenção idênticos aos obtidos para o PDA na presença de TMD e três picos com tempos de retenção idênticos aos obtidos para o HDA após a supressão (figuras 33 e 34).

Figura 28 - Espectro de massa obtido a partir do pico com tempo de retenção igual a 10,4 minutos obtido após supressão de acetona triplete, gerada na termólise de TMD, por ácido *trans, trans*-2,4-hexadienóico (HDA). Fase móvel: 7:3 de tampão 4mM de acetato de amônio, ácido acético pH = 4,2/ acetonitrila.

Figura 29 - Espectro de massa obtido a partir do pico do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico (PDA) com tempo de retenção igual a 6,3 minutos obtido após supressão de acetona triplete. Fase móvel: 7:3 de tampão 4 mM de acetato de amônio, ácido acético pH = 4,2/ acetonitrila.

Figura 30 - Espectro de massa obtido a partir do pico com tempo de retenção igual a 6,7 minutos obtido após supressão de acetona triplete, gerada na termólise de TMD, por ácido *trans*, *trans*-2,4-pentadienóico (PDA). Fase móvel: 7:3 de tampão 4mM de acetato de amônio, ácido acético pH = 4,2/ acetonitrila.

Figura 31 - Espectros de absorção obtidos no detector “photodiode array” para o cromatograma do experimento de supressão de acetona triplete gerada na termólise de 1mM de TMD na presença de 300 μ M de HDA. Legenda: azul, pico com $t_{ret} = 9,7$ min; rosa, pico com $t_{ret} = 9,0$ min; verde, pico com $t_{ret} = 10,4$ min.

Figura 32 - Espectros de absorção obtidos no detector “photodiode array” para o cromatograma do experimento de supressão de acetona triplete gerada na termólise de 1mM de TMD na presença de 300 μ M de PDA. Legenda: azul, pico com $t_{ret} = 6,7$ min; vermelho, pico com $t_{ret} = 6,2$ min.

Figura 33 – Cromatograma obtido para uma solução aquosa de 300 μ M do ácido *trans, trans*-2,4-hexadienóico irradiada a 250 nm por 3 horas. O gráfico inserido mostra os espectros de absorção obtidos para os respectivos picos obtidos. Legenda: azul, pico com $t_{\text{ret}} = 9,7$ min; verde, pico com $t_{\text{ret}} = 10,4$ min; rosa, $t_{\text{ret}} = 9,0$ min.

Embora a literatura ^{7, 9, 77} aponte para reações de cicloadição, com formação de oxetanos, entre compostos carbonílicos triplete e dienos conjugados, este processo ocorre somente quando o nível de energia triplete dos primeiros é mais baixo do que o respectivo nível dos dienos, ou quando estes são aproximadamente iguais⁷⁸. É o que acontece por exemplo entre a benzofenona ($E_T = 69$ kcal/mol) e o 2,3-dimetil-1,3-butadieno ($E_T = 60,5$ kcal/mol) onde a cicloadição compete com a supressão controlada por difusão.⁹

Mesmo sabendo-se que a energia do nível triplete π, π^* dos compostos carbonílicos

diminui em solventes de alta polaridade como a água,⁷⁹ esta ainda deve ser bem mais alta na acetona do que a dos dienos utilizados, o que os leva a agirem somente como supressores físicos de energia (acetona $E_T = 78$ kcal/mol e dienos conjugados E_T de 54 a 60 kcal/mol).

Figura 34 - Cromatograma obtido para uma solução aquosa de 300 μ M do ácido *trans, trans*-2,4-pentadienóico irradiada a 250 nm por 3 horas. O gráfico inserido mostra os espectros de absorção obtidos para os respectivos picos obtidos. Legenda: azul, pico com $t_{ret} = 6,7$ min; rosa, pico com $t_{ret} = 6,2$ min.

4.6. Experimentos de supressão de oxigênio singlete por dienos conjugados

Pelos gráficos da cinética de supressão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ obtidos pela transferência de energia do azul de metileno irradiado para o O_2 triplete (figuras 35 a 38), observamos que para nenhum dos dienos estudados há supressão física ou química observável para as concentrações utilizadas no ensaio.

