UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

JÚLIO MASSARI FILHO

**Mecanismos da Reação de Metabólitos
 α -Dicarbonílicos com Peroxinitrito: Geração
de Radicais Livres e Oxigênio Singlete.
Possíveis Implicações Biológicas**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

21/02/2014

JÚLIO MASSARI FILHO

**Mecanismos da Reação de Metabólitos
 α -Dicarbonílicos com Peroxinitrito: Geração de
Radicais Livres e Oxigênio Singleto. Possíveis
Implicações Biológicas**

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

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

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

Massari Filho, Júlio

M414m Mecanismos da reação de metabólitos α - dicarbonílicos com
peroxinitrito: geração de radicais livres e oxigênio singlete.
Possíveis implicações biológicas / Júlio Massari Filho. -- São
Paulo, 2014.
122p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São
Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Bechara, Etelvino José Henriques

1. Composto carbonílico 2. Radicais livres 3. Estresse oxidativo
I. T. II. Bechara, Etelvino José Henriques, orientador.

547.036 CDD

À minha família que me forneceu estrutura para viabilizar este sonho.

À Luana.

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, em especial minha mãe Elisa, meu pai Júlio, minhas irmãs Juliana e Paula, meu tio Marco Túlio, minha tia Maria Cecília, meu primo Marco Antônio e minhas tias Adília e Genoepha (*in memorian*) que estiveram mais próximos a mim nessa fase da minha vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Etelvino José Henriques Bechara, que me apresentou este projeto, orientou, auxiliou e teve muita paciência.

Aos meus professores de pós-graduação do IQUSP.

Aos meus professores de graduação do IQUSP que me deram base para ingresso no programa de pós-graduação.

Aos professores do IQUSP, em especial à Professora Dra. Sayuri Miyamoto que me acolheu em seu laboratório no final do Doutorado, e àqueles que me auxiliaram com o empréstimo de insumos e equipamentos ou na discussão de resultados, em especial Professora Dra. Ohara Augusto, Professora Dra. Shirley Schreier, Professora Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, Professor Dr. Paolo Di Mascio, Professor Dr. Maurício da Silva Baptista, Professora Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, Professora Dra. Marina Franco Maggi Tavares, Professor Dr. Omar Abou El Seoud, Professor Dr. Cassius Vinicius Stevani, Professora Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, Professor Dr. Luiz Henrique Catalani, Professor Dr. Josef Wilhelm Baader, Professora Dra. Maria Teresa Machini e Professora Dra. Alicia Juliana Kowaltowski.

Aos meus professores de escola, em especial à Professora Patrícia de Oliveira Correia que me mostrou esta ciência de forma apaixonante.

Aos técnicos de laboratório do IQUSP que auxiliaram nos experimentos, em especial à Doris Dias Araújo, Adriana Wendel Pires, Zilda Mendonça, Dra. Edlaine Linares, Dr. Paulo Pires, Dra. Fernanda Manso Prado e Dra. Isaura Toma.

Aos meus colegas de laboratório orientandos do Professor Dr. Etelvino José Henriques Bechara, em especial Débora Emy Fujiy, Dra. Rita Tokikawa, Dra. Camila Marinho Mano, Dra. Chrislaine Oliveira Soares, Dr. Adriano Sartori, Dra. Vanessa Eid da Silva Cardoso, Mariana Mantovani, Saymon Licciardi, Dra. Fernanda Knudsen e Dr. Fernando Dutra.

Aos meus colegas de laboratório da Professora Sayuri Miyamoto (Professora Dra. Mírian Uemi, Daniela da Cunha Bataglioli, Dra. Patrícia Appolinário, Priscila Derogis, Rafaella Mieke Araújo Kazaoka, Sílvia Oliveira, Tatiana Harumi Yamaguti e Thiago Genaro-Matos), do Professor Cassius Vinicius Stevani (Dr. Anderson Garbuglio de Oliveira, Dra. Olívia Domingues e Dr. Luiz Fernando Mendes), do Professor Nilson Antônio Assunção (Dra. Atecla Alves, Adriana Rodrigues Silva, Janderson, e Dra. Sheila Guterres) e do Professor Paolo Di Mascio (Adriana Scalfo, Tatiana Veríssimo, Florêncio Freitas e Dra. Marilene Oliveira).

Aos amigos do IQUSP, em especial André Frank, Carlos Cerqueira César, Rodrigo Fandiño de Andrade, Renato Astolfi Raposo, Marina Trombeta Lima, Maurício Balera Alves, Kátia Santana e Verônica.

Aos colaboradores Dra. Sandra Vaz, Dr. Danilo Medinas, Dr. José Pedro Angeli, Luiz Zanolli, Prof. Dr. Gustavo Micke e Dra. Ana Costa.

Aos colegas diários do ônibus fretado de Sorocaba para a USP.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Química, à Biblioteca do Conjunto das Químicas e ao COSEAS por toda estrutura disponibilizada.

Ao CNPq, FAPESP e Instituto Milênio Redoxoma pelo apoio financeiro às pesquisas realizadas no laboratório do Professor Etelvino José Henriques Bechara.

••

Uma linha é um ponto que saiu para dar uma volta.
Paul Klee (1879-1940)

RESUMO

MASSARI-FILHO, J. **Mecanismos da Reação de Metabólitos α -Dicarbonílicos com Peroxinitrito: Geração de Radicais Livres e Oxigênio Singlete. Possíveis Implicações Biológicas.** 2014. 122 páginas. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peroxinitrito é um potente agente oxidante, nitrante e nucleofílico formado *in vivo* pela reação difusional do radical ânion superóxido com óxido nítrico, cuja produção exacerbada em situações de estresse oxidativo e nitrosativo pode resultar em danos a biomoléculas e estruturas sub-celulares. Por outro lado, vários compostos carbonílicos reativos tais como acroleína e compostos α -dicarbonílicos são descritos como citotóxicos e genotóxicos, pois reagem com biomoléculas aminadas resultando em perda de funções nativas, situação esta denominada de “estresse carbonílico”. Dentre os metabólitos α -dicarbonílicos, altamente suscetíveis a adições nucleofílicas, destacam-se o biacetilo, derivado do metabolismo hepático de etanol e contaminante de alimentos, e metilglioxal e glioxal, ambos catabólitos de glicose, proteínas e lipídios acumulados em doenças relacionadas ao envelhecimento. Neste trabalho, observou-se que, em tampão fosfato normalmente aerado de pH próximo à neutralidade, (i) estes três compostos sofrem adição nucleofílica de peroxinitrito com constantes de velocidade de segunda ordem uma a três ordens de grandeza acima dos valores relatados para compostos monocarbonílicos ($k_2 \approx 4\text{-}100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$); (ii) os sistemas biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito consomem o oxigênio dissolvido com produção de acetato ou acetato e formiato, respectivamente, via radical acetila capaz de acetilar histidina, lisina e 2'-desoxiguanosina se adicionados à mistura reacional; e (iii) o sistema glioxal/peroxinitrito gera sucessivamente radical formila e radical formilhidroperoxila, cujo desproporcionamento a formiato e gás carbônico é acompanhado da emissão de luz no infra-vermelho próximo ($\lambda_{\text{max}} = 1270 \text{ nm}$), atribuída a oxigênio molecular no estado singlete ($\text{O}_2^1\Delta_g$) (Reação de Russell). Estes estudos evidenciam que a reação de metabólitos α -dicarbonílicos com peroxinitrito gera radicais livres e embasam a hipótese de que possam contribuir para a acetilação radicalar, não-enzimática intracelular, de proteínas (epigenética) e DNA, portanto potencialmente implicadas na fisiologia e patologia do envelhecimento e desordens metabólicas, nas quais a participação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e compostos carbonílicos foi relatada. Deve-se ainda notar que a descoberta de acetilação radicalar de biomoléculas por metabólitos α -dicarbonílicos e peroxinitrito prepara o caminho para a identificação de novas reações químicas de biomoléculas, não catalisadas por enzimas, que possam eventualmente revelar novos biomarcadores teciduais em doenças adquiridas e inatas.

Palavras-chaves: Biacetilo; Metilglioxal; Glioxal; Peroxinitrito; Radical Acetila; Oxigênio Singlete.

ABSTRACT

MASSARI-FILHO, J. **Reaction Mechanisms of α -Dicarbonyl Metabolites with Peroxynitrite: Generation of Free Radicals and Singlet Oxygen. Potential Biological Implications.** 2014. 122 pages. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Peroxynitrite is a strong biological oxidant, nitrating and nucleophilic agent, formed by the diffusion-controlled reaction of the superoxide anion radical with nitric oxide, whose exacerbated production in oxidative and nitrosative stress leads to chemical damage to biomolecules and sub-cellular structures. On the other hand, various reactive carbonyl compounds like acrolein and α -dicarbonyls are reportedly cytotoxic and genotoxic for their ability to react with amino biomolecules resulting in loss of native functions, a situation named “carbonyl stress”. Among very reactive α -dicarbonyls highly prone to nucleophilic additions, we highlight biacetyl, a hepatic alcohol metabolite and food contaminant, and methylglyoxal and glyoxal, both catabolites of glucose, proteins and lipids that accumulate in ageing-related disorders. Here, we report that, in normally aerated phosphate buffer near the physiological pH, (i) these three dicarbonyls undergo nucleophilic addition of peroxynitrite whose second order rate constants are one to three orders of magnitude than those documented for monocarbonyls ($k_2 \approx 4\text{-}100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$); (ii) the biacetyl or methylglyoxal/peroxynitrite systems consume the dissolved oxygen yielding the acetate anion or acetate plus formate anion, respectively, from acetyl radical intermediate which was found to acetylate added histidine, lysine and 2'-deoxyguanosine; and (iii) the glyoxal/peroxynitrite system ultimately generate formyl radical and formylperoxyl radical, whose dismutation to formate and carbonic oxide is accompanied by near infrared monomol emission ($\lambda_{\text{max}} = 1270 \text{ nm}$) characteristic of singlet molecular oxygen ($\text{O}_2^1\Delta_g$) (Russell reaction). Our studies strongly attest that the reaction of α -dicarbonyls with peroxynitrite release free radicals that can potentially contribute for the radical, non-enzymatic acetylation of proteins (epigenetics) and DNA bases possibly implicated in the ageing physiopathology and metabolic disorders, where participation of reactive oxygen, nitrogen and carbonyl species is well recognized. Also noteworthy is that our findings may pave the way to the discovery of novel biochemical reactions whose products can eventually be useful as biomarkers of acquired and innate maladies.

Keywords: Biacetyl; Methylglyoxal; Glyoxal; Peroxynitrite; Acetyl radical; Singlet oxygen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas Canônicas Estabilizadas por Ressonância e Sítios de Reatividade da Carbonila	21
Figura 2. Estrutura Química do Biacetilo.....	26
Figura 3. Estrutura Química do Metilglioxal	28
Figura 4. Estrutura Química do Glioxal	30
Figura 5. Estruturas Químicas do Peroxinitrito.....	34
Figura 6. Decaimento Temporal da Absorbância de Peroxinitrito na Presença de Biacetilo..	55
Figura 7. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente da Reação de Peroxinitrito com Biacetilo.....	56
Figura 8. Perfil de pH da Reação de Biacetilo com Peroxinitrito	57
Figura 9. Determinação da Constante de Velocidade de Segunda Ordem da Reação de Peroxinitrito com Acetoína.....	58
Figura 10. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito na Presença de MNP como Captador de Spin	59
Figura 11. Efeito da Adição de Bicarbonato na Amplitude do Sinal do Espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica Atribuído ao Aduto $\text{MNP-CH}_3\text{CO}\cdot$ Oriundo do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito na Presença de MNP.	60
Figura 12. Oximetria do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito	61
Figura 13. Eletroferograma Indicativo da Presença de Acetato na Mistura Final de Reação de Biacetilo/Peroxinitrito	62

Figura 14. Análise por CLAE-EM/EM da Reação de Biacetilo com Peroxinitrito na Presença de L-Histidina	64
Figura 15. Estudos de CLAE-EM/EM dos Produtos de Reação de Biacetilo com Peroxinitrito na Presença de dGuo	66
Figura 16. Efeito da Concentração de Metilglioxal na Velocidade de Consumo de Peroxinitrito	67
Figura 17. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente para a Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito.....	68
Figura 18. Perfil de pH obtido para a Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito	69
Figura 19. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito.....	70
Figura 20. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente da Reação de Acroleína com Peroxinitrito	72
Figura 21. Perfil de pH da Reação de Acroleína com Peroxinitrito	72
Figura 22. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Acroleína com Peroxinitrito.....	72
Figura 23. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito na Presença de MNP como Captador de Spin	74
Figura 24. Efeito da Supressão do Sinal do Aduto MNP-CH ₃ CO• com a Adição de Bicarbonato no Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.	74
Figura 25. Ressonância Paramagnética Eletrônica com DBNBS como Captador de Spin para o Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.....	75

Figura 26. Experimentos de Pessoaência Paramagnética Eletrônica MNP como Captador de Spin para o Sistema Metilglioxal/Peróxido de Hidrogênio	77
Figura 27. Oximetria do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.....	78
Figura 28. Análise de Ânions por Eletroforese Capilar do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.	79
Figura 29. Análise de Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar Acoplada a Espectrometria de Massas	81
Figura 30. Decaimento Temporal da Absorbância em 302 nm de Peroxinitrito na Presença de Concentrações Crescentes de Glioxal	82
Figura 31. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente para a Reação de Glioxal com Peroxinitrito	83
Figura 32. Perfil de pH para a Reação de Peroxinitrito com Glioxal.....	84
Figura 33. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Glioxal com Peroxinitrito	84
Figura 34. Ressonância Paramagnética Eletrônica com DMPO como Captador de Spin do Sistema Glioxal/Peroxinitrito.	86
Figura 35. Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo na Presença MNP como Captador de Spin para o Sistema Glioxal/Peroxinitrito.....	88
Figura 36. Experimentos Complementares de Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo na Presença MNP como Captador de Spin para o Sistema Glioxal/Peroxinitrito.....	89
Figura 37. Detecção Direta de Radicais Livres Gerados pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito por Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo.....	90

Figura 38. Emissão de Luz a 1270 nm Atribuível à Fotoemissão Molecular do Oxigênio Singlete ($^1\Delta_g$) pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito	92
Figura 39. Efeito de Supressão da Emissão de Luz a 1270 nm por Supressores Clássicos da Fotoemissão Monomolecular do Oxigênio Singlete $^1\Delta_g$	93
Figura 40. Emissão de Luz a 1270 nm pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito	94
Figura 41. Cinética da Absorbância de Peroxinitrito (302 nm) na Presença de AVS	95
Figura 42. Cromatograma Representativo das Análises de AVSO ₂ por CLAE-UV	96
Figura 43. Efeito da Concentração de Glioxal na Área do Pico do AVSO ₂ Analisado por CLAE-UV	97
Figura 44. Efeito da Concentração de Metilglioxal na Área do Pico do AVSO ₂ Analisado por CLAE-UV	97
Figura 45. Diminuição na Área do Pico do AVSO ₂ Analisado por CLAE-UV na Presença de Biacetilo	98
Figura 46. Cromatogramas das Análises de CLAE-EM/EM da Captação de Oxigênio Singlete Isotopicamente Marcado do Sistema Glioxal/Peroxinitrito	100
Figura 47. Eletroferograma Representativo das Análises de Formiato por Eletroforese Capilar para o Sistema Glioxal/Peroxinitrito.....	101
Figura 48. Dependência na Concentração de Glioxal e de Peroxinitrito no Rendimento da Formação de Formiato	101