Embora seja conhecido o fato de dienos conjugados sofrerem vários tipos de reação com oxigênio singlete,⁸⁰⁻⁸⁵ estas parecem não ocorrer com os dienos em questão. Primeiro porque a reação de cicloadição (4+2) tipo Diels-Alder só ocorre com isômeros *cis* e os utilizados são todos *trans*.⁸⁰ Em segundo lugar, a reatividade deles é baixa quanto a reação de Schenck (tipo ene), como observado por diferentes grupos,^{82, 83} para derivados do sorbato. Tanto em tetracloreto de carbono, onde o $^1\text{O}_2$ possui o maior tempo de vida (700 μs),⁸⁶ quanto em solventes polares como metanol, onde a quantidade de “ene” produtos é maior para dienos conjugados,⁸⁵ não foi observada a formação de hidroperóxidos oriundos deste tipo de reação para o *cis*, *cis*- 5-metil-2,4-hexadienoato de etila e para o *cis*, *cis*-2,4-hexadienoato de etila,⁸⁷ o que nos leva a crer que o sorbato também não sofre este tipo de reação.

Quanto à supressão física, sabe-se que polienos são efetivos supressores de $^1\text{O}_2$ e que quanto maior o número de duplas ligações conjugadas, maior sua eficiência, como é o caso do licopeno com 13 duplas e K_{SV} de $1,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em clorofórmio, o que revela um componente estático na supressão.⁸⁸ Entretanto, para dienos conjugados estas constantes são da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em tetracloreto de carbono,⁸³ portanto muito lentas em comparação com as constantes de supressão de compostos carbonílicos triplete em água que são de ordem tipicamente difusional ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Sendo assim, sua importância em sistemas biológicos é muito pequena quando considerada a presença de ambas as espécies no estado excitado.

Figura 35 – Curva de decaimento obtida para a emissão monomol de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm usando como sensibilizador o azul de metileno em tampão Pi 50 mM pH 7,4 e na presença de HDA a 37°C.

Figura 36 - Curva de decaimento obtida para a emissão monomol de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm usando como sensibilizador o azul de metileno em tampão Pi 50 mM pH 7,4 e na presença de PDM a 37°C.

Figura 37 - Curva de decaimento obtida para a emissão monomol de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm usando como sensibilizador o azul de metileno em tampão Pi 50 mM pH 7,4 e na presença de PDA a 37°C.

Figura 38 - Curva de decaimento obtida para a emissão monomol de $^1\text{O}_2$ em 1270 nm usando como sensibilizador o azul de metileno em tampão Pi 50 mM pH 7,4 e na presença de HDE a 37°C.

4.7. Testes de supressão de radicais peroxil por dienos conjugados

Para se verificar a reatividade dos dienos frente a radicais alquilperoxil, intermediários de peroxidação de biomoléculas, utilizou-se como modelo o dano causado por estes ao grupo heme do citocromo *c* que o leva a perder sua absorção na região da banda Soret, processo este chamado de “bleaching” e cujo mecanismo é parecido com o induzido por peroxidases.

As figuras de 39 a 42 mostram o resultado obtido para o PDA, HDE, HDA e PDM respectivamente. Pode-se observar que, em nenhum caso, houve alteração significativa na cinética da reação, como é observado por exemplo para o ascorbato, que aumenta linearmente com sua concentração o tempo de meia-vida do citocromo, ou ainda para bioflavonóides como a quercetina, que agem como mediadores redox entre o citocromo *c* e o ascorbato em lipossomos.⁶⁶

Figura 39 – “Bleaching” do citocromo *c* em tampão Pi 50 mM pH 7,4 monitorado em 408 nm na presença de PDA.

Figura 40 - "Bleaching" do citocromo *c* em tampão Pi 50 mM pH 7,4 monitorado em 408 nm na presença de HDE.

Figura 41 - "Bleaching" do citocromo *c* em tampão Pi 50 mM pH 7,4 monitorado em 408 nm na presença de HDA.

Figura 42 – “Bleaching” do citocromo *c* em tampão Pi 50 mM pH 7,4 monitorado em 408 nm na presença de PDM.

Concluindo, nenhum dos dienos testados possui atividade antioxidante frente a radicais peroxil e nem é capaz de reduzir o citocromo por estes danificado.

4.8. Análise de supressão de radical hidroxil pelos dienos

A tabela II mostra o resultado da integração dos picos de MDA gerado a partir da oxidação de desoxirribose por $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$. Pode-se observar que para nenhum dos dienos testado houve diminuição do produto de oxidação do açúcar, o que permite inferir que nenhum deles tem potencialidade para atuar como antioxidante frente a lesões em biomoléculas causadas por radicais hidroxil.