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação do Mecanismo de Adições Nucleofílicas a Carbonilas em Meio Ácido	22
Esquema 2. Representação do Mecanismo de Adições Nucleofílicas a Carbonilas em Meio Básico	22
Esquema 3. Representação da Reação de Hidratação de Composto Carbonílico Formando seu Diol Geminal	22
Esquema 4. Mecanismo Geral para a Formação de Iminas Através de Compostos Carbonílicos e Aminas Primárias	24
Esquema 5. Produtos da Glicação Avançada em Proteínas (P) por Glicação e Glicoxidação de Grupos Amino de Lisina (Lys) e Arginina (Arg) Produzindo Bases de Schiff, Produtos de Amadori, Produtos de Maillard e Pentosidina	25
Esquema 6. Produtos da Lipoperoxidação Avançada em Proteínas (P) por Aldeídos α - β -Insaturados com Resíduos de Lisina (Lys), Cisteína (Cys) ou Histidina (His) Gerando Adutos de Michael.....	26
Esquema 7. Sumário das Vias Endógenas Hipotéticas da Produção de Metilglioxal <i>in vivo</i> .	29
Esquema 8. Esquema Representativo de Algumas Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio Importantes e Suas Reações	32
Esquema 9. Rotas Hipotéticas para a Isomerização do Peroxinitrito a Nitrato Catalisada por Composto Carbonílico, Acompanhada da Formação de Ácidos Carboxílicos e Nitrocompostos.....	36
Esquema 10. Mecanismo Hipotético para a Geração de Radical Acetila e Acetato pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito.....	38

Esquema 11. Mecanismo Hipotético para o Consumo de O ₂ por Radical Acetila Produzindo Ácido Acético	38
Esquema 12. Mecanismo Hipotético para a Reação de Peroxinitrito com Metilglioxal	39
Esquema 13. Mecanismo Hipotético para a Produção de Radical Formila pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito	40
Esquema 14. Geração de Oxigênio Molecular Singlete (¹ Δ _g) Através de Radical Formila pelo Mecanismo de Russell	40
Esquema 15. Cicloadição 1-4 de O ₂ ¹ Δ _g no Derivado Antracênico AVS formando 9,10-AVSO ₂	94
Esquema 16. Mecanismo Geral Proposto para a Reação de Peroxinitrito com Compostos α-Dicarbonílicos (Biacetilo, Metilglioxal e Glioxal) em Meio Aquoso Aerado	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes de Equilíbrio a 25°C para Adição de Água a Compostos Carbonílicos. **23**

Tabela 2. Rendimentos Químicos de Acetato (mM) Produzidos pela Reação de Biacetilo com Peroxinitrito..... **63**

Tabela 3. Concentração de Formiato e Acetato nas Misturas Finais de Reação para o Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito **80**

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVS	9,10-Divinilantraceno disulfonato de sódio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DBNBS	Ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfônico
dGuo	2'-desoxiguanosina
DNB	Ácido 3,5-dinitrobenzóico
DMPO	5,5-Dimetil-1-pirrolina- <i>N</i> -óxido
EAS	9,10-Dietilantraceno disulfonato de sódio
EM	Espectrometria de Massas
MNP	2-Metil-2-nitrosopropano
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
TEMPOL	4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina- <i>N</i> -óxido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	COMPOSTOS CARBONÍLICOS.....	21
1.1.1	Biacetilo	26
1.1.2	Metilglioxal.....	28
1.1.3	Glioxal.....	30
1.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	31
1.2.1	Oxigênio Molecular Singlete.....	33
1.2.2	Peroxinitrito	34
1.3	REAÇÕES DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS COM PEROXINITRITO	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	HIPÓTESE GERAL DA PESQUISA	37
2.1.1	Hipótese de Trabalho com Biacetilo	38
2.1.2	Hipótese de Trabalho com Metilglioxal.....	39
2.1.3	Hipótese de Trabalho com Glioxal.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	41
3.1.1	Preparação do Peroxinitrito	41

3.1.2	Dosagem da Solução Estoque de Peróxido de Hidrogênio	42
3.1.3	Preparo das Soluções Tampão de Fosfato de Sódio	42
3.1.4	Preparação do Captador de Spin DBNBS	43
3.1.5	Destilação do Biacetilo	43
3.1.6	Dosagem da Solução Estoque Comercial de Metilglioxal.....	43
3.1.7	Preparo das Soluções Estoque de Compostos Carbonílicos.....	44
3.1.8	Preparo das Soluções Estoque de Captadores de Spin.....	44
3.2	MÉTODOS	44
3.2.1	Estudos Cinéticos com Peroxinitrito	44
3.2.2	Oximetria	45
3.2.3	Ressonância Paramagnética Eletrônica	46
3.2.3.1	Experimentos Realizados em Celas	47
3.2.3.2	Experimentos Realizados em Fluxo	47
3.2.4	Análise de Produtos Finais de Reação do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar.....	48
3.2.5	Análise de Produtos Finais de Reação (Carboxilatos) do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar	48
3.2.6	Análise de Produtos Finais de Reação do Sistema Glioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar.....	49

3.2.7	Análise das Biomoléculas Acetiladas pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por CLAE-EM	50
3.2.8	Análise de L-Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar Acoplada à EM	50
3.2.9	Detecção de Emissão de $O_2^1\Delta_g$ no Infravermelho	51
3.2.10	Análise de AVSO ₂ da Captação Química de Oxigênio Singlete por AVS ...	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	BIACETILO	55
4.1.1	Estudo Cinético do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito	55
4.1.2	Estudo Cinético do Sistema Acetoína/Peroxinitrito	57
4.1.3	Estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito	58
4.1.4	Oximetria do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito	60
4.1.5	Demonstração por Eletroforese Capilar da Geração de Acetato pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito	61
4.1.6	Demonstração da Acetilação de Biomoléculas pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por CLAE/EM	63
4.1.6.1	Acetilação de L-Histidina	63
4.1.6.2	Acetilação de dGuo	65
4.2	METILGLIOXAL	67

4.2.1	Estudo Cinético do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito	67
4.2.2	Estudo Cinético do Sistema Acroleína/Peroxinitrito	70
4.2.3	Estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.....	73
4.2.3.1	Experimentos com MNP como Captador de Spin	73
4.2.3.2	Experimentos com DBNBS como Captador de Spin	75
4.2.4	Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Metilglioxal/Peróxido de Hidrogênio	76
4.2.5	Oximetria do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito	77
4.2.6	Análise por Eletroforese Capilar de Produtos Finais de Reação (Carboxilatos) do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.....	78
4.2.7	Análise por Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massas de L-Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito.....	80
4.3	GLIOXAL.....	82
4.3.1	Estudo Cinético do Sistema Glioxal/Peroxinitrito	82
4.3.2	Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Glioxal/Peroxinitrito...	85
4.3.2.1	Experimentos em Celas	85
4.3.2.2	Experimentos em Fluxo.....	87
4.3.3	Deteccção da Luz Gerada pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito.....	91
4.3.4	Captação Química de Oxigênio Singlete por AVS.....	94

4.3.4.1	Análises de AVSO ₂ por CLAE-UV	95
4.3.4.2	Análises de AVSO ₂ por CLAE-EM/EM de Amostras de Reação Sob Atmosfera de ¹⁸ O ₂ , ¹⁶ O ₂ , e N ₂	98
4.3.5	Análise de Produtos Finais de Reação (Formiato) por Eletroforese Capilar do Sistema Glioxal/Peroxinitrito	100
4.4	POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS	102
5	CONCLUSÕES	105
6	PERSPECTIVAS.....	109
7	REFERÊNCIAS	111
	LISTA DE ANEXOS.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 COMPOSTOS CARBONÍLICOS

Compostos carbonílicos apresentam o grupo funcional polar carbonila em sua estrutura, o qual é formado por um átomo de carbono ligado a um átomo de oxigênio por dupla ligação. Devido à maior eletronegatividade do átomo de oxigênio frente à do carbono, o grupo carbonila pode ser estabilizado por ressonância. O caráter polar do grupo carbonila de aldeídos e cetonas os tornam susceptíveis a ataques de nucleófilos ao átomo de carbono e a eletrófilos ao seu átomo de oxigênio. Há ainda como consequência o efeito indutivo sacador de elétrons do oxigênio que torna o átomo de hidrogênio do carbono- α à carbonila com caráter relativamente ácido (Figura 1).

Figura 1. Estruturas Canônicas Estabilizadas por Ressonância e Sítios de Reatividade da Carbonila.

Dentre os compostos carbonílicos, podemos destacar aldeídos, que apresentam átomo de hidrogênio ligado diretamente ao carbono carbonílico, e cetonas, que apresentam o carbono carbonílico ligado a dois outros átomos de carbono. Devido ao menor efeito estérico e ao fato de átomos de carbono serem doadores de elétrons mais efetivos do que átomos de hidrogênio (efeito eletrônico da hiperconjugação de orbitais), aldeídos são mais reativos em adições nucleofílicas do que cetonas análogas. O ataque de um nucleófilo a uma carbonila, portanto, depende de dois fatores básicos: efeito estérico dos grupos adjacentes à carbonila e densidade de carga positiva no carbono carbonílico, sendo esta diminuída quando há efeitos de hiperconjugação. A adição de nucleófilos à carbonila pode ser em meio ácido (Esquema 1) ou básico (Esquema 2). Em meio aquoso, compostos carbonílicos tendem a sofrer adição de água, formando seus correspondentes hidratos (dióis geminais) em equilíbrio (Esquema 3).

Esquema 1. Representação do Mecanismo de Adições Nucleofílicas a Carbonilas em Meio Ácido.

Esquema 2. Representação do Mecanismo de Adições Nucleofílicas a Carbonilas em Meio Básico.

Esquema 3. Representação da Reação de Hidratação de Composto Carbonílico Formando seu Diol Geminal.

Normalmente, a estabilidade do composto carbonílico é maior do que a de seu diol geminal, devido à hibridização favorável sp^2 do carbono carbonílico (menor repulsão entre os ligantes) frente à hibridização sp^3 do diol geminal (maior repulsão entre os ligantes). Da mesma forma, quanto maior é o impedimento estérico dos grupos adjacentes à carbonila, menor é a constante de equilíbrio K dessa reação de hidratação, enquanto que quanto maior é o efeito sacador de elétrons dos grupos adjacentes à carbonila, maior tende a ser a constante de equilíbrio K dessa reação de hidratação devido à desestabilização da carbonila e favorecimento do ataque de água ao composto carbonílico. Para exemplificar esse efeito, a Tabela 1 lista diversos compostos carbonílicos e suas respectivas constantes de equilíbrio de hidratação. Pode-se observar que aldeídos são mais reativos do que suas cetonas análogas e que os compostos α -dicarbonílicos apresentam constantes de hidratação maiores do que os seus análogos monocarbonílicos, sendo este efeito explicado pelo efeito sacador mútuo de elétrons de uma carbonila adjacente à outra. Essas reações de adição de água sofrem catálise ácida geral ou catálise básica geral¹.

Tabela 1. Constantes de Equilíbrio a 25°C para Adição de Água a Compostos Carbonílicos.

Composto Carbonílico	K (Hidratação)	Referência
$2,2 \times 10^3$	2
1,06	2
0,85	2
0,65	2
0,61	2
0,23	2
$2,9 \times 10^4$	2
$1,4 \times 10^{-3}$	2
0,11	2
10	2
2,9	2
35	2
$1,2 \times 10^6$	2
3,3	3,4
3,5	4
$7,2 \times 10^5$	5

Na presença de doadores de elétrons, compostos carbonílicos podem formar iminas (bases de Schiff), oximas, hidrazonas e semicarbazonas, enquanto que na presença de aminas secundárias podem formar enaminas. Do ponto de vista biológico, é importante a formação de iminas entre compostos carbonílicos e derivados de grupos amino de resíduos de proteínas e bases nitrogenadas de ácidos nucleicos. O mecanismo da formação de uma imina pode ser representado no Esquema 4.

Esquema 4. Mecanismo Geral para a Formação de Iminas Através de Compostos Carbonílicos e Aminas Primárias.

Por sua vez, compostos carbonílicos mais reativos como alcanais (acetaldeído, n-hexanal), alcenais (acroleína (propenal, IUPAC), heptadienais, nonadienais), β -cetoácidos (acetoacetato e 2-metilacetoacetato), β -dicetonas (succinilacetona) e α -dicarbonílicos (biacetilo, ácido 4,5-dioxovalérico, metilglioxal) foram identificados como produtos de oxidação e desidratação de carboidratos⁶, peroxidação de lipídios^{6,7}, oxidação de proteínas^{8,9} e oxidação de DNA¹⁰. Tais catabólitos estão implicados em várias desordens relacionadas ao envelhecimento, incluindo diabetes^{9,11,12}, esclerose lateral amiotrófica¹³, doença de Alzheimer^{9,14,15} e câncer^{6,16}. São espécies amplamente distribuídas nos organismos vivos e conhecidas principalmente por seus efeitos prejudiciais devido à sua toxicidade direta ou indireta, com efeitos deletérios, citotóxicos e mutagênicos¹⁷. O acúmulo celular de compostos

carbonílicos reativos causadores de modificação química de estruturas moleculares e celulares com perda de funções nativas é denominado “estresse carbonílico”^{12,18–20}.

Estes compostos carbonílicos reativos, catabólitos secundários de carboidratos, lipídios e proteínas, sofrem adição nucleofílica de resíduos de grupos amino de proteínas gerando bases de Schiff, produtos de Maillard, produtos de Amadori e pentosidina (biomarcador do envelhecimento e de complicações no diabetes tipo 2²¹) (Esquema 5) e compostos carbonílicos α - β -insaturados formam adutos de Michael com grupos amino (lisina, arginina) ou tiólico (cisteína) de resíduos de aminoácidos de proteínas (Esquema 6)²². Com bases nitrogenadas de DNA produzem adutos mutagênicos como o etanoaduto de 2'-desoxiguanosina (dGuo) com *trans,trans*-2,4-decadienal²³. Estes produtos finais da glicação avançada com proteínas e bases nitrogenadas podem ser acumulados em tecidos *in vivo* e disparar respostas biológicas adversas (doenças degenerativas do envelhecimento, aterosclerose, diabetes, mutagênese, entre outras).

Esquema 5. Produtos da Glicação Avançada em Proteínas (P) por Glicação e Glicoxidação de Grupos Amino de Lisina (Lys) e Arginina (Arg) Produzindo Bases de Schiff, Produtos de Amadori, Produtos de Maillard e Pentosidina. Adaptado de Stadtman & Levine²².

Esquema 6. Produtos da Lipoperoxidação Avançada em Proteínas (P) por Aldeídos α,β -Insaturados com Resíduos de Lisina (Lys), Cisteína (Cys) ou Histidina (His) Gerando Adutos de Michael. Adaptado de Stadtman & Levine²².

Compostos α -dicarbonílicos, especialmente biacetilo, metilglioxal e glioxal, chamam a atenção como modelos de estudo devido à sua simplicidade, ocorrência bioquímica e alta reatividade frente a adições nucleofílicas. Têm alto caráter electrofílico devido à carbonila adjacente a outra carbonila, conferindo ao átomo de carbono uma grande densidade de carga parcial positiva^{24,25}.

1.1.1 Biacetilo

Figura 2. Estrutura Química do Biacetilo.