Tabela II – Variação da formação de MDA a partir de desoxirribose na presença de diferentes concentrações de dienos

[Dieno]	Áreas do pico de malondialdeído (10^8)			
	PDA	HDA	PDM	HDE
0	1.29	1.29	1.29	1.29
200 μ M	1.33	1.26	1.32	1.23
500 μ M	1.29	1.35	1.29	1.29
1 mM	1.29	1.30	1.29	1.30
5 mM	1.26	1.30	1.25	1.28

4.9. Análise de supressão do ânion-radical superóxido pelos dienos

A tabela III mostra o resultado obtido para supressão de superóxido resultante da decomposição de K_2O e monitorado pela redução de azul de nitrotetrazolium (NBT) em 560 nm.

Como pode-se observar, nenhum dieno reage com o ânion-radical superóxido inibindo o processo de redução do NBT, o que era esperado uma vez que não foi observada reação destes dienos com nenhum outro radical testado, apesar de serem mais reativos do que o superóxido, e de a literatura não indicar supressão deste por dienos.

Tabela III - Efeito da adição de diferentes dienos conjugados na redução de NBT pelo ânion-radical superóxido gerado na decomposição de K_2O em pH 10,1 e monitorado pela absorção em 560 nm após 5 min de reação

	sem adição de dienos	5 mM HDE	5 mM HDA	5 mM PDM	5 mM PDA
Máximo de abs. em 560 nm	0,632	0,639	0,625	0,613	0,615

O conjunto de resultados de supressão de radicais livres por dienos, mostra que é possível seu uso em sistemas nos quais estas espécies estão presentes, contudo sem que suas cinéticas de

reação sejam alteradas.

4.10. Experimentos de inchamento de mitocôndria por DPAA

A figura 44 mostra o resultado de um experimento dose-efeito realizado para um sistema modelo de inchamento mitocondrial promovido pela adição de difenilacetaldeído (DPAA) a um meio contendo mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

Figura 44 - Efeito de diferentes concentrações de 2,4-hexadienoato de etila (HDE), incubado por 10 min, sobre o inchamento mitocondrial decorrente da adição de difenilacetaldeído ao meio de reação contendo mitocôndrias (0,5 mg proteína/ mL), fosfato de potássio 10 mM, KCl 65 mM, sacarose 125 mM e tampão HEPES 10 mM pH 7,2 a 37°C.

Propõe-se, com base em estudos anteriores de Nantes *et al*,⁴⁸ que a benzofenona triplete é a espécie responsável pelo dano observado. Ela é gerada pela oxidação aeróbica de difenilacetaldeído (DPAA) catalisada pelos citocromos, por um mecanismo que envolve a formação de um intermediário dioxetânico, tal como o do sistema IBAL/ HRP anteriormente citado.

Uma vez formada, a benzofenona triplete deve desencadear um processo de peroxidação lipídica que leva ao colapso do potencial transmembrânico e ao inchamento da mitocôndria, fato este que foi inibido pela presença do HDE em diferentes concentrações. Uma vez que a benzofenona triplete tem uma energia de 69 kcal.mol^{-1} e os dienos conjugados uma energia triplete abaixo de 60 kcal.mol^{-1} , espera-se que esta supressão seja exotérmica e assim, que o

processo responsável pela inibição do inchamento mitocondrial seja a supressão da benzofenona triplete pelo HDE. Já que o éster HDE não possui carga e é consideravelmente hidrofóbico, ele consegue penetrar a membrana externa da mitocôndria e chegar ao local de formação da benzofenona antes que ela comece a atacar a organela.

Embora sejam apenas resultados preliminares, não se observou inibição do inchamento para os demais dienos (dados não mostrados). De fato era esperado que para o HDA e o PDA realmente não houvesse supressão, uma vez que, devido às suas cargas negativas, estariam impedidos de permear a membrana mitocondrial assim como acontece quando em micelas de SDS.⁸⁹ Já para o PDM, talvez devido à sua menor eficiência de supressão, observada para a acetona triplete, ou pela ausência de dois grupos metila, o que diminui a sua hidrofobicidade, ele não inibiu o processo de inchamento.

Um experimento realizado com o mesmo sistema (citocromo *c*/ DPAA) em lipossomos de PC/PE/CL mostrou que todos os dienos suprimem a emissão de luz e que portanto, o fator limitante para a inibição do inchamento é realmente o acesso ao espaço intermembranas da mitocôndria (não mostrado).

Outros experimentos comparando o efeito de outros compostos inibidores de dano oxidativo associável a inchamento mitocondrial – *tert*-butiltolueno (BHT), um inibidor de cadeia de lipoperoxidação, e azida, um supressor de oxigênio singlete - foram realizados e o resultado é mostrado na figura 45.

É interessante observar que embora a literatura⁴⁸ relate uma emissão do sistema citocromo *c*/ DPAA em 630-640 nm, atribuída ao oxigênio singlete gerado por transferência de energia a partir da benzofenona triplete, a adição de azida, um conhecido supressor de $^1\text{O}_2$, não surtiu nenhum efeito sobre o inchamento, reafirmando que a iniciação do processo de peroxidação deve ser causada diretamente pela benzofenona.

Figura 45 - Efeito de BHT e azida sobre o inchamento mitocondrial decorrente da adição de difenilacetaldéido (DPAA) ao meio de reação contendo mitocôndrias (0,5 mg proteína/ mL), fosfato de potássio 10 mM, KCl 65 mM, sacarose 125 mM e tampão HEPES 10 mM pH 7,2 a 37°C.

Já a adição de BHT, um poderoso antioxidante, reduz consideravelmente o inchamento provavelmente pela supressão de radicais livres, uma vez que o BHT não diminui a intensidade de emissão nem o consumo de oxigênio do sistema.⁴⁸ A adição de 1 mM de HDE inibe completamente o inchamento.

4.11. Experimentos de supressão de quimiluminescência de microsossomos

Outro sistema modelo usado para testar a eficiência dos dienos como supressores, foi a indução de peroxidação lipídica de microsossomos isolados de fígado de rato por radical hidroxil e o acompanhamento da emissão de luz pelo sistema. Como pode ser observado na figura 46, o HDE novamente mostra ser eficiente na supressão da emissão de espécies carbonílicas triplete envolvidas no processo de peroxidação provavelmente devido à sua maior difusão através das membranas, o que não foi observado para o HDA (dado não mostrado).

Figura 46 – Efeito da adição de HDE sobre a quimiluminescência de microssomos de fígado disparada com Fe²⁺/ ascorbato

Para assegurar o efeito inibidor dos dienos sobre processos peroxidativos iniciados ou propagados por CCT, é necessária a realização de outros experimentos que demonstrem de maneira quantitativa a diminuição da produção de MDA, por exemplo, durante o processo. Tentativas de dosagem de MDA foram feitas, entretanto não se conseguiu padronizar um método de análise na presença dos dienos.

5. CONCLUSÕES

1. Os dienos conjugados estudados neste projeto (HDA, PDA, HDE e PDM) mostram-se eficientes supressores de acetona triplete, gerada tanto pela termólise do TMD quanto pelo sistema IBAL/ HRP/ O₂, com constantes de supressão praticamente de ordem difusional ($10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) em meio aquoso.

2. A supressão ocorre por um processo físico de transferência de energia que leva à produção apenas de isômeros geométricos (*cis,trans*), sem ocorrer abstração de hidrogênio, dimerização ou formação de oxetanos.

3. Nenhum dos dienos possui atividade antioxidante frente a radicais peroxil, hidroxil e superóxido, nem suprime oxigênio singlete. Isto demonstra que qualquer efeito que estes dienos possam causar na cadeia de peroxidação lipídica não pode ser atribuído à interceptação dos radicais envolvidos no processo.

4. Resultados preliminares mostram que o *trans, trans*-2,4-hexadienoato de etila (HDE) inibe o inchamento mitocondrial induzido por benzofenona triplete, provavelmente por ter acesso ao ambiente de formação deste composto e por suprimir sua energia.

5. HDE também inibe a quimiluminescência associada à peroxidação de microsossomos induzida por Fe²⁺/ascorbato, onde se sabe estarem envolvidos, além de radicais, compostos carbonílicos triplete.