Biacetilo ou diacetilo (Figura 2) – 2,3-butanodiona (IUPAC) – é bastante reativo e tóxico, apresenta cor amarelada e odor característico de manteiga. É largamente empregado na indústria alimentícia como flavorizante em margarinas, manteigas, pipoca de microondas e

queijos processados e produzido pela fermentação alcoólica de diversos microorganismos tais como leveduras e algumas espécies da família das bactérias lácticas dos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus*²⁶. Ocorre na produção de queijos, vinho, iogurtes, cervejas, conhaque, saquês, café torrado e vários outros alimentos fermentados, além de estar presente na fumaça de cigarro²⁶⁻³⁰. É tido como um dos aromatizantes com os quais mais se tem contato diariamente²⁶. A exposição constante a biacetilo de trabalhadores de fábricas de pipoca de microondas, por exemplo, tem sido relacionada a bronquiolite obliterante (inflamação dos bronquíolos com fibrose e obstrução das pequenas vias aéreas), limitação do fluxo aéreo, sintomas respiratórios como falta de ar, e irritação da mucosa conjuntiva^{27,31,32}. De acordo com Dworak *et al.*, pode-se presumir que a inflamação resulta de reações de biacetilo com grupos amino de nucleófilos duros (por exemplo, lisina, arginina) em proteínas, que conduzem à sua inativação e lesão celular²⁵.

Endogenamente, pode ser produzido pelo metabolismo de etanol no organismo^{33,34}, formando juntamente com acetoína (3-hidroxi-2-butanona (IUPAC)) e 2,3-butanodiol os metabólitos interconvertíveis C₄, acumulados quando uma grande quantidade de etanol é ingerida ou em indivíduos com deficiência na enzima aldeído desidrogenase e que são tidos como responsáveis pela ressaca¹³. Otsuka *et al.* avaliaram a concentração de biacetilo no plasma de estudantes voluntários do sexo masculino que ingeriram etanol como sendo de 0,25-0,75 µM, enquanto que a concentração de acetoína foi de cerca de 2,2 µM. Curiosamente, a concentração de 2,3-butanodiol foi de 10-50 µM no plasma e de 50-300 µM na urina de um voluntário com a enzima aldeído-desidrogenase 2 defeituosa, três horas após a ingestão de etanol³⁴. Além disso, cerca de 3 µM de biacetilo e 2 µM de acetoína foram encontrados no plasma de ratos adultos, enquanto que 3,4 nmol de biacetilo e 3,6 nmol de acetoína por grama de tecido foram encontradas no fígado de ratos adultos³⁰. A concentração

de biacetilo presente em amostras biológicas, segundo a literatura, não é alta devido à facilidade de redução e de condensação do biacetilo com grupos amino das proteínas^{13,25}.

1.1.2 Metilglioxal

Figura 3. Estrutura Química do Metilglioxal.

Metilglioxal (Figura 3) – 2-oxopropanal (IUPAC) – é um α -oxoaldeído de cor acastanhada e odor pungente. É encontrado em soluções aquosas como uma mistura de derivados hidratados em equilíbrio dinâmico, onde prevalecem as formas mono-hidratada (56-62%) e di-hidratada (38-44%), sendo a forma livre observada apenas em traços³⁵. Thornalley *et al.* observaram que em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, e a 37°C, a proporção aproximada dessas formas é 28:71:1, respectivamente³⁶.

É altamente reativo, sendo putativamente produzido *in vivo* por quatro vias enzimáticas distintas: (i) a partir de triose-fosfatos (gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato) interconvertidas por isomerases; (ii) oxidação de acetona, um dos chamados “corpos cetônicos”, catalisada pelo citocromo P450 2E1; (iii) degradação de aminoácidos por amino-oxidases; e (iv) oxidação de acetoacetato mediada pela mieloperoxidase. Vias não enzimáticas a partir de glicose, triose-fosfatos, acetoacetato, succinilacetona e aminoacetona também foram reveladas *in vitro* como produtoras potenciais de metilglioxal nas células (Esquema 7)^{6,19,37-46}.

Fontes exógenas de metilglioxal incluem nevoeiro, água da chuva, atmosfera urbana, fumaça de cigarro, bebidas e diversos produtos alimentares derivados de açúcares e óleos, podendo ser produzido no processo de cozimento ou longa estocagem⁴³.

Esquema 7. Sumário das Vias Endógenas Hipotéticas da Produção de Metilglioxal *in vivo*^{39,43,46,47}.

Apesar de ser normalmente consumido por glicoxalases, aldeído-oxidases e outras enzimas, metilglioxal sofre adições nucleofílicas e promove agregações de proteínas de efeitos biologicamente adversos envolvidos em diabetes, doença de Alzheimer e outras enfermidades relacionadas com o envelhecimento^{19,38}. Concentrações de nanomolar a micromolar de metilglioxal livre têm sido relatados em plasma humano³⁸, sendo a variabilidade desses valores relacionada com a conjugação de metilglioxal com proteínas em amostras biológicas e aos diferentes métodos utilizados para a preparação das amostras e das análises^{38,48}. De acordo com Beisswenger *et al.*, a concentração de metilglioxal é de 123 ± 37 nM no plasma de seres humanos normais e $189,3 \pm 38,7$ nM em portadores de diabetes do tipo 2⁴⁹, enquanto que as concentrações celulares de metilglioxal situam-se na faixa de 1-5

μM ³⁸. Trabalhos posteriores mostraram que em pacientes diabéticos nos quais a diabetes é mal controlada, as concentrações plasmáticas de metilglioxal estão na faixa de 400 μM e que a concentração em tecidos e microambientes tendem a ser muito maiores do que os níveis plasmáticos^{50–53}. Sua concentração também está aumentada em condições caracterizadas por hiperglicemia, hiperlipidemia e estresse oxidativo, sendo geralmente consideradas típicas de obesidade⁵⁴.

1.1.3 Glioxal

Figura 4. Estrutura Química do Glioxal.

Glioxal (Figura 4) – etanodial (IUPAC) – é um composto levemente amarelado, incolor em soluções aquosas, onde se apresenta predominantemente dihidratado ($\approx 98\%$) e monohidratado (2-0,5%), estando presente apenas em traços na forma dialdeídica mais reativa (0,02-0,005%)^{36,55}. Seus hidratos podem se condensar a oligômeros⁵⁵. É o composto dialdeídico mais simples presente em comida^{56,57}, podendo ser gerado em processos de fermentação, cozimento e frituras⁵⁸, estando presente, por exemplo, em torradas, “ketchup”, molho de soja e manteigas⁵⁹. Está presente também em bebidas incluindo vinho⁶⁰ e água mineral⁶¹ ou tratada por ozônio⁶², ar urbano^{63–65}, fumaça de cigarro²⁸, solo, sedimentos e águas subterrâneas e do mar⁵⁸.

Endogenamente, pode ser produzido a partir de açúcares por reações de oxidações diretas, conversão através de fragmentação retroaldol, ou por reações de Maillard e produtos de Amadori. Pode ainda ser produzido a partir da lipoperoxidação não enzimática de ácidos graxos poli-insaturados, a qual gera peróxidos intermediários que se degradam para produzir

uma variedade de produtos oxidados inclusive glioxal. Ácido ascórbico sofre hidrólise espontaneamente produzindo glioxal. Assim como metilglioxal, o glioxal é consumido por enzimas do sistema da glioxalase, aldeído redutases, aldose redutases, carbonil redutases, aldeído desidrogenase e 2-oxoaldeído desidrogenase. Também pode formar adutos com lisina, arginina e cisteína, sendo que mais de 90% do glioxal presente em matrizes biológicas está covalentemente ligado aos átomos de nitrogênio ou enxofre desses aminoácidos, tendo assim um papel chave na glicação das proteínas^{58,66,67}.

A concentração de glioxal no soro está na faixa de 0,05-0,08 mg/L e de $12,5 \pm 0,5$ mg/L no plasma de indivíduos saudáveis, mas atinge 0,19-0,33 mg/L no soro, $22,6 \pm 3$ mg/L no plasma e 0,18-0,40 mg/L na urina de pacientes com diabetes^{68,69}.

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

Em sistemas biológicos, espécies reativas de oxigênio são geradas constantemente pelo metabolismo do oxigênio molecular e fazem parte de diversos processos naturais responsáveis pela vida. São produzidas em cada célula durante a oxidação normal, fazendo parte da respiração celular, sendo as mais estudadas o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o radical hidroperoxila ($HOO^{\bullet}$), o radical alcóxila ($RO^{\bullet}$), o radicalalquilperoxila ($ROO^{\bullet}$), o ozônio (O_3), o ânion hipoclorito (ClO^-), e o oxigênio molecular singlete ($O_2^1\Delta_g^+$ ou simplesmente 1O_2)⁷⁰⁻⁷⁴.

Por sua vez, as espécies reativas de nitrogênio têm como um dos precursores a produção de óxido nítrico ($^{\bullet}NO$ (monóxido de nitrogênio, segundo a IUPAC)) pelas óxido nítrico sintases a partir de arginina, NADPH e oxigênio molecular. O óxido nítrico é um importante mensageiro intracelular, vasodilatador, modulador de fluxo sanguíneo, da trombose e da atividade neural, sendo uma das menores e mais simples moléculas sintetizadas pelo organismo. Além disso, é de extrema importância para a defesa não específica de

hospedeiros a patógenos e tumores. O óxido nítrico também é precursor de uma pequena porém reativa família de espécies reativas de nitrogênio, compreendendo principalmente peroxinitrito/ácido peroxinitroso ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$), dióxido de nitrogênio (NO_2), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) e o íon nitrosônio (NO^+), um intermediário hipotético^{70,74-76}.

Uma vez formadas, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tendem a ser utilizadas pelo organismo ou neutralizadas por atividade enzimática ou de antioxidantes naturais que impedem a formação inicial de outros radicais. A superprodução de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resulta nos denominados estresse oxidativo e nitrosativo, respectivamente, os quais estão relacionados com uma grande variedade de processos inflamatórios e patológicos como câncer, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), envelhecimento, aterosclerose e diabetes. O Esquema 8 trás um panorama resumido de algumas importantes espécies reativas de oxigênio em nitrogênio e algumas de suas principais reações^{70,75,76}.

Esquema 8. Esquema Representativo de Algumas Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio Importantes e Suas Reações. XO: Xantina Oxidase; SOD: Superóxido Dismutase I; P-Fe(III): Ferrihemoproteínas; BH: Bimolécula geral; e Mn+: íon de metal de transição. Adaptado de Medinas *et al.*⁷⁷.

1.2.1 Oxigênio Molecular Singlete

O oxigênio molecular (dioxigênio, O_2), segundo a teoria dos orbitais moleculares, em seu estado fundamental encontra-se no estado triplete ($^3\Sigma_g^-$). É um birradical pois apresenta dois elétrons desemparelhados em seus orbitais antiligantes degenerados π^* . O fato de os elétrons se apresentarem com spins paralelos restringe a reatividade do oxigênio molecular triplete com biomoléculas pela regra de conservação do spin. Isto se deve ao fato de que, para a reação ocorrer, a espécie alvo do oxigênio molecular triplete também teria que ter nos orbitais HOMO elétrons com spins paralelos, sendo esta uma condição rara para a grande parte das moléculas pelo fato dessas serem não-radicais formadas por ligações covalentes de spins emparelhados nos seus orbitais moleculares. No entanto, quando se fornece energia para a molécula de oxigênio triplete, este deixa de ser um birradical e há o emparelhamento de elétrons num mesmo orbital, formando o oxigênio singlete no estado $^1\Delta_g$ (22,5 kcal/mol acima do estado triplete), ou em orbitais diferentes, formando o oxigênio singlete no estado $^1\Sigma_g^+$ (37,5 kcal/mol acima do estado triplete). Com o emparelhamento de elétrons, os estados singlete do oxigênio são formas muito mais reativas de oxigênio molecular⁷⁸⁻⁸². O tempo médio de vida em meio aquoso do $O_2\ ^1\Delta_g$ é de aproximadamente 10^{-6} s, enquanto que o do $O_2\ ^1\Sigma_g^+$ é de aproximadamente 10^{-11} s, sendo este último sem relevância biológica por rapidamente gerar a espécie $^1\Delta_g$ ⁷⁸.

A desativação do oxigênio singlete $^1\Delta_g$ ao estado fundamental de oxigênio triplete $^3\Sigma_g^-$ pode ocorrer por através do choque de uma molécula de $O_2\ ^1\Delta_g$ com uma de $O_2\ ^3\Sigma_g^-$, emitindo luz no infravermelho próximo, em ≈ 1270 nm (emissão monomolecular), ou pelo choque de duas moléculas de $O_2\ ^1\Delta_g$, com emissão no vermelho visível em ≈ 634 e em ≈ 703 nm (emissão bimolecular)⁷⁸.

Oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) pode ser produzido por três rotas de processos: (i) quimicamente, pela reação de hipoclorito com peróxido de hidrogênio⁸³, peroxinitrito com

peróxido de hidrogênio⁸⁴, a partir da decomposição térmica de dioxetanos ou endoperóxidos^{78,85}, na dismutação de radicais peroxila primários e secundários ($\text{RHCOO}^\bullet$, reação de Russell)^{81,86-90}, reação de O_3 com biomoléculas, e na decomposição do peroxinitrito e do peroxinitrato⁸²; (ii) em reações mediadas por enzimas, como as catalisadas por ciclooxigenase, hemoglobina, mioglobina e lactoperoxidase na presença de peróxido de hidrogênio e na fagocitose mediada por mieloperoxidase; ou (iii) fotoquimicamente, sensibilizada por um corante (fotossensibilizador) na presença de $^3\text{O}_2$ e irradiação⁷⁸.

Os alvos biológicos do $^1\text{O}_2$ são DNA, proteínas, enzimas e lipídios, via reações de adição 1,2, 1,3 e 1,4 a compostos insaturados formando peróxidos, a biomoléculas sulfuradas gerando sulfóxidos e a alguns compostos nitrogenados dando nitróxidos. Tais reações têm consequências benéficas como no caso da fagocitose, sinalização celular e terapia fotodinâmica ou deletérias com alterações estruturais e perda de funções nativas levando à necrose, ou então morte apoptótica que pode ser natural ou não⁷⁸.

1.2.2 Peroxinitrito

Figura 5. Estruturas Químicas do Peroxinitrito.

Dentre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, destaca-se o peroxinitrito (Figura 5) que é um potente nucleófilo, nitrante, nitrosante e oxidante formado *in vivo* pela reação controlada por difusão ($k_2 = 4\text{-}20 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) de radical ânion superóxido com óxido nítrico^{75,77,91,92}. Apresenta-se em equilíbrio com o ácido peroxinitroso, com um pKa de 6,8 (podendo variar na faixa de 6,55-7,33 quando em tampões fosfato, dependendo da concentração do tampão)⁹². Este par $\text{HOONO}/\text{ONOO}^-$ promove uma gama de reações de oxidação, uni- ou bi-eletrônica, nitrosilação e nitratação em lipídeos, proteínas e DNA, podendo

causar, diretamente ou através de mecanismos radicalares, prejuízos à expressão de proteínas, atividades de enzimas e rotas sinalizadoras. Peroxinitrito reage diretamente com vários substratos, incluindo alguns aminoácidos, nucleosídeos, metabólitos carbonílicos, tióis, ebselen (mimético de glutathione peroxidase), complexos metálicos, hemeproteínas, ascorbato e uréia. O aumento da formação de peroxinitrito em tecidos está associado a inflamação e com doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson, artrite reumatóide, arterosclerose), problemas pulmonares, esclerose amiotrófica lateral, diabetes, câncer e toxicidade de drogas^{70,75,76,91,93}.