Diante do acima exposto conclui-se que dienos conjugados podem ser usados em sistemas biomiméticos de peroxidação lipídica como supressores de compostos carbonílicos triplete sem interferir na sua cinética de oxidação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Lamola, A. A. e Turro, N. J. (1969) Energy transfer and organic photochemistry. In *Technique of Organic Chemistry* (Leermakers, P. A., and Weissberger Eds.), pp 96-104, 191-224, Wiley-Interscience, New York.
- ² Wagner, P. J., (1976) Chemistry of excited triplet organic carbonyl compounds. *Top. Curr. Chem.* **66**, 1-52.
- ³ Dalton, J. C. e Turro, N. J. (1970) Photoreactivity of n, π^* excited states of alkyl ketones. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **21**, 499-560.
- ⁴ Bechara, E. J. H., Medeiros, M. H. G., Catalani, L. H., Soares, C. H. L., Monteiro, H. P., Abdalla, D. S. P., Cristoff, M., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Nantes, I. L., Costa, C. A., Rocha, M. E. M., Di Mascio, P., Wendel, C. M. A., Onuki, J., Penatti, C. A. A., e Pinto, A. P. (1995) Enolizable carbonyl and imino metabolites may act as endogenous sources of reactive oxygen species. *Ci. Cult.* **47**, 346-362.
- ⁵ Turro, N. J., Dalton, J. C., Dawes, K., Farrington, G., Hautala, R., Morton, D., Niemczyk, M. e Schore, N. (1972) Molecular photochemistry of alkanones in solution: α -cleavage, hydrogen abstraction, cycloaddition, and sensitization reactions. *Acc. Chem. Res.* **5**, 92-101.
- ⁶ Gilbert, A. e Baggott, J. (1991) *Essentials of Molecular Photochemistry*. pp 287-352, Blackwell Scientific Publications, Boston.
- ⁷ Kochevar, I. e Wagner, P. J. (1971) Quenching of triplet phenyl ketones by olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3859-3865.
- ⁸ Loutfy, R. O., Yip, R. W. e Dogra, S. K. (1977) The triplet state of ketones in solution: quenching of triplet acetone by olefins. *Tetrahedron Lett.* **33**, 2843-2846.
- ⁹ Barltrop, J. A. e Carless, H. A. J., (1970) The photocycloaddition of benzophenone to conjugated dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 4794-4801.
- ¹⁰ Bechara, E. J. H., Oliveira, O. M. M. F., Durán, N., Baptista, R. C. e Cilento, G. (1979) Peroxidase catalyzed generation of triplet acetone. *Photochem. Photobiol.* **30**, 101-110.
- ¹¹ Bechara, E. J. H. (1979) *Efeitos de Substituintes Alquílicos nas Propriedades de Dioxetanos*. Tese de livre docência. IQ-USP. São Paulo.
- ¹² Catalani, L. H., Wilson, T. e Bechara, E. J. H. (1987) Two water soluble fluorescence probes for chemiexcitation studies: sodium 9,10-diphenylanthracene-2- sulfonate. Synthesis,

properties and application to triplet acetone and tetramethyldioxetane. *Photochem. Photobiol.* **45**, 273-281.

¹³ Catalani, L. H. (1984) *Contribuição ao Estudo de Dioxetanos e de Seu Envolvimento em Fotobioquímica no Escuro*. Tese de Doutorado. IQ-USP. São Paulo.

¹⁴ Hammond, G. S., Leermakers, P. A. e Turro, N. J. (1961) Photosensitized *cis-trans* isomerization of the perylenes. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2396-2397.

¹⁵ Hammond, G. S., Turro, N. J. e Leermakers, P. A., (1962) Energy transfer from the triplet states of aldehydes and ketones to unsaturated compounds. *J. Phys. Chem.* **66**, 1144-1147.

¹⁶ Turro, N. J. e Tanimoto, Y. (1980) Quenching of acetone triplets by 1,3-dienes in fluid solution. *J. Photochem.* **14**, 199-203.

¹⁷ Kopecky, K. R. e Mumford, C. (1969) Luminescence in thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane. *Can. J. Chem.* **47**, 709

¹⁸ Schuster, G. B. e Schmidt, S. P. (1982) Chemi-luminescence of organic compounds. *Adv. Phys. Org. Chem.* **18**, 187

¹⁹ Wilson, T. (1976) Chemiluminescence in the liquid phase: thermal cleavage of dioxetanes. In *Chemical Kinetics*. pp 265-319, D.R. Herschback, London.

²⁰ Cilento, G. e Adam, W. (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 103-114.

²¹ Cilento, G., Baptista, R.C. e Brunetti, I.L. (1994) Triplet carbonyls: from photophysics to biochemistry. *J. Mol. Structure* **324**

²² Baader, W. J., Bohne, C. , Cilento, G. e Dunford, H.B. (1985) Peroxidase-catalyzed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* **260**, 10217-10225.

²³ Knudsen, F.S., Campa, A. Stefani, H.A. e Cilento, G. (1993) Peroxidases as promoters of photobiochemistry without light. In *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Eds. Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, L. e Greppin, H., pp 125-130, University of Geneva..

²⁴ Cilento, G. (1995) Enzymatic generation of electronically excited triplet species: Photobiochemistry without light. *Ci. Cult.* **47**, 312-319.

²⁵ Cilento, G. e Nascimento, A.L.T.O. (1993) Generation of electronically excited triplet species at the cellular level: A potential source of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* **67**, 17-28.

- ²⁶ Nantes, I. L., Alario, A.F., Vercesi, A.E., Santos, K.E. e Bechara, E. J. H. (1998) Liposome effect on the cytochrome *c*-catalyzed peroxidation of carbonyl substrates to triplet species. *Free. Radic. Biol. Med.* **25**, 546-553
- ²⁷ Schulte-Herbrüggen, T. e Sies H. (1989) The peroxidase/ oxidase activity of soybean lipoxygenase – I. Triplet excited carbonyls from the reaction with isobutanal and the effect of glutathione. *Photochem. Photobiol.* **49**, 697-704.
- ²⁸ 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**, 3871-3877.
- ²⁹ Niu, Q. e Mendenhall, D. (1990) Structural effects on the yields of singlet molecular oxygen ($^1\Delta_g\text{O}_2$) from alkyl peroxy radical recombination. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1656-1657.
- ³⁰ Miyamoto, S., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G. e Di Mascio, P. (2003) Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by Russell mechanism: Studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6172-6179.
- ³¹ De La Fuente, U. e Lissi, G.E.A. (1992) Excited carbonyl formation in the combination and disproportionation of free radicals. *J. Biolumin. Chemilumin.* **7**, 27-35.
- ³² Boveris, A., Cadenas, E. e Chance, B. (1981) Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed. Proc.* **40**, 195 - 198.
- ³³ Evelson, P., Ordóñez C. P., Llesuy, S. e Boveris, A. (1997) Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **38**, 215-219.
- ³⁴ Boveris, A. et al. (1997) In situ rat brain and liver spontaneous chemiluminescence after acute ethanol intake. *Toxicol. Lett.* **93**, 23-28.
- ³⁵ Videla, L. A., Ferrer, V. e Lissi, E. A. (1997) Effect of aliphatic aldehydes on the lipid peroxidation and chemiluminescence of biological systems under oxidative stress. *J. Biolumin. Chemilumin.* **12**, 141-148
- ³⁶ Miura, T., Muraoka, S. e Fujimoto, Y. (1998) Temperature-dependent lipid peroxidation of rat brain homogenate. *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.* **100**, 117-128.
- ³⁷ Azorin, I. et al. (1995) Effect of *tert*-butyl hydroperoxide addition on spontaneous chemiluminescence in brain. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 795-803.

- ³⁸ Gavazza, M. e Catalá, A. (2003) Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe²⁺ peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 359-366.
- ³⁹ Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R. e Leighton, F. (2002) Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem. Biol. Int.* **140**, 109-119.
- ⁴⁰ Pizarro, M., Lissi, E. A., Marshall, G., San Martin, S. e Leighton, F. (2001) Spontaneous urinary chemiluminescence and diet. An intervention study in humans. *Lumin.* **16**, 321-325.
- ⁴¹ Sharov, V. S. , Driomina, E. S. e Vladimirov, Y. A. (1996) Two responsible for chemiluminescence development in the course of iron-mediated lipid peroxidation. *J. Biolumin. Chemilumin.* **11**, 91-98.
- ⁴² Adam, W., Kurz, A. e Möller, C. R. S. (1999) DNA and 2'-deoxyguanosine damage in the horseradish-peroxidase-catalyzes autoxidation of aldehydes: The search for the oxidizing species. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 566-579.
- ⁴³ Epe, B., Müller, E., Adam, W. e Saha-Möller, C. R. (1992) Photochemical DNA modifications induced by 1,2-dioxetanes. *Chem.-Biol. Interact.* **85**, 265-281.
- ⁴⁴ Epe, B., Henzl, H., Adam, W. e Saha-Möller, C. R. (1993) Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucl. Ac. Res.* **21**, 863-869.
- ⁴⁵ Song, Q. H., Yao, S. D. e Lin, N. Y. (1997) Laser-induced modification of DNA and Poly[A, G] at guanine moiety using acetone as photosensitizer. *J. Photochem. Photobiol. B*, **40**, 199-203.
- ⁴⁶ Adam, W., Andler, S., Nau, W. M. e Saha-Möller, C. R. (1998) Oxidative DNA damage by radicals generated in the thermolysis of hydroxymethyl-substituted 1,2-dioxetanes through the α cleavage of chemiexcited ketones. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3549-3559.
- ⁴⁷ Adam, W., Arnold, M. A., Nau, W. M., Pischel, V. e Saha-Möller, C. R. (2002) A comparative photomechanistic study (spin trapping, EPR spectroscopy, transient kinetics, photoproducts) of nucleoside oxidation (dG and 8-oxodG) by triplet-excited acetophenones and by the radicals generated from α -oxy-substituted derivatives through Norrish-type I cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3893-3904.