1.3 REAÇÕES DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS COM PEROXINITRITO

Em virtude da alta reatividade de peroxinitrito como nucleófilo e de compostos carbonílicos como eletrófilos, concomitantemente encontrados em ambientes submetidos a estresse carbonílico, nitrosativo e oxidativo, tais como diabetes, envelhecimento, doença de Alzheimer e câncer, torna-se importante estudar as reações de compostos carbonílicos com peroxinitrito.

Os primeiros trabalhos sobre a adição de peroxinitrito a compostos monocarbonílicos revelaram que essas reações são relativamente lentas, tais como aquelas com acetona ($k_2 = 4,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,2, 25°C), acetaldeído ($k_2 = 680 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,4, 37°C), propionaldeído ($k_2 = 530 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7, 25°C), isobutanal ($k_2 = 344 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,2, 25°C), piruvato ($k_2 = 88 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,4, 37°C), e 3-metilacetotacetona ($k_2 = 166 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7, 25°C)^{4,94-96}. Por isso, essas reações foram consideradas negligenciáveis quanto à sua relevância biológica, visto que a reação do peroxinitrito com o dióxido de carbono, ordens de grandeza predominante nos tecidos, apresenta uma constante de velocidade muito maior ($k_2 = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,4, 24°C; $k_2 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,4, 37°C)^{97,98}. Esta constatação é, entretanto, questionável quando se leva em conta as concentrações nos microambientes biológicos, a difusibilidade das

moléculas reagentes através das membranas e a duração destas reações nas células e tecidos ao longo da situação de estresse.

No que diz respeito à adição nucleofílica de peroxinitrito a compostos carbonílicos, de acordo com Uppu *et al.*, um intermediário putativo nitrosoperoxycarbonato regenera o aldeído e forma nitrato, além de outros produtos secundários considerados na época de menor interesse, incluindo ácidos e nitratos orgânicos⁹⁵. Em paralelo, Nakao *et al.*⁹⁶ demonstraram que aproximadamente 1 mM de acetato e formiato podem ser obtidos através da reação de acetaldeído (100 mM) com peroxinitrito (10 mM) em meio ligeiramente alcalino através das mesmas condições propostas por Uppu *et al.*⁹⁵. Já Yang *et al.*⁴ sugeriram que o aduto nitrosoperoxycarbonato putativo forma um intermediário dioxirano e nitrito antes da regeneração do composto carbonílico e geração de nitrato, sendo esta hipótese embasada pela observação da epoxidação de 1,3-dimetilciclohexeno adicionado ao meio reacional, em competição com a reação de peroxinitrito formadora de carboxilatos. Estas rotas propostas estão sumarizadas no Esquema 9.

Esquema 9. Rotas Hipotéticas para a Isomerização do Peroxinitrito a Nitrato Catalisada por Composto Carbonílico, Acompanhada da Formação de Ácidos Carboxílicos e Nitrocompostos. Adaptado de Uppu *et al.*⁹⁵ e Nakao *et al.*⁹⁶ (rotas a e b), e de Yang *et al.*⁴ (rota c).

2 OBJETIVOS

Diante da importância biológica e alta reatividade de compostos α -dicarbonílicos (eletrófilos) e de peroxinitrito (nucleófilo), propôs-se estudar a reação de adição nucleofílica de peroxinitrito à biacetilo, metilglioxal e glioxal (todos eles considerados de alta relevância biomédica) com enfoque na cinética das reações, intermediação de radicais e produtos de reação na presença de oxigênio molecular e de modelos de biomoléculas (aminoácidos e nucleobases).

2.1 HIPÓTESE GERAL DA PESQUISA

Com base nos trabalhos anteriores de Uppu *et al.*⁹⁵, Nakao *et al.*⁹⁶ e Yang *et al.*⁴, esperava-se que peroxinitrito poderia adicionar-se aos compostos α -dicarbonílicos gerando um aduto nitrosoperoxicarbonato que poderia, segundo Uppu *et al.*⁹⁵ e Nakao *et al.*⁹⁶, regenerar o composto carbonílico e isomerizar-se a nitrato (rota a, Esquema 9), ou sofrer clivagem homolítica da ligação O-O gerando $\bullet\text{NO}_2$, ácidos carboxílicos e radicais livres (rota b, Esquema 9).

Levantou-se a hipótese de que radicais acetila poderiam, além de adicionar o oxigênio molecular dissolvido na solução produzindo carboxilatos, ligar-se a aminogrupos de aminoácidos e nucleobases adicionados à mistura de reação, abrindo uma nova frente de investigação sobre acilação radicalar de biopolímeros celulares.

A elucidação do mecanismo de reação de peroxinitrito com os compostos α -dicarbonílicos, com formação de radicais acila e de oxigênio singlete lançou mão de técnicas de oximetria, espectrofotometria acoplada à *stopped-flow*, ressonância paramagnética eletrônica em fluxo e com captadores de spin, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), quimiluminescência com fotomultiplicadora ultrasensível no

infravermelho, supressão física e química de oxigênio singlete, captação química de oxigênio singlete, marcação isotópica do oxigênio molecular e espectrometria de massas (EM).

2.1.1 Hipótese de Trabalho com Biacetilo

A partir de biacetilo, esperava-se que a adição nucleofílica de peroxinitrito à sua carbonila através do mecanismo proposto por Uppu *et al.*⁹⁵ e Nakao *et al.* (rota b, Esquema 9), levasse à produção de $\bullet\text{NO}_2$, acetato e radical acetila, conforme sumarizado no Esquema 10.

Esquema 10. Mecanismo Hipotético para a Geração de Radical Acetila e Acetato pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito.

Uma vez na presença de oxigênio, dissolvido no meio reacional, o radical acetila reagiria com o oxigênio produzindo um radical acetilperoxila que, por aniquilação, geraria um radical acetoxila. A colisão deste radical com o radical acetila (reação birradicalar, controlada por difusão) geraria anidrido de ácido acético cuja hidrólise gera ácido acético (Esquema 11). Já na presença de aminoácidos e bases nucleicas, imaginou-se que pudesse ocorrer, competitivamente à adição de O_2 , acetilação radicalar dessas biomoléculas.

Esquema 11. Mecanismo Hipotético para o Consumo de O_2 por Radical Acetila Produzindo Ácido Acético.

2.1.2 Hipótese de Trabalho com Metilglioxal

Como o metilglioxal tem duas carbonilas, sendo uma de natureza aldeídica e outra cetônica, há formalmente duas possibilidades de adição, uma no C¹ e outra no C², conforme Esquema 12. Uma vez que aldeídos são mais reativos do que cetonas, esperava-se que a reação procedesse prevalentemente pela adição ao C¹ (rota 1 do Esquema 12 favorável à rota 2). De forma análoga com o biacetilo, esperava-se que o radical acetila produzido por este sistema consumisse oxigênio formando acetato (Esquema 11) e que, na presença de modelos de biomoléculas, este radical acetila também pudesse ser capaz de formar adutos da acetilação radicalar.

Esquema 12. Mecanismo Hipotético para a Reação de Peroxinitrito com Metilglioxal. Pelo fato de aldeídos serem mais reativos do que cetonas, espera-se que a rota 1 seja predominante⁹⁹.

2.1.3 Hipótese de Trabalho com Glioxal

A adição de peroxinitrito à carbonila do glioxal poderia produzir radical formila e formiato (Esquema 13).

Esquema 13. Mecanismo Hipotético para a Produção de Radical Formila pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito.

Uma vez que o radical formila apresenta um átomo de hidrogênio geminal à carbonila, esperava-se que, na presença de oxigênio, formar-se-ia o radical formilperoxila o qual, via reação de Russell^{81,86-90}, pudesse produzir oxigênio molecular no estado singlete, dióxido de carbono e formiato (Esquema 14).

Esquema 14. Geração de Oxigênio Molecular Singlete ($^1\Delta_g$) Através de Radical Formila pelo Mecanismo de Russell.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes usados nos experimentos foram obtidos da Sigma-Aldrich-Fluka ou Merck, com exceção do captador de spin 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO) que foi adquirido da Dojindo e do captador de oxigênio singlete 9,10-divinilantraceno disulfonato de sódio (AVS) que foi cedido pelo Professor Paolo Di Mascio (IQUSP) que o sintetizou segundo o método de Nardello *et al.*¹⁰⁰.

3.1.1 Preparação do Peroxinitrito

Segundo a literatura, peroxinitrito pode ser preparado principalmente através de: (i) reação de peróxido de hidrogênio com nitrito de sódio em meio ácido, produzindo ácido peroxinitroso (instável), seguida de adição de hidróxido de sódio para alcalinizar o pH e estabilizar a solução de peroxinitrito¹⁰¹; (ii) reação de óxido nítrico gasoso com superóxido de potássio sólido, produzindo peroxinitrito de potássio sólido⁹²; (iii) reação de superóxido de tetrametilamônio com óxido nítrico em amônia líquida⁹²; e (iv) ozonólise de solução aquosa básica de azida de sódio¹⁰². Para os experimentos realizados, peroxinitrito foi preparado através de adaptações do método (i)¹⁰¹. Através de soluções resfriadas a 4°C, ácido peroxinitroso foi obtido pela mistura de uma solução aquosa de NaNO₂ 0,6 M com uma solução aquosa de H₂O₂ 0,7 M em meio ácido (HCl 0,6 M), sendo posto em fluxo com uma solução aquosa de NaOH 1,5 M, formando peroxinitrito em meio básico. O excesso de H₂O₂ existente na solução foi decomposto pela adição de MnO₂ granular em banho de gelo, sob agitação e no escuro, até não se observar mais liberação de O₂ pela solução. Para a purificação da solução de peroxinitrito, esta foi colocada em tubos de centrifugação de 50 mL e levada ao freezer por pelo menos 12 h. O descongelamento fracionado parcial da solução rendeu

alíquotas alcalinas de peroxinitrito de 200-450 mM, sendo estas estocadas a -80°C em microtubos de centrifugação de 1 mL e filtradas em Millipore de 22 μm de poro antes do seu uso, para remover MnO_2 remanescente. Antes do uso, as alíquotas foram dosadas por espectrofotometria a 302 nm (comprimento de máxima absorção do peroxinitrito) em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e sua concentração calculada através do seu coeficiente de absorvidade molar em 302 nm ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)⁹⁹, sendo necessária uma diluição prévia de 10 vezes e outra subsequente de 100 vezes da solução estoque de peroxinitrito em solução aquosa de NaOH 1 M a 4°C para a dosagem.

3.1.2 Dosagem da Solução Estoque de Peróxido de Hidrogênio

Solução aquosa de H_2O_2 , adquirida da Merck, estocada a 4°C , foi dosada por espectrofotometria a 240 nm em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico antes de ser usada através de sua diluição em água Milli-Q a 4°C , tendo a sua concentração calculada através de seu coeficiente de absorvidade molar a 240 nm ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁰³.

3.1.3 Preparo das Soluções Tampão de Fosfato de Sódio

As soluções de tampão fosfato de sódio utilizadas para a realização dos experimentos foram preparadas pela dissolução do sólido comercial adquirido da Merck de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio monobásico monohidratado) em água milli-Q para se obter uma solução de fosfato de sódio ácida, e do sólido comercial de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio dibásico dodecahidratado) em água milli-Q para se obter uma solução de fosfato de sódio básica em balões volumétricos apropriados. Pela mistura das soluções ácida e básica equimolares em fosfato e da medida do pH final da solução com um pHmetro foi possível preparar soluções de tampão fosfato de pH de 6,2 a 8,2 nas concentrações utilizadas nos experimentos. Todas as

soluções tampão de fosfato de sódio foram tratadas por 24 hs com Chelex-100 para remoção de traços de íons de metal contaminante e filtradas antes de seu uso.

3.1.4 Preparação do Captador de Spin DNBNS

Ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfônico (DBNBS) foi preparado de acordo com a literatura¹⁰⁴. Ácido 3,5-dibromosulfanílico (3,52 g) foi adicionado em uma mistura de ácido acético glacial (30 mL) com uma solução de peróxido de hidrogênio aquoso a 30% (2 mL), e acetato de sódio anidro (0,8 g). A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 14 dias formando precipitados de cor de palha que foram filtrados e lavados uma vez com ácido acético (5 mL) e três vezes com éter seco (50 mL). O ácido acético foi removido por meio de cristalização a partir de etanol, obtendo-se um sólido amarelado de ponto de fusão $\approx 300^{\circ}\text{C}$ correspondente ao 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfonato de sódio.

3.1.5 Destilação do Biacetilo

Biacetilo foi adquirido da Aldrich e destilado em um miniforno destilador Büchi constituído por cinco bulbos horizontais, sob rotação constante e a 180°C , com resfriamento do destilado em gelo seco e álcool. Alíquotas do destilado do segundo bulbo foram coletadas e realiquotadas em microtubos de centrifugação de 200 μL e estocadas a -20°C até seu uso.

3.1.6 Dosagem da Solução Estoque Comercial de Metilglioxal

Solução estoque comercial de metilglioxal foi adquirida da Aldrich e utilizada sem purificação prévia. A dosagem da solução comercial estoque foi feita através da derivatização de 25 μL desta solução comercial com 25 μL de água milli-Q e 4 mL de uma solução derivatizante (0,2 mmol de 2,4-dinitrofenilhidrazina em 12 mL de ácido clorídrico fumegante

em 100 mL de etanol absoluto) a 42°C por 40 min. A absorbância da solução derivatizada por espectrofotometria foi medida a 432 nm, sendo calculada a sua concentração através de seu coeficiente de absortividade molar ($\epsilon_{432\text{nm}} = 39300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁰⁵, obtendo-se a concentração de 5,5 M de metilglioxal na solução comercial estoque em água.

3.1.7 Preparo das Soluções Estoque de Compostos Carbonílicos

Os compostos carbonílicos estudados foram previamente diluídos no tampão fosfato de sódio utilizado em cada experimento a concentrações de 50 mM a 1 M. As soluções estoque foram homogeneizadas e mantidas em banho de gelo e sob o abrigo da luz por 1 h antes dos experimentos.

3.1.8 Preparo das Soluções Estoque de Captadores de Spin

Solução estoque do captador de spin 2-metil-2-nitrosopropano (MNP) (0,4 M) foi preparada em acetonitrila 1 h antes do uso e mantida no escuro até seu uso. Já as soluções estoque de DMPO (1 M) e DBNBS (50 mM) foram preparadas no tampão de reação empregado em cada experimento e mantidas no escuro e em banho de gelo seu uso.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudos Cinéticos com Peroxinitrito

O monitoramento do decaimento temporal da absorbância do máximo de absorção do peroxinitrito (302 nm) foi realizado na ausência e presença de biacetilo, através de um espectrofotômetro comercial provido de *stopped-flow* da Applied Photophysics modelo SX-18V com injeção pneumática simétrica (biacetilo, acetoína, metilglioxal, glioxal e AVS) ou

assimétrica na proporção de 25:1 (acroleína) de duas soluções estoque (A e B) a uma cela de quartzo. A temperatura da cela de reação e leitura foram eletronicamente monitoradas pelo equipamento, mantida constante a $25,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ através de um banho de água circulante termostatizado. A solução A era composta pela solução estoque alcalina de peroxinitrito diluída em H_2O gelada (200-500 μM) e a solução B por tampão fosfato de sódio na ausência ou presença de biacetilo, acetoína, metilglioxal, acroleína, glioxal ou AVS, sendo feitas as medidas em concentrações crescentes do composto alvo do peroxinitrito. As curvas de decaimento temporal da absorbância do sistema para biacetilo, acetoína, metilglioxal, acroleína e glioxal receberam o tratamento de pseudo-primeira ordem, obtendo-se assim os coeficientes angulares correspondentes às constantes de pseudo-primeira ordem aparentes $k_{\text{obs,ap}}$ (s^{-1}) para cada curva. A constante de reação aparente de segunda ordem $k_{2,\text{ap}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para cada reação com peroxinitrito foi calculada pelo coeficiente angular da reta resultado da projeção de $k_{\text{obs,ap}}$ (s^{-1}) pela concentração (M) do composto alvo do peroxinitrito utilizada, sendo cada ponto do gráfico o resultado de uma média de 9-12 experimentos independentes. Através do valor de $k_{2,\text{ap}}$ foi estimado o valor do k_2 de reação no meio estudado para biacetilo, acetoína, metilglioxal, acroleína e glioxal através da equação proposta por Yang *et al.*⁴, $k_2 = k_{2,\text{ap}} (1 + [\text{hidratos}] \div [\text{composto carbonílico não hidratado}])$. O perfil de pH da reação foi obtido pelo traçado do gráfico dos resultados de $k_{\text{obs}} - k_0$ (s^{-1}) em função do pH do tampão fosfato. O efeito da concentração de fosfato no meio foi avaliado pela projeção dos resultados de $k_{\text{obs}} - k_0$ (s^{-1}) *versus* concentração do tampão fosfato de sódio utilizada, de força iônica constante igual a 2 (compensada pela adição de NaCl ao tampão), de pH 7,2.