- ⁴⁸ Nantes, I. L., Cilento, G., Bechara, E.J.H. e 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.
- ⁴⁹ Kowaltowski, A. J., Castilho, R. F., Grijalba, M. T., Bechara, E.J.H. e 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.
- ⁵⁰ Almeida, A. M., Bechara, E. J. H., Vercesi, A. E. 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.
- ⁵¹ Indig, G. L., Campa, A., Bechara, E. J. H. e Cilento, G. (1988) Conjugated diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem. Photobiol.* **48**, 719-723.
- ⁵² Barclay, L. R. C., Baskin, K. A., Locke, S. J. e Schaefer, T. D. (1987) Benzophenone-photosensitized autoxidation of linoleate in solution and sodium dodecyl sulfate micelles. *Can. J. Chem.* **65**, 2529-2540.
- ⁵³ Markovic, D. Z. e Patterson, L. K. (1989) Radical processes in lipids. Selectivity of hydrogen abstraction from lipids by benzophenone triplet. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 531-535.
- ⁵⁴ Markovic, D. Z. e Patterson, L. K. (1990) Hydrogen abstraction from lipids by triplet states of derivatized benzophenone photosensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **51**, 389-394.
- ⁵⁵ Markovic, D. Z. e Patterson, L. K. (1993) Benzophenone-sensitized lipid peroxidation in linoleate micelles. *Photochem. Photobiol.* **58**, 329-334.
- ⁵⁶ Nascimento, A. L. T. O., Fonseca, L. M., Brunetti, I. L. e Cilento, G. (1986) Intracellular generation of electronically excited states. Polymorphonuclear leukocytes challenged with a precursor of triplet acetone. *Biochim. Biophys. Acta* **881**, 337-342.
- ⁵⁷ Nascimento, A. L. T. O. e Cilento, G. (1987) Generation of electronically excited states in situ. Polymorphonuclear leukocytes treated with phenylacetaldehyde. *Photochem. Photobiol.* **46**, 137-141.
- ⁵⁸ Obsil, T., Amler, E., Kotyk, A. e Pavlicek, Z. (1995) Enzymically generated electron-excited species increase the membrane order parameter without changing the rotational relaxation time of TMA-DPH. *Gen. Physiol. Biophys.* **14**, 393-403.

- ⁵⁹ Obsil, T., Amler, E. e Pavlicek, Z. (1996) Effect of enzymically generated electronic-excited species on membrane-bound Na⁺,K⁺-ATPase. *Collt. Czech. Chem. Commun.*, **61**, 160-170.
- ⁶⁰ Duran, N., Campa, A., Leite, L. C. C., Cilento, G. e Cadenas, E. (1986) Microsomal lipid peroxidation concomitant to peroxidase-catalyzed aerobic oxidation of indole-3-acetate. *Photochem. Photobiol.*, **11**, 281-292.
- ⁶¹ Armarego, W. L. F. e Perrin, D. D. (1998) Purification of laboratory chemicals. Butterworth Hernemann.
- ⁶² Wilson, T., Landis, M. E., Baumstark, A. L. e Bartlett, P. D. "Solvent effects" on the chemiluminescent decomposition of tetramethyl-1,2-dioxetane. Competitive dark pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 4765-4766.
- ⁶³ Cotton, M. L. e Dunford, H. B. (1973) Studies on horseradish peroxidase XI on the nature of compounds I and II as determined from the kinetics of the oxidation of ferrocyanide. *Can. J. Chem.* **51**, 582-587.
- ⁶⁴ Jones, E. R. H., Whitham, G. H. e Whiting, M. C. (1954) Prototropic rearrangements of acetylenic acids. *J. Chem. Soc.* **28**, 3201-3207.
- ⁶⁵ Ohlsson, P. I. e Paul, K. G. (1976) Molar absorptivity of horseradish peroxidase. *Acta Chem. Scand.* **B30**, 373-375.
- ⁶⁶ Bandy, B. e Bechara, E. J. H. (2001) Bioflavonoid rescue of ascorbate at a membrane interface. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 269-277.
- ⁶⁷ Junqueira, H. C., Severino, D., Dias, L. G., Gugliotti, M. S. e Baptista, M. S. (2002) Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **4**, 2320-2328.
- ⁶⁸ Piergiacomini, V. A., Palacios, A. e Catalá, A. (2001) Comparative studies on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria obtained from different rat tissues: effect of retinyl palmitate. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **64**, 75-80.
- ⁶⁹ Overman, L. E., Taylor, G. F., Petty, C. B. e Jessup, P. J. (1978) *trans*-1-*N*-Acylamino-1,3-dienes: preparation from dienoic acids. *J. Org. Chem.* **43**, 2164-2167.
- ⁷⁰ Erhardt, P. W. (1979) Curtius conversion of acids to amines under neutral conditions via an anthrylmethyl carbamate. *J. Org. Chem.* **44**, 883-884.