3.2.2 Oximetria

As medidas da concentração de oxigênio para os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito foram realizadas em um oxímetro “Hansatech Oxygraph” equipado

com um eletrodo de Clark. Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato de sódio 200 mM de pH 7,2 a 37°C ($[O_2 \text{ dissolvido}] \approx 220 \mu\text{M}^{106}$) no caso do biacetilo e a 25°C ($[O_2 \text{ dissolvido}] \approx 240 \mu\text{M}^{106}$) no caso do metilglioxal. As corridas foram iniciadas com a adição da solução estoque alcalina de peroxinitrito com uma seringa de vidro à cela de leitura cotendo a solução tampão na ausência ou presença do composto carbonílico estudado já estabilizada e sob agitação eletromagnética constante.

3.2.3 Ressonância Paramagnética Eletrônica

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica que detecta espécies paramagnéticas, ou seja, que apresentam um elétron desemparelhado. É importante no estudo de metais de transição e de radicais livres. Nesta técnica, há acoplamento dos spins dos elétrons sob o campo magnético do equipamento, podendo o momento magnético de cada elétron ser paralelo (menor estado de energia) ou antiparalelo (maior estado de energia) ao sentido do campo magnético. A diferença de energia entre estes estados é igual a energia da radiação incidente na condição de ressonância, sendo esta responsável pelo sinal de ressonância paramagnética eletrônica. do núcleo do átomo contendo elétron desemparelhado tiver um spin nuclear diferente de zero, o átomo possui um campo magnético associado, originando um acoplamento hiperfino, causando o desdobramento do sinal, que também é afetado pelos demais átomos da espécie. Como nem sempre é possível observar diretamente os radicais livres pelo fato da sua concentração poder ser inferior ao limite de detecção do equipamento, ou de seu sinal não ser observável a temperatura ambiente, pode-se usar captadores de spin. Estes consistem na reação de adição do radical livre a um composto diamagnético que produz um radical livre de meia-vida maior e que pode ser acumulado, atingindo uma concentração detectável. Nitróxidos são relativamente estáveis, porque o elétron não emparelhado é estabilizado por ressonância¹⁰⁷.

3.2.3.1 Experimentos Realizados em Celas

Espectros de ressonância paramagnética eletrônica foram conduzidos a 20°C em um espectrômetro “Bruker EMX” em células tipo “flat” de quartzo de 200 µL de capacidade em cavidade padrão (SD) para os experimentos com biacetilo e metilglioal ou de alta sensibilidade (HS). O início da leitura dos espectros foi realizado após a tunagem do sistema e dado o tempo de incubação da amostra de reação de cada experimento. As amostras foram realizadas em tampão fosfato de sódio na presença de 20 mM de MNP, 10 mM de DBNBS ou 100 mM de DMPO e na ausência ou presença dos compostos carbonílicos estudados. A solução de peroxinitrito era a última a ser adicionada ao sistema, sob agitação com turbilhonamento em um agitador de tubos de ensaio “Vortex”. As condições instrumentais de leitura dos espectros estão marcadas nas legendas das figuras.

3.2.3.2 Experimentos Realizados em Fluxo

As experiências foram conduzidas à temperatura ambiente (20±2°C) em um espectrômetro “Bruker EMX” equipado com uma cavidade de fluxo Bruker ER 4117 D-MTV com um ressonador dielétrico dotado de misturador com 9 milímetros de distância entre a célula de mistura e o centro do ressonador. Os reagentes empregados foram colocados em seringas montadas sobre uma bomba (Harvard Apparatus 22) e injetados no ressonador sob fluxo constante. As condições experimentais e as configurações do equipamento são descritos nas legendas das figuras. O campo magnético foi calibrado com o nitróxido de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-*N*-oxila (TEMPOL), cujo valor de g é 2,0056¹⁰⁸. As simulações de computador de espectros foram realizadas usando o programa WINSIM¹⁰⁹.

3.2.4 Análise de Produtos Finais de Reação do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar

Os eletroferogramas referentes às análises das amostras finais de reação foram obtidos em um sistema de eletroforese capilar “Agilent Technologies”, modelo “HP ³D CE”, equipado com um detector com varredura de diodos fixado em 191 nm, com temperatura do sistema mantida eletronicamente a 25°C, em capilares de sílica fundida da “Polymicro Technologies” de 48,5 cm de comprimento total (40 cm até o detector) com 75 µm de diâmetro interno (375 µm de diâmetro externo). O eletrólito de corrida era composto por um tampão de 20 mM de tetraborato de sódio de pH 9,1 com 0,3 mM do inversor de fluxo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). As amostras foram injetadas pelo método hidrodinâmico com 50 mbar de pressão por 3 s. A voltagem aplicada para a corrida foi constante de -22 kV. As amostras de reação foram preparadas para análise pela adição de água, solução de ácido fosfórico em concentração suficiente para manter o pH final da amostra de reação entre 7,1-7,5, biacetilo e, por último, peroxinitrito sob agitação vigorosa com turbilhonamento em um agitador de tubos de ensaio “Vortex”. Após no mínimo 4 min, padrão interno de ácido 2-hidroxiisobutírico (1 mM) foi adicionado à mistura final de reação e esta analisada no equipamento. Testes foram feitos com 20 min e 24 h de incubação, não sendo observadas mudanças consideráveis nos resultados das análises.

3.2.5 Análise de Produtos Finais de Reação (Carboxilatos) do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar

Carboxilatos foram analisados com um sistema de eletroforese capilar (modelo P/ACE 551) da Beckman Instruments (Fullerton, CA) equipado com um detector de UV com filtro regulado para 254 nm para a detecção indireta, a 25°C. O eletrólito de corrida foi de 10 mM de ácido 3,5-dinitrobenzóico (DNB), com 0,10 mM de CTAB (inversor de fluxo), com o pH

final ajustado para 3,6 pela adição de NaOH concentrado. Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) de 50,0 cm de comprimento total, sendo 40 cm de comprimento até o detector (efetivo) e 50 μm de diâmetro interno com 375 μM de diâmetro externo. A separação foi realizada a uma voltagem constante de -20 kV . As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com 1 psi de pressão por 3 s. Alíquotas de peroxinitrito foram adicionadas à solução contendo metilglioxale ácido fosfórico (2,5-11,0 mM) suficiente para se obter um pH final na faixa de 7,1-7,5 sob agitação vigorosa por Vortex imediatamente antes das análises. Ácido oxálico (1 mM) foi usado como padrão interno.

3.2.6 Análise de Produtos Finais de Reação do Sistema Glioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar

As análises de formiato foram realizadas num aparelho de eletroforese capilar Beckman P/551 equipado com um detector de UV com filtro regulado em 254 nm para a detecção indireta. O eletrólito de corrida 10 mM de DNB, com 0,10 mM de CTAB como inversor de fluxo eo pH final foi ajustado para 3,2 com adição de NaOH concentrado. Foram utilizados capilares de sílica fundida com 50 cm de comprimento total (40 cm efetivo até o detector) e 75 μM de diâmetro interior por 375 μM de diâmetro externo. A separação foi realizada a uma voltagem constante de -20 kV . Amostras das misturas de reação obtidas de 1,0-10 mM glioxal tratados com 1,0-5,0 mM de peroxinitrito foram injetadas hidrodinamicamente a uma pressão de 1 psi por 3 s.

3.2.7 Análise das Biomoléculas Acetiladas pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por CLAE-EM

As análises de CLAE-EM foram realizadas em um sistema “1100 Agilent HPLC” constituído por bomba binária, desgaseificador de soluções automático com compartimento termostatzado eletronicamente para amostras e da coluna, acoplados a um espectrômetro de massas de captura de íons do tipo quadrupolo triplo híbrido “2000 Q TRAP”. Para as corridas, foi usada uma coluna polar de fase reversa revestida por grupos éter-fenila “Synergi™ polar RP” com partículas de 4 µm e coluna de 150 mm de comprimento por 2,1 mm de diâmetro. O sistema de eluição foi constituído pelo solvente A: fase aquosa com 0,1% de ácido fórmico e 1,0 mM de formiato de amônio, e pelo solvente B: 0,1% de ácido fórmico e 1,0 mM de formiato de amônio em 19 partes de acetonitrila para 1 parte de água em um fluxo de 250 µL/min. Os produtos de reação com L-histidina foram analisados por eluição isocrática de 95% do solvente A e 5 % do solvente B, enquanto que os produtos de reação com dGuo foram analisados por eluição em gradiente linear de 95% do solvente A por 30 s a 95% do solvente B até 7 min, mantendo 95% do solvente B até o final da corrida em 11 min. O volume de injeção foi de 5 µL em todas as análises. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo sob as seguintes condições instrumentais: voltagem: 4000 V; cortina de gás: 25; temperatura: 370°C;

3.2.8 Análise de L-Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar Acoplada à EM

Todas as análises foram realizadas em um sistema de eletroforese capilar P/ACE MDQ da Beckman Instruments, acoplado a um espectrômetro de massas da Thermo Finnigan modelo LCQ Ion Max avançado com uma fonte de íons por pulverização de elétrons e um analisador de captação de íons da Thermo Electron Corporation (Waltham, MA). O solvente

auxíliar (mistura de metanol/água/ácido acético, 50:49,5:0,5) foi bombeado (5 mL/min) para a interface com uma seringa de Hamilton (Reno, NV) instalado no espectrômetro de massas. Usou-se capilar de sílica fundida da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) com comprimento total de 90 cm e diâmetro interno de 50 μm . A separação foi realizada a uma voltagem constante (25 kV). O tampão de separação foi composto por acetato de amônio 50 mM, pH 3,5. O capilar foi pré-condicionado com 1,00 M de NH_4OH , água desionizada, e finalmente pelo tampão de separação por 5 minutos em cada etapa, a uma pressão de 50 psi. As amostras foram injetadas de forma hidrodinâmica a 2 psi por 10 s. As condições experimentais espectrometria de massas foram as seguintes: número de leituras, 3; tempo da leitura, 200 ms; temperatura do capilar, 275°C; tensão da pulverização de elétrons, 27 V, e deslocamento da lente de tubo, -8. Os experimentos de fragmentação foram realizados no modo de íon positivo com uma tensão de pulverização iônica de 4,5 kV. A seleção espectrométrica de massa foi realizada com o software 1.4 Xcalibur SR1 (Thermo Electron Corp), utilizando infusão direta de 20 μM de L-lisina, a uma pressão de 10 psi. Um sinal de limite mínimo de intensidade de 1×10^3 foi definido para a aquisição dos dados. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e de varrimento à vazão de 15 e 5 unidades arbitrárias, respectivamente, e hélio foi utilizado para o processo de fragmentação.

3.2.9 Detecção de Emissão de $\text{O}_2\ ^1\Delta_g$ no Infravermelho

A fotoemissão monomolecular em 1270 nm, atribuível ao decaimento do oxigênio singlete $\ ^1\Delta_g$ ao estado triplete, foi monitorada por um equipamento de contagem de fótons montado conforme descrito na literatura^{110,111}. O aparelho é constituído por um tubo fotomultiplicador resfriado a -80°C com nitrogênio líquido para reduzir efeitos de corrente. A potência foi fornecida por uma fonte de alimentação de alta tensão de corrente contínua, e o potencial aplicado foi fixado em -1,5 kV. A luz emitida pela amostra foi processada com uma

rede de difração capaz de selecionar comprimentos de onda na região do infravermelho. A saída do fototubo foi ligada ao computador e o sinal adquirido e processado digitalmente. As reações foram realizadas em solução de D_3PO_4/D_2O de pD entre 7,1 e 7,5 por meio da adição da solução de alcalina de peroxinitrito a 25°C no escuro, conduzidas em cubeta de quartzo sob agitação eletromagnética contínua à temperatura ambiente. A adição de peroxinitrito se deu após aproximadamente 20 s de contagem de luz como linha base em cada experimento, e a área do pico referente à fotoemissão foi calculada pelo software Origin 7 Pro.

3.2.10 Análise de $AVSO_2$ da Captação Química de Oxigênio Singlete por AVS

A geração de $O_2 (^1\Delta g)$ pela reação do glioxal com peroxinitrito, em meio aerado, foi realizada na presença de AVS, reportado como captador específico deste estado de oxigênio excitado eletronicamente¹⁰⁰. Para este fim, misturas finais de reação contendo glioxal e peroxinitrito na presença de AVS em D_3PO_4/D_2O foram analisadas por CLAE (Shimadzu, Tóquio, Japão), acoplado a um detector de UV ($\lambda = 215$ nm). Um volume de 25 μL das misturas finais de reação foi injetado no equipamento de CLAE equipado com uma coluna da “Phenomenex Peixes” C-18 (250 mm comprimento por 4,6 mm de diâmetro com partículas 5 μm). Um gradiente de metanol/acetonitrila (7:3, v:v) (solvente B) e formiato de amônio 25 mM (solvente A) foi utilizado com fluxo de 0,80 mL/min. Os compostos foram eluídos através da manutenção de solvente B a 18% durante 30 min, sendo o solvente B aumentado de 18% para 65% ao longo de 5 min.

Já a identificação do $AVSO_2$ gerado pelo sistema glioxal/peroxinitrito foi realizada em um sistema de CLAE (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Altricham, Reino Unido). Vinte microlitros da mistura final de reação foram injetados no equipamento de CLAE com uma coluna “Phenomenex Luna” C-18 (250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5 μm). Um gradiente de

metanol/acetonitrila (7:3, v:v) (solvente B) e formiato de amônio 25 mM (solvente A) foi utilizado a um fluxo de 0,80 mL/min. Os compostos foram eluídos através da manutenção de solvente B a 18% por 30 min, sendo o solvente B aumentado de 18 a 80% durante 10 minutos, e mantendo o solvente B a 80% durante mais de 5 min. Subsequentemente, o solvente B foi devolvido para a condição inicial, de 18% ao longo de 2 min, e foi mantida a esta condição durante 10 min. O modo de monitoramento de reações múltiplas foi utilizado para comprovar a transição de massa específica de $\text{AVS}^{16}\text{O}_2$ (m/z 210:194) e $\text{AVS}^{18}\text{O}_2$ (m/z 212:194), quando a reação foi processada com oxigênio marcado isotopicamente. A voltagem do capilar foi 3,5 kV, a energia de colisão 10 eV, a voltagem do cone de amostra 10 V e do cone de extração 4 V. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram mantidas a 100 e 200°C, respectivamente. A coluna de separação por CLAE e as condições experimentais foram as mesmas descritas acima. O fluxo dirigido para o espectrômetro de massa foi de 0,20 mL/min. Os experimentos com oxigênio isotopicamente marcado ($^{18}\text{O}_2$) com AVS foram realizados após remoção do $^{16}\text{O}_2$ na solução por congelamentos e descongelamentos sucessivos de uma solução de AVS 8,0 mM e 10,0 mM de glioxal em 1,0 mM de $\text{D}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$ sob vácuo. Este processo foi repetido pelo menos três vezes para assegurar a remoção completa de $^{16}\text{O}_2$. Depois disso, todo o sistema foi ligado a um cilindro de gás a 0,5 atm contendo oxigênio isotopicamente marcado ($^{18}\text{O}_2$) e a solução agitada eletromagneticamente durante 5 min, seguindo-se a injeção de 4,5 mM de peroxinitrito através de um septo de borracha. Os controles negativos foram executados, substituindo-se $^{18}\text{O}_2$ por $^{16}\text{O}_2$ ou N_2 .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIACETILO

4.1.1 Estudo Cinético do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito

O monitoramento temporal da absorbância em 302 nm atribuível ao peroxinitrito (500 μM) na presença de biacetilo (0-10 mM) em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C, revelou que quanto maior a concentração de biacetilo no meio, mais rápido é o decaimento da absorbância da solução (Figura 6).

Figura 6. Decaimento Temporal da Absorbância de Peroxinitrito na Presença de Biacetilo. Peroxinitrito 500 μM na ausência de biacetilo (a) e na presença de 2 mM (b), 4 mM (c), 6 mM (d), 8 mM (e) e 10 mM (f) de biacetilo em tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C. A absorbância em 302 nm foi normalizada $[(\text{Abs} - \text{Abs}_\infty) \div (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_\infty)]$.

O tratamento dos dados produziu as constantes de pseudo-primeira ordem, $k_{\text{obs,ap}}$ (s^{-1}) da reação em função da concentração de biacetilo presente no meio (Figura 7). O coeficiente angular da reta obtida resultou no valor da constante de velocidade de segunda ordem aparente, $k_{2,\text{ap}} = 2,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor é próximo ao obtido anteriormente por Yang *et al.*⁴ ($k_{2,\text{ap}} = 3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que estudaram este mesmo sistema em tampão fosfato de potássio 125 mM de pH 7,4 a 22°C com acetonitrila (9:1 v/v). Levando-se em conta as

considerações destes autores de que (i) apenas a forma dicetônica do biacetilo sofre adição nucleofílica do peroxinitrito, (ii) a forma hidratada não sofre reação de substituição nucleofílica por peroxinitrito, (iii) 76% do biacetilo está presente no meio reacional na forma hidratada, e (iv) $k_2 = k_{2,ap} \times (1 + [\text{biacetilohidratado}] \div [\text{biacetilo dicetônico}])$, podemos estimar que $k_2 = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor é maior do que os publicados para a reação de peroxinitrito com compostos monocarbonílicos ($4\text{-}100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e bastante próximo ao valor obtido por Lyman & Hurst⁹⁷ para a reação de peroxinitrito com CO_2 a 24°C ($k_2 = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e o obtido por Denicola *et al.*⁹⁸ a 37°C ($k_2 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Figura 7. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente da Reação de Peroxinitrito com Biacetilo. Projeção das constantes de pseudoprimeira ordem ($k_{obs,ap}$) em função da concentração de biacetilo presente na solução (mM), cujo coeficiente angular fornece o valor de $k_{2,ap} = 2,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Estudos do efeito do pH (6,4-8,0) do tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C presente no meio reacional foram conduzidos para peroxinitrito 500 μM na ausência de biacetilo e presença de 1 mM de biacetilo. O tratamento dos dados cinéticos revelaram as constantes de pseudoprimeira ordem k_0 e k_{obs} , respectivamente, para cada valor de pH estudado. A projeção dos valores de $k_{obs}-k_0$ versus pH do tampão traçou o perfil de pH em forma de sino expresso na Figura 8. Este perfil apresenta uma porção ascendente de reatividade do peroxinitrito frente ao biacetilo até o pH de 7,2, e uma curva descendente após este pH. Este comportamento pode ser explicado como resultante de dois fatores: (i) aumento da concentração de

peroxinitrito com o aumento do pH (pK_a ONOOH/ONOO⁻ = 7,2 para 500 mM de fosfato) e (ii) catálise ácida geral dos íons dihidrogenofosfato do tampão (pK_a H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ = 7,2), relatada por Yang *et al.*⁴ para biacetilo e outras cetonas. Ambos os fatores governam o aumento da velocidade da reação com o aumento do pH até 7,2, a partir do qual diminui a concentração do íon H₂PO₄⁻ catalisador da adição nucleofílica. Em outras palavras, o perfil de pH da reação deve espelhar a sobreposição das curvas de titulação do ácido peroxinitroso e do íon H₂PO₄⁻.

Figura 8. Perfil de pH da Reação de Biacetilo com Peroxinitrito. Projeção das constantes de pseudo-primeira ordem obtidas com 1 mM de biacetilo e 500 µM de peroxinitrito, subtraído do valor da constante de pseudo-primeira ordem da decomposição espontânea de peroxinitrito 500 µM em tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C pelo pH de cada sistema tampão.

4.1.2 Estudo Cinético do Sistema Acetoína/Peroxinitrito

Para efeito de comparação, foi estudado o efeito da substituição do átomo de oxigênio de um grupo carbonílico do biacetilo por um grupo hidroxila, resultando em acetoína, o produto de redução do biacetilo por dois elétrons.

O monitoramento temporal da absorbância do peroxinitrito (200 µM) em 302 nm na presença de acetoína (0-10 mM) em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C, também revelou dependência da concentração, sendo mais rápido o decaimento quanto maior é a concentração de acetoína. O tratamento dos dados cinéticos da mesma forma já descrita

anteriormente produziu a reta da Figura 9, cujo coeficiente angular revelou uma constante de velocidade de segunda ordem aparente, $k_{2,ap} = 7,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Considerando que a hidratação da acetoína em água é praticamente desprezível¹¹², pode-se estimar que $k_2 \approx 7,5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor é comparável aos publicados para a reação de peroxinitrito com compostos monocarbonílicos ($4\text{-}10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), portanto pouco maior do que o relatado para acetona ($k_2 = 4,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁴ e bastante inferior do que o valor publicado por Lyman & Hurst para a reação de peroxinitrito com CO_2 a 24°C ⁹⁷ e do que o valor aqui obtido e publicado para a reação de biacetilo com peroxinitrito a 25°C ($k_2 = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)¹¹³.

Figura 9. Determinação da Constante de Velocidade de Segunda Ordem da Reação de Peroxinitrito com Acetoína. Constantes de pseudo-primeira ordem ($k_{obs,ap}$) em função da concentração de acetoína (mM), em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C .

4.1.3 Estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito

Usando 20 mM de MNP como captador de spin para radicais gerados pelo sistema biacetilo/peroxinitrito, em tampão fosfato de sódio aerado 500 mM, pH 7,2, a 20°C , após 4 min de incubação, obteve-se um espectro de ressonância paramagnética eletrônica assinalável a um aduto centrado em carbono com o MNP, de constante de acoplamento hiperfino $a_N = 0,83 \text{ mT}$, compatível com o valor de constante de acoplamento hiperfino do aduto do radical acetila com o MNP segundo a literatura^{39,107,114}. Também foi possível observar que a

amplitude do sinal responde positivamente à concentração tanto de biacetilo quanto de peroxinitrito no meio reacional (Figura 10). Este resultado corrobora o mecanismo proposto de geração de radical acetila pelo sistema biacetilo/peroxinitrito, que inclui adição nucleofílica do peroxinitrito ao biacetilo seguida de homólise de ligação O–O do aduto de adição com perda de $\bullet\text{NO}_2$ e posterior clivagem da ligação $^2\text{C}-^3\text{C}$ ao radical acetila e acetato (Esquema 10).

Figura 10. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito na Presença de MNP como Captador de Spin. Reação realizada em tampão fosfato de sódio 500 mM, pH 7,2, na presença de 20 mM de MNP e com 4 min de tempo de incubação a 20°C. **A:** Biacetilo (10 mM) na ausência (a) e na presença de 1 mM (b), 2,5 mM (c), e 5 mM (d) de peroxinitrito. **B:** Peroxinitrito (2,5 mM) na ausência (a) e na presença de 5 mM (b), 10 mM (c), e 20 mM (d) de biacetilo. Os espectros obtidos são compatíveis com o aduto de $\text{MNP-CH}_3\text{CO}\bullet$, cujo $a_N = 0,83$ mT. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,21 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^3$.

Na presença de bicarbonato (0-20 mM), 5 mM de biacetilo e 2,5 mM de peroxinitrito, pode-se observar que quanto maior é a concentração de bicarbonato no meio, maior é a supressão do sinal do aduto do radical acetila com MNP, sendo esta total para 20 mM de bicarbonato (Figura 11). Este resultado demonstra uma possível competição entre o biacetilo e o CO_2 para a adição nucleofílica do peroxinitrito, visto que ambos têm constantes de

velocidade de valores próximos em condições semelhantes ($k_{2,\text{biacetilo}} = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 25°C^{113} ; $k_{2,\text{CO}_2} = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 24°C^{97}).

Figura 11. Efeito da Adição de Bicarbonato na Amplitude do Sinal do Espectro de Ressonância Paramagnética Eletrônica Atribuído ao Aduto $\text{MNP-CH}_3\text{CO}\cdot$ Oriundo do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito na Presença de MNP. Reação conduzida em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, na presença de 20 mM de MNP e com 4 minutos de incubação a 20°C . Biacetilo (5,0 mM) e peroxinitrito (2,5 mM) na ausência (a) e na presença de 2,5 mM (b), 5,0 mM (c), 10,0 mM (d), e 20 mM (e) de bicarbonato. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,21 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^3$.

4.1.4 Oximetria do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito

O monitoramento da concentração de oxigênio na solução contendo apenas peroxinitrito (0,25-1,0 mM) em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 37°C , mostrou liberação espontânea de oxigênio. Na presença de biacetilo (1,0-5,0 mM), essa produção é compensada pelo consumo do oxigênio presente na solução pelos radicais intermediários da reação. Como esperado, na ausência de peroxinitrito (controle), biacetilo não consumiu oxigênio durante o tempo monitorado (60 s). Fixando a concentração de peroxinitrito em 1 mM e variando a de biacetilo (1,0-5,0 mM) (Figura 12A), observou-se que quanto maior é a concentração de biacetilo, mais rápido e maior é o consumo de oxigênio da solução. Do mesmo modo, o aumento da concentração de peroxinitrito de 0,25-1,5 mM (Figura 12B) acelera o consumo do oxigênio dissolvido no meio reacional. Este consumo de oxigênio pelo

sistema é atribuível à reação do radical acetila gerado na reação com o oxigênio molecular dissolvido o qual deve gerar como produto final ácido acético, conforme proposto pelo mecanismo expresso no Esquema 11 da hipótese de trabalho.

Figura 12. Oximetria do Sistema Biacetilo/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C. **A:** Biacetilo (5,0 mM) (controle) na ausência de peroxinitrito (a) e biacetilo 1,0 mM (b), 2,0 mM (c), 3,0 mM (d), e 5,0 mM (e), tratado com peroxinitrito (1,0 mM). **B:** Biacetilo (1,0 mM) na ausência (a) e na presença de 0,25 mM (b), 0,50 mM (c), 0,75 mM (d), 1,0 mM (e), 1,25 mM (f), e 1,5 mM (g) de peroxinitrito.

4.1.5 Demonstração por Eletroforese Capilar da Geração de Acetato pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito

Peroxinitrito foi adicionado nas soluções aquosas contendo biacetilo e ácido fosfórico em água em microtubos de centrifugação de 2,0 mL cobertos com papel alumínio para minimizar o efeito da luz na reação. Para prevenir a interferência de fosfato em altas concentrações nos eletroferogramas, as reações tiveram o pH final medido e apenas as amostras com pH final na faixa de 7,1-7,5 foram analisadas por eletroforese capilar. A concentração de ácido fosfórico adicionado na solução antes da reação com o peroxinitrito foi previsto por cálculos de titulação com o objetivo de produzir um pH final igual a 7,2. Os eletroferogramas obtidos através das análises (simplificado na Figura 13) demonstram que acetato é produzido pelo sistema biacetilo/peroxinitrito, que a produção de acetato é dependente da concentração de ambos os reagentes. Espera-se que cada molécula de biacetilo gere duas moléculas de ácido acético, porém o cálculo da estquiometria desta reação é

dificultado pelo fato de que (i) o peroxinitrito, quando isolado, sofrer isomerização espontânea a nitrato (30%), (ii) o biacetilo está presente nas formas livre e monohidratada em solução e (iii) o radical acetila pode recombinar-se a biacetilo. Desta forma, estabelece-se uma competição entre vários eventos concomitantes e sucessivos, o que exige um tratamento cinético mais apurado dos dados para o cálculo inequívoco do rendimento da reação. Porém, em situações de excesso de biacetilo, este rendimento pode ser até mesmo estequiométrico à concentração de peroxinitrito adicionado, estando os valores sumarizados na Tabela 2. Estes resultados confirmam a hipótese de que radical acetila na presença de O_2 gera acetato, conforme proposto no Esquema 11. Traços de acetato (0,09 mM de acetato a partir de 5,0 mM de biacetilo) foram encontrados no experimento-controle, realizado na ausência de peroxinitrito, sendo este acetato gerado provavelmente pela oxidação de biacetilo pelo oxigênio dissolvido no meio catalisada por íons de metais de transição contaminantes (ferro, cobre).

Figura 13. Eletroferograma Indicativo da Presença de Acetato na Mistura Final de Reação de Biacetilo/Peroxinitrito. A reação foi realizada na presença (A) e ausência (B) de biacetilo. C: Mistura-padrão de reação: acetato + 2-hidroxi-isobutirado (padrão interno). Condições instrumentais: Eletrólito de corrida: 20 mM de tetraborato de sódio com 0,30 mM de CTAB de pH 9,0; Capilar de sílica fundida com comprimento até o detector de 40 cm, comprimento total de 48,5 cm, e diâmetro interno de 75 μ m; Detecção em 191 nm; Voltagem de separação de -22 kV; Injeção das amostras a 50 mbar por 3s a 25°C. Equipamento Aligent CE3D. Identificação dos compostos químicos: 1, brometo (pico de sistema oriundo do CTAB); 2, nitrito + nitrato; 3, fosfato; 4, acetato; 5, 2-hidroxiisobutirato.

Tabela 2. Rendimentos Químicos de Acetato (mM) Produzidos pela Reação de Biacetilo com Peroxinitrito.

[Peroxinitrito], mM	[Biacetilo], mM		
	0,50	2,0	5,0
0,00	Não detectado	Não detectado	0,09 ± 0,04
0,19	0,24 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,52 ± 0,05
0,25	0,32 ± 0,03	0,57 ± 0,06	0,65 ± 0,06
0,38	0,37 ± 0,04	0,72 ± 0,07	0,94 ± 0,09
0,56	0,41 ± 0,04	1,01 ± 0,06	1,2 ± 0,1
0,75	0,54 ± 0,04	1,18 ± 0,09	1,6 ± 0,1

A produção de acetato observada para o sistema biacetilo/peroxinitrito contradiz o estudo realizado por Yang *et al.*⁴ ao adicionar 0,322 mM de peroxinitrito a uma solução 1,61 mM de biacetilo em tampão fosfato de potássio 160 mM, pH 7,4, e analisar por cromatografia gasosa a quantidade de biacetilo presente na solução após a reação, concluindo que pelo método utilizado não havia consumo expressivo de biacetilo pelo peroxinitrito.