- ⁷¹ Rosen, G. M., Britigan, B. E., Halpern, H. J. e Pou, S. (1999) Spin Trapping free radicals. In *Free Radicals Biology and Detection by Spin Trapping*. pp 170-179, Oxford University Press, New York.
- ⁷² Lopes, G. K. B., Schulman, H. M. e Hermes-Lima, M. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim. Biophys. Acta* **1472**, 142-152.
- ⁷³ Esterbauer, H. e Cheeseman, K. H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Meth. Enz.* **186**, 407-421.
- ⁷⁴ Marklund, S. (1976) Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **251**, 7504-7507.
- ⁷⁵ Cilento, G. (1980) Generation and transfer of triplet energy in enzymatic systems. *Acc. Chem. Res.* **13**, 225-230.
- ⁷⁶ Bechara, E. J. H. e Catalani, L. H. (1984) Quenching of chemiexcited triplet acetone by biologically important compounds in aqueous medium. *Photochem. Photobiol.* **39**, 823-830.
- ⁷⁷ Cantrell, T. S., Allen, A. C. e Ziffer, H. (1989) Photochemical 2 + 2 cycloaddition of arenecarboxylic acid esters to furans and 1,3-dienes. 2 + 2 cycloreversion of oxetanes to dienol esters and ketones. *J. Org. Chem.* **54**, 140-145.
- ⁷⁸ Arnold, D. R. (1968) The photocycloaddition of carbonyl compounds to unsaturated systems: the syntheses of oxetanes. *Adv. Photochem.* **6**, 301-349.
- ⁷⁹ Zepp, R. G., Gumz, M. M., Miller, W. L. e Gao, H. (1998) Photoreaction of valerophenone in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A* **102**, 5716-5723.
- ⁸⁰ Gollnick, K. (1968) Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.* **6**, 1-122.
- ⁸¹ Adam, W., Güthlein, M., Peters, E. M., Peters, K. e Wirth T. (1998) Chiral-auxiliary-induced diastereoselectivity in the [4 + 2] cycloadditions of optically active 2,2-dimethyloxazolidine derivatives of sorbic acid: a model study with singlet oxygen as the smallest dienophile. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4091-4093.
- ⁸² Mori, H., Ikoma, K., Isoe, S., Kitaura, K. e Katsumura, S. (1998) Photosensitized oxygenation of twisted 1,3-dienes: abnormally higher reactivity of vinyl hydrogen rather than allyl hydrogen toward singlet oxygen. *J. Org. Chem.* **63**, 8704-8718.

- ⁸³ Griesbeck, A. G., Fiege, M., Gudipati, M. S. e Wagner, R. (1998) Photooxygenation of 2,4-dimethyl-1,3-pentadiene: solvent dependence of the chemical (ene reaction and [4 + 2] cycloaddition) and physical quenching of singlet oxygen. *Eur. J. Org. Chem.* 2833-2838.
- ⁸⁴ Matsumoto, M. e Kuroda, K. (1982) Sensitized photooxygenation of 2,4-hexadienoic acid esters and 2,4,6-octatrienoic acid esters. Unusual solvent and temperature effects. *Tetrahedron Lett.* **23**, 1285-1288.
- ⁸⁵ Aubry, J., Cazin, B. M., Rougee, M. e 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**, 9159-9164.
- ⁸⁶ Frimer, A. A. (1985) ¹O₂ oxidation of polymers and stabilization. In *Singlet O₂*. Vol. IV. pp. 56, CRC Press, Florida.
- ⁸⁷ Arnold, Z. (1960) Synthetische reaktionen von dimethylformamid V. Synthese von nicotinsäurealdehyd. *Collect. Czech. Chem C.* **25**, 1308-1312.
- ⁸⁸ Pinto, E., Catalani, L. H., Lopes, N. P., Di Mascio, P. e Colepicolo, P. (2000) Peridin in as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in marine algae *Gonyaulax polyedra*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **268**, 496-500.
- ⁸⁹ Reger, D. L. e Habib, M. M. (1980) Carbon-13 NMR investigation into interaction of sodium sorbate and sorbic acid with various micelle forming surfactants. *J. Phys. Chem.* **84**, 77-82.

LIV.	Deves do Autor
N. E.	-
DATA	29/03/04
PREÇO	-
TOMBAMENTO	32103/04

1,20673

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Data:	29/03/04
Lilacs:	-
Dedalus:	1366287
MFN:	26393
Terminal:	OK