4.1.6 Demonstração da Acetilação de Biomoléculas pelo Sistema Biacetilo/Peroxinitrito por CLAE/EM

4.1.6.1 Acetilação de L-Histidina

O cromatograma com detecção por espectrometria de massas monitorada no modo positivo em 198 u, correspondente a um aduto protonado de acetil-L-histidina (m/z 198), de uma mistura final de reação contendo 2,0 mM de L-histina, 5 mM de biacetilo e 2,0 mM de peroxinitrito em tampão fosfato de sódio aerado 200 mM, pH 7,2, a 25°C, está representado na Figura 14A. Produtos atribuíveis à poliacetilação de histidina (monitoramento de 240 ou 282 u) não foram detectados. O espectro de massas do aduto de 198 u está representado na Figura 14B e é compatível com um aduto protonado de acetil-L-histidina, não sendo possível apenas por espectrometria de massas atribuir inequivocamente a posição da acetilação. Como

aminoácidos de cadeia apolar como alanina, valina e leucina também sofrem reações de acetilação pelo mesmo sistema nas mesmas condições,¹¹⁵ e que estudos teóricos conduzidos por Kyne *et al.*¹¹⁶ com metanoamina, etileno e aminoetileno indicaram que a energia de ativação para a adição de radical acetila às ligações C=N e C=C são muito menores no segundo caso, o qual prediz a formação de um radical centrado em carbono caso a formação do aduto ocorresse através da adição do radical acetila ao anel imidazólico da histidina, é tentador propor a acetilação como produtora do isômero α N-acetil-L-histidina.

Figura 14. Análise por CLAE-EM/EM da Reação de Biacetilo com Peroxinitrito na Presença de L-Histidina. **A:** Cromatograma da mistura final de reação de 5,0 mM de biacetilo tratado com 2,0 mM de peroxinitrito na presença de 2,0 mM de L-histidina em 200 mM de tampão fosfato pH 7,2 a 25°C com monitoramento por espectrometria de massas a 198 u. **B:** Espectro de massas compatível com o de acetil-L-histidina do pico de tempo de retenção de 1,80 min.

Este resultado comprova nossa hipótese de que a acetilação radicalar de resíduos de aminoácidos pelo radical acetila gerado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito pode ocorrer *in vitro*, sendo necessários estudos para demonstrar se esse tipo de reação pode ocorrer *in vivo*. De fato, a acetilação de resíduos de aminoácidos de peptídeos e de proteínas é um fator importante na bioquímica, havendo inúmeras pesquisas sobre a ação das enzimas acetilases e desacetilases como fatores de modulação de transcrição e expressão¹¹⁷, o que nos levou a cogitar a hipótese de que a acetilação radicalar desses resíduos *in vivo* pode alterar a homeostase celular.

4.1.6.2 Acetilação de dGuo

O cromatograma da mistura final de reação de biacetilo 5,0 mM com peroxinitrito 2,0 mM em tampão fosfato 200 mM, pH 7,2, a 25°C, na presença de 2,0 mM de dGuo foi obtido pelo monitoramento no modo positivo em 310 u (correspondente ao aduto protonado da dGuo monoacetilada) como precursor e está expresso na Figura 15A. Três picos (1, 2 e 3) com a mesma relação massa/carga de 310 u apareceram no cromatograma, sugestivos da formação de três isômeros derivados da acetilação da dGuo. Os espectros de massa/massa dos analitos de 1-3 estão demonstrados pelos espectros presentes na Figura 15B-D, respectivamente. Os analitos 1 e 2 apresentaram espectros de massas similares enquanto que o analito 3 não originou o fragmento m/z 194, sugerindo a acetilação na região da guanina somente com o m/z 194 referente a acetilguanina. Além disso, experimentos conduzidos pelo monitoramento no modo positivo em 352 e 394 u, referentes aos precursores da dGuo di- e tri-acetilada, respectivamente, demonstraram que apenas o íon de m/z 352 foi detectado (não mostrado). Ainda com o objetivo de comprovar que o analito 3 não produz o fragmento 194, um experimento EM³ foi conduzido usando o íon m/z 310 como precursor 1 e o 194 como precursor 2, não observado o analito 3 (não mostrado). Esses resultados podem ter

implicância bioquímica, sendo uma nova fonte de lesão em DNA, mais provavelmente mitocondrial, o qual em microambientes pode estar susceptível à formação de peroxinitrito e biacetilo em situações de alcoolemia. Nukaya *et al.*¹¹⁸ também relataram a acetilação de dGuo na incubação de café com metilglioxal e peróxido de hidrogênio.

Figura 15. Estudos de CLAE-EM/EM dos Produtos de Reação de Biacetilo com Peroxinitrito na Presença de dGuo. **A:** Cromatograma da mistura final de reação de 5,0 mM de biacetilo tratado com 2,0 mM de peroxinitrito na presença de 2,0 mM de dGuo em 200 mM de tampão fosfato pH 7,2 a 25°C. Picos 1, 2 e 3, atribuíveis aos adutos formados entre a dGuo e o radical acetila, foram monitorados em 310 u. Inserção em A mostra o rendimento do aduto do pico 1 em concentrações crescentes de biacetilo. **B-D:** Espectros de massas compatíveis com a acetil-dGuo dos picos 1-3, respectivamente.

4.2 METILGLIOXAL

4.2.1 Estudo Cinético do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito

O monitoramento da absorbância de peroxinitrito (200 μM) em 302 nm em função do tempo na presença de metilglioxal (0-20 mM) em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2 a 25°C, revelou que a velocidade de consumo de peroxinitrito aumenta com o aumento da concentração de metilglioxal no meio (Figura 16).

Figura 16. Efeito da Concentração de Metilglioxal na Velocidade de Consumo de Peroxinitrito. Absorbância normalizada $[(\text{Abs} - \text{Abs}_\infty) \div (\text{Abs}_0 - \text{Abs}_\infty)]$ de peroxinitrito 200 μM em 302 nm foi acompanhada em função tempo na ausência de metilglioxal (a) e na presença de 2 mM (b), 3 mM (c), 4 mM (d), 5 mM (e), 7,5 mM (f), 10 mM (g), e 20 mM (h) de metilglioxal em tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C.

O tratamento dos dados da cinética de segunda ordem (primeira ordem para ambos os reagentes) através de pseudo-primeira ordem, forneceu as constantes de pseudo-primeira ordem aparente $k_{\text{obs,ap}}$ (s^{-1}) em função da concentração de metilglioxal presente no meio. A projeção dos valores de $k_{\text{obs,ap}}$ para cada concentração de metilglioxal resultou na Figura 17, cujo coeficiente angular da reta calculada pelos seus pontos resultaram revelou $k_{2,\text{ap}} = 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Figura 17. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente para a Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito. Projeção das constantes $k_{obs,ap}$ pela concentração de metilglioxal presente na solução (mM), cujo coeficiente angular da curva é correspondente ao $k_{2,ap} = 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Considerando que (i) apenas a forma ceto-aldeídica do metilglioxal seja reativa para adições nucleofílicas do peroxinitrito, (ii) as formas hidratadas não são tão reativas, (iii) aproximadamente apenas 1% do metilglioxal está presente no meio reacional na forma ceto-aldeídica³⁶, e (iv) $k_2 = k_{2,ap} (1 + [\text{metilglioxal hidratado}] \div [\text{metilglioxal ceto-aldeídico}])^4$, pode-se estimar que $k_2 \approx 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor é maior do que os publicados para a reação de peroxinitrito com compostos monocarbonílicos ($4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), CO_2 e biacetilo^{4,113}.

Estudos do efeito do pH (6,2-8,2) do tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C presente no meio reacional foram conduzidos para peroxinitrito 200 μM na ausência de metilglioxal e presença de 3,0 mM de metilglioxal cujo tratamento dos dados cinéticos revelaram as constantes de pseudo-primeira ordem k_0 e k_{obs} , respectivamente, para cada valor de pH estudado. Projetando os valores de $k_{obs} - k_0$ pelo pH do tampão, obtivemos o perfil de pH expresso na Figura 18. Este perfil de pH revela uma curva compatível com uma equação de terceiro grau de reatividade ascendente do peroxinitrito frente ao metilglioxal até o pH de 7,2, com uma curva inflexão em valores próximos a 7,2 e consequente aumento após 7,6. Este fenômeno pode ser explicado como a soma de três fatores: (i) aumento da concentração de peroxinitrito com o aumento do pH ($\text{pK}_a \text{ ONOOH/ONOO}^- = 7,12$ para 250 mM de fosfato)⁹²,

(ii) um efeito de catálise ácida geral do ácido di-hidrogenofosfórico do tampão fosfato (pK_a $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-} = 7,2$), e (iii) a uma possível catálise de desidratação do metilglioxal hidratado pelo íon HPO_4^{2-} para pHs acima de 7,2, conforme proposto e observado por Thornalley e colab.³⁶ para seus estudos com o sistema aminoguanidina/metilglioxal.

A ocorrência de catálise geral básica e ácida do ânion fosfato na reação de peroxinitrito com metilglioxal foi suportada pela dependência linear de $k_{obs}(4,0 \text{ mM metilglioxal}, 200 \text{ } \mu\text{M peroxinitrito}) - k_0$ pela concentração do tampão fosfato de sódio de pH 7,2 utilizado (0,05-0,50 M), a uma força iônica constante igual a 2 corrigida pela adição de NaCl nos tampões empregados (Figura 19).

Figura 18. Perfil de pH obtido para a Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito. Projeção de $k_{obs} - k_0$ pelo pH do tampão utilizado para a reação de metilglioxal (3,0 mM) e peroxinitrito (200 μ M) em tampão fosfato de sódio 250 mM a 25°C.

Figura 19. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Metilglioxal com Peroxinitrito. Metilglioxal 4 mM com peroxinitrito 200 μM em tampão fosfato de sódio (50-500 mM) de força iônica 2 corrigida pela adição de NaCl a cada sistema tampão. Projeção de $k_{\text{obs}} - k_0$ pela concentração do tampão demonstra a catálise de fosfato na reação de adição nucleofílica de peroxinitrito ao metilglioxal.

4.2.2 Estudo Cinético do Sistema Acroleína/Peroxinitrito

Para fins de comparação, pelo fato de a acroleína ser um aldeído tóxico bastante reativo e de importância bioquímica, e por esta possuir dois sítios de adição nucleofílica (um para adições concertadas no carbono β a carbonila e outro para adições no carbono aldeídico), mostrou-se interessante fazer o estudo cinético da reação de peroxinitrito com acroleína.

Experimentos de monitoramento da absorbância de peroxinitrito (200 μM) em 302 nm, em função do tempo na presença de acroleína (0-40 mM) em tampão fosfato de sódio 500 mM, pH 7,2, a 25°C, revelaram que a velocidade de reação responde positivamente ao aumento da concentração de acroleína no sistema. Analisando os dados por pseudo-primeira ordem, obteve-se as constantes de pseudo-primeira ordem $k_{\text{obs,ap}}$ (s^{-1}) em função da concentração de acroleína presente na solução, cuja projeção dos valores das constantes de pseudo-primeira ordem para cada concentração de acroleína estudada resultaram na Figura 20. O coeficiente angular da reta calculada pelos seus pontos resultaram no valor da constante de velocidade de segunda ordem aparente, $k_{2,\text{ap}} = 5,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Considerando que (i)

apenas a forma livre acroleína seja reativa para adições nucleofílicas do peroxinitrito, (ii) a forma hidratada (3-hidroxiopropanal) não seja reativa, (iii) 93% da acroleína está presente no meio reacional na forma hidratada¹¹⁹, e (iv) $k_2 = k_{2,ap} \times (1 + [\text{acroleína hidratada}] \div [\text{acroleína livre}])^4$, pode-se estimar que $k_2 = 7,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este valor é uma ordem de grandeza superior ao descrito na literatura para compostos monocarbonílicos ($4\text{-}100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Já o estudo do pH na velocidade da reação (Figura 21) demonstrou que uma curva em forma de sino com máximo em pH 6,8 e um ligeiro aumento em pH acima de 8,0. Este perfil de pH também pode ser explicado pelos três fatores já discutidos anteriormente: (i) a parte ascendente da curva (6,2-6,8) reflete o aumento da concentração de peroxinitrito no meio reacional ($\text{pK}_a \approx 7,33$ para 650 mM de fosfato); (ii) a parte descendente é atribuída à diminuição da concentração de H_2PO_4^- ($\text{pK}_a = 7,2$), o qual é um catalizador geral básico para a reação de adição nucleofílica; (iii) uma possível catálise geral básica de desidratação da acroleína pelo aumento de íons HPO_4^{2-} no meio reacional, a exemplo do descrito para o estudo da reação de metilglioxal com a aminoguanidina por Thornalley *et al.*³⁶.

A ocorrência da catálise geral básica e catálise geral ácida por fosfato na reação de peroxinitrito com acroleína, também observada para metilglioxal/peroxinitrito¹²⁰ e biacetil/peroxinitrito⁴, foi corroborada pela dependência linear de $k_{\text{obs}} - k_0$ na concentração do tampão fosfato de sódio de pH 7,2 utilizado (0,096-0,96 M, força iônica constante corrigida pela adição de NaCl) (Figura 22).

Figura 20. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente da Reação de Acroleína com Peroxinitrito. Projeção dos valores da constante de pseudo-primeira ordem pela concentração de acroleína presente no meio a 25°C em tampão fosfato de sódio 500 mM, pH 7,2, na presença de 200 µM de peroxinitrito.

Figura 21. Perfil de pH da Reação de Acroleína com Peroxinitrito. Projeção de $k_{obs} - k_0$ pelo pH do tampão utilizado para a reação de acroleína (30 mM) e peroxinitrito (200 µM) em tampão fosfato de sódio 700 mM a 25°C.

Figura 22. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Acroleína com Peroxinitrito. Acroleína (20 mM) com peroxinitrito (200 µM) em tampão fosfato de sódio (0,096-0,96 M) de força iônica constante corrigida pela adição de NaCl a cada tampão a 25°C. Projeção de $k_{obs} - k_0$ pela concentração do tampão demonstra a catálise de fosfato na reação de adição nucleofílica de peroxinitrito a acroleína.

4.2.3 Estudo de Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito

4.2.3.1 Experimentos com MNP como Captador de Spin

Usando 20 mM de MNP como captador de spin para radicais gerados pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito, em tampão fosfato de sódio aerado 250 mM, pH 7,2 a 20°C, após 4 min de incubação, pode-se observar em celas do tipo “flat” de quartzo um espectro de ressonância paramagnética eletrônica atribuível ao aduto $\text{MNP-CH}_3\text{CO}^\bullet$ com $a_N = 0,83 \text{ mT}^{39,107,114}$. Também foi possível observar que a amplitude do sinal aumenta com o aumento da concentração de metilglioxal ou de peroxinitrito (Figura 23). Este resultado corrobora o mecanismo proposto pela rota 1 do Esquema 12 da reação de geração de radical acetila pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito após a adição nucleofílica do peroxinitrito a carbonila aldeídica do metilglioxal com subsequente homólise de ligação O–O do aduto de adição com perda de $^\bullet\text{NO}_2$ e posterior clivagem da ligação $\text{C}^1\text{--C}^2$ produzindo radical acetila e formiato. O aduto de radical formila com MNP, de $a_N = 0,70\text{--}0,77 \text{ mT}$ e $a_H = 0,14\text{--}0,25 \text{ mT}^{121}$, não foi observado nos experimentos realizados, fortalecendo a hipótese de ocorrência predominante da rota 1 do Esquema 12. No entanto, experimentos posteriores com glioxal, a serem detalhados em item específico, mostraram que a captação de radical formila pelo MNP não é uma tarefa trivial, enquanto que a formação do aduto do radical acetila com MNP é bastante favorável em relação a outros radicais centrados em carbono¹²². O fato do aduto do radical formila com MNP não ter sido detectado nesses experimentos não exclui a possibilidade de ocorrência da rota 2, tal como proposto inicialmente¹²⁰.

Na presença de bicarbonato (0-12,5 mM), 20 mM de metilglioxal e 2,5 mM de peroxinitrito, pode-se observar que quanto maior é a concentração de bicarbonato no meio, maior é a supressão do sinal causada por ele, sendo esta total para concentrações acima de 10 mM de bicarbonato (Figura 24). Este resultado demonstra uma possível competição do

metilglioxal com o CO_2 pela a adição nucleofílica do peroxinitrito, visto que ambos têm constantes de velocidade de valores próximos em condições similares ($k_{2,\text{metilglioxal}} \approx 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 25°C^{120} ; $k_{2,\text{CO}_2} = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 24°C^{97}), e que apenas aproximadamente 1% do metilglioxal presente no meio reacional está na forma ceto-aldeídica³⁶.

Figura 23. Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito na Presença de MNP como Captador de Spin. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2 a 20°C após 4 min de incubação na presença de 20 mM de MNP. **A:** Peroxinitrito 1,5 mM na ausência (a) e presença de 5,0 mM (b), 10,0 mM (c), e 20,0 mM (d) de metilglioxal. **B:** Metilglioxal 10 mM na ausência (a) e presença de 0,5 mM (b), 1,5 mM (c), e 2,5 mM (d) de peroxinitrito. O sinal obtido é um triplete de $a_N = 0,83 \text{ mT}$ atribuível ao aduto $\text{MNP-CH}_3\text{CO}^\bullet$. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,17 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^4$.

Figura 24. Efeito da Supressão do Sinal do Aduto $\text{MNP-CH}_3\text{CO}^\bullet$ com a Adição de Bicarbonato no Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2 a 25°C após 4 min de incubação na presença de 20 mM de MNP como captador de spin e bicarbonato de sódio. Metilglioxal 20 mM com peroxinitrito 2,5 mM na ausência (a) e presença de 2,5 mM (b), 5,0 mM (c), 7,5 mM (d), 10,0 mM (e), e 12,5 mM (f) de bicarbonato de sódio. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,17 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^4$.

4.2.3.2 Experimentos com DBNBS como Captador de Spin

Para complementar os estudos de captação de spin com MNP, também foi usado o DBNBS (10 mM) para o estudo do sistema metilglioxal/peroxinitrito em tampão fosfato de sódio aerado 250 mM, pH 7,2 a 20°C, após 2,5 min de incubação. O experimento controle com 20 mM de metilglioxal no meio reacional não produziu sinais (Figura 25a). O experimento controle com 1,5 mM de peroxinitrito mostrou a formação de um aduto de oxidação do DBNBS¹²³, assinalável a DBNBS-OH•, de $a_N = 1,24$ mT e $a_H = 0,06$ mT (marcado com “X” na Figura 25bc). Este aduto pode ser associado à decomposição espontânea do peroxinitrito no tampão fosfato, em •NO₂ e •OH. Já o sistema completo, composto de 20 mM de metilglioxal e 1,5 mM de peroxinitrito, além do sinal marcado com “X”, também foi observado um sinal atribuível ao aduto DNBNS-CH₃•, de $a_N = 1,42$ mT, $a_H = 1,34$ mT e $a_{H(m)} = 0,07$ mT^{124–126} (Figura 25c). A geração de radical metila pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito pode ser esperada pela descarbonilação espontânea do radical acetila gerado pela rota 1 do Esquema 12, ou então pela rota 2b do mesmo Esquema 12.

Figura 25. Ressonância Paramagnética Eletrônica com DBNBS como Captador de Spin para o Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 20°C, após 2,5 min de incubação, na presença de 10 mM de DBNBS. (a) Metilglioxal 20 mM, (b) peroxinitrito 1,5 mM (sinal marcado com “X” compatível com o aduto DBNBS-OH• de $a_N = 1,24$ mT e $a_H = 0,06$ mT, e (c) metilglioxal 20 mM com peroxinitrito 1,5 mM (sinal marcado como “X” compatível com o aduto DBNBS-OH• e outro sinal de $a_N = 1,42$ mT, $a_H = 1,34$ mT, e $a_{H(m)} = 0,06$ mT compatível com o aduto DBNBS-CH₃•. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,17 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^5$.

4.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica com Captação de Spin do Sistema Metilglioxal/Peróxido de Hidrogênio

Ao se substituir peroxinitrito por peróxido de hidrogênio, um nucleófilo pouco potente em pH 7,2 (pK_a 11,7 a 25°C)¹²⁷, também deve ocorrer, embora mais lentamente, sua adição ao metilglioxal, com posterior homólise da ligação O–O do aduto de adição formado, gerando o mesmo radical oxila oriundo de metilglioxal, cuja clivagem homolítica C^1-C^2 gera radical acetila e formiato. De fato, em estudos conduzidos com 20 mM de MNP em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 20°C, com metilglioxal (0-20 mM) e peróxido de hidrogênio (0-20 mM), após 4 min de incubação, foi possível observar a formação de radicais centrados em carbono, sendo um triplete, marcado com “X”, de $a_N = 0,83$ mT na Figura 26, atribuível ao aduto $MNP-CH_3CO^\bullet$, e um sexteto marcado com “I” de $a_N = 1,54$ e $a_{H(2)} = 0,61$, não identificado, podendo ser referente à produtos de oxidação direta do metilglioxal com o peróxido de hidrogênio. Também foi observado um sinal triplete no controle e nas misturas finais de reação marcado com “O”, de $a_N = 1,71$ mT, atribuível à captação do radical *t*-butil de decomposição do MNP no tampão pelo próprio MNP¹⁰⁷ (Figura 26). Quando empregadas altas concentrações de metilglioxal (30 mM) (Figura 26Bd), o sinal se torna bastante ruidoso devido à formação espontânea de bolhas na cubeta de leitura, dificultando a observação dos adutos.

Esses resultados com MNP como captador de spin corroboram os obtidos por Nukayama *et al.*¹²⁶ quando empregaram DMPO e DBNBS como captadores de spin e observaram a geração de radicais centrados em carbono não identificados a partir de metilglioxal com peróxido de hidrogênio, além de radicais metila, hidroxila e superóxido.

Figura 26. Experimentos de Pessonância Paramagnética Eletrônica MNP como Captador de Spin para o Sistema Metilglioxal/Peróxido de Hidrogênio. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 20°C, após 4 min de incubação na presença de 20 mM de MNP. **A:** MNP na ausência (a) e presença de 10 mM de metilglioxal com 10 mM (b), 20 mM (c), e 30 mM (d) de peróxido de hidrogênio. **B:** MNP na ausência (a) e presença de 20 mM de peróxido de hidrogênio com 10 mM (b), 20 mM (c), e 30 mM (d) de metilglioxal. Sinais marcados com “O” são de um triplete de $a_N = 1,71$ mT atribuíveis ao aduto t-butil-MNP $^{\bullet}$, marcados com “X” são um triplete de $a_N = 0,83$ mT atribuíveis ao aduto MNP-CH $_3$ CO $^{\bullet}$, e marcados com “I” são de um sexteto de $a_N = 1,54$ mT e $a_{H(2)} = 0,61$ mT não atribuídos. Condições instrumentais: amplitude de modulação, 0,1 mT; potência de microonda, 20,17 mW; ganho do equipamento, $2,52 \times 10^5$.

4.2.5 Oximetria do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito

Tal como no estudo do sistema biacetil/peroxinitrito, descontou-se a liberação espontânea de oxigênio do peroxinitrito do consumo de oxigênio registrado para metilglioxal (0,05-2,5 mM) sob adição de peroxinitrito (0,25-2,0 mM), em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 25°C. Durante 120 s não se detectou variação da concentração de oxigênio por metilglioxal na ausência de peroxinitrito (controle). Fixando a concentração de peroxinitrito em 1 mM e variando a de metilglioxal de 0,05 a 2,5 mM (Figura 27A) ou fixando metilglioxal em 1 mM e variando-se a de peroxinitrito (0,25-2,0 mM) (Figura 27B), observou-se aumento da velocidade e quantidade de consumo. No entanto, foi observada uma saturação no consumo de oxigênio para concentrações a partir de 5,0 mM de metilglioxal na presença de 1,0 mM de peroxinitrito (não mostrado). O consumo de oxigênio se deve, como explicado anteriormente,

à adição de oxigênio molecular ao radical acetila gerado na reação, gerando ácido acético como produto final (Esquema 11).

Figura 27. Oximetria do Sistema Metilglioal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 25°C. **A:** Sinal controle com 1,00 mM de metilglioal no tampão (a), e peroxinitrito 1,0 mM na presença de 50 µM (b), 100 µM (c), 150 µM (d), 250 µM (e), 0,50 mM (f), 0,75 mM (g), 1,00 mM (h), 1,50 mM (i), e 2,50 mM (j) de metilglioal. **B:** Metilglioal 1,00 mM na ausência (a) e presença de 250 µM (b), 500 µM (c), 750 µM (d), 1,00 mM (e), 1,50 mM (f), e 2,00 mM (g) de peroxinitrito.

4.2.6 Análise por Eletroforese Capilar de Produtos Finais de Reação (Carboxilatos) do Sistema Metilglioal/Peroxinitrito

Analogamente ao que foi feito para o sistema biacetilo/metilglioal, peroxinitrito foi adicionado nas soluções aquosas contendo metilglioal e ácido fosfórico em água em microtubos de centrifugação de 2,0 mL cobertos com papel alumínio para minimizar o efeito da luz na reação. Para prevenir a interferência de fosfato em altas concentrações nos eletroferogramas, as reações tiveram o pH final medido e apenas as amostras com pH final na faixa de 7,1-7,5 foram analisadas por eletroforese capilar. A concentração de ácido fosfórico foi calculada com o objetivo de atingir um pH final igual a 7,2. Os eletroferogramas de uma mistura padrão de analitos e de uma amostra representativa de cerca de 100 corridas independentes estão ilustrados na Figura 28. Evidenciou-se a formação de formiato e acetato pelo sistema metilglioal/peroxinitrito. Glioxalato, esperado pela rota 2b do Esquema 12, não foi observado nas misturas finais de reação. O conjunto dos estudos eletroforéticos está

sumarizado na Tabela 3. Por motivos semelhantes aos expressos para o sistema biacetilo/peroxinitrito, o cálculo da estequiometria da reação é dificultado. No entanto, 1,00 mM de ambos reagentes produz 0,59 mM de acetato e 0,48 mM de formiato, ou seja, pode-se estimar um rendimento químico de cerca de 50% na fragmentação de metilglioxal para formiato e acetato na proporção de 1:1. Com concentrações iniciais de 2,50 mM de metilglioxal e 3,0 mM de peroxinitrito, produziu-se cerca de 0,90 mM de ambos os produtos (cerca de 30% de rendimento). No entanto, em condições de excesso de metilglioxal (10,0 mM), a relação 1:1 nos produtos foi alterada, sendo a concentração de acetato consideravelmente menor do que a de formiato (até aproximadamente 2 de formiato : 1 de acetato), provavelmente devido a uma competição entre a reação de aniquilação de radicais acetila para formar biacetilo, e a reação do radical acetila com o oxigênio dissolvido para produzir ácido acético.

Figura 28. Análise de Ânions por Eletroforese Capilar do Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito. Eletroferograma da mistura de padrões (a) e da mistura final de reação de 1,00 mM de metilglioxal com 1,00 mM de peroxinitrito na presença de 2,75 mM de ácido fosfórico (b). Oxalato (1,00 mM) foi adicionado à mistura final de reação como padrão interno. Identificação dos picos: 1. Brometo (pico de sistema do CTAB); 2. Nitrito; 3. Nitrato; 4. Fosfato; 5. Glioxalato; 6. Formiato; 7. Oxalato (padrão interno); 8. Acetato. Condições instrumentais: Eletrólito de corrida, 10 mM de DNB com 0,10 mM de CTAB, pH final 3,6 ajustado pela adição de NaOH concentrado; capilar de sílica fundida com comprimento até o detector de 40 cm, comprimento total de 50 cm, e diâmetro interno de 50 μ m; detecção indireta em 254 nm; voltagem de separação de -20 kV; injeção das amostras hidrodinamicamente a 1 psi por 3 s. Equipamento Beckman P/ACE551.

Tabela 3. Concentração de Formiato e Acetato nas Misturas Finais de Reação para o Sistema Metilglioal/Peroxinitrito.

[Metilglioal] (mM)	[Peroxinitrito] (mM)			
	1,00	1,50	3,00	4,50
1,00	0,59*	0,59*	0,79*	0,78*
	0,48#	0,56#	0,68#	0,63#
2,50	0,70*	0,79*	0,89*	1,06*
	0,74#	0,86#	0,93#	0,89#
10,0	0,71*	0,85*	1,04*	1,44*
	0,39#	0,62#	0,67#	0,82#

Valores marcados por * são referentes à concentração de formiato em mM e os valores marcados por # são referentes à concentração de acetato em mM.

4.2.7 Análise por Eletroforese Capilar Acoplada à Espectrometria de Massas de L-Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioal/Peroxinitrito

O eletroferograma da mistura final de reação de 10,0 mM de metilglioal com 2,5 mM de peroxinitrito na presença de 5,0 mM de L-lisina em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, à temperatura ambiente, foi monitorado por espectrometria de massas no modo positivo em 147 u (Figura 29A, correspondente a L-lisina) e em 189 u (Figura 29B, correspondente a L-lisina acetilada). Os espectros de massas dos picos eletroforéticos obtidos foram inseridos em suas respectivas figuras. O espectro de massas sequencial da fragmentação do íon de massa/carga 189 u (expresso na Figura 29B) está explicitado na Figura 29C. Este padrão de fragmentação pode ser explicado por perda de água formando um fragmento de m/z 171, com subsequente perda de monóxido de carbono formando um fragmento imínio de m/z 143, cuja desaminação gera um fragmento de m/z 126. Concorrente desacetilação do fragmento imínio produz um fragmento de m/z 84. A alta abundância dos íons imínios observados na Figura 29C, evidenciadas pelas m/z 143 e 126, de acordo com Trelle & Jensen¹²⁸, evidencia a presença da 6N -acetil-L-lisina, a qual seria mecanisticamente desfavorável no caso do isômero α . Também foram observados os fragmentos não identificados de m/z 157 e 129. Em

experimentos controle com L-lisina, L-lisina na presença de 10,0 mM de metilglioxal e L-lisina na presença de 2,5 mM de peroxinitrito não foi possível detectar espécies de m/z 189 u.

Este resultado embasa a hipótese de que o sistema metilglioxal/peroxinitrito, caso ocorra *in vivo*, possa contribuir para a acetilação radicalar de resíduos de $^{\epsilon}$ N-lisina das histonas, sendo que a acetilação e desacetilação desses resíduos pelas enzimas acetilases e desacetilases mediam sinalização, fatores de transcrição e processos pós-traducionais de proteínas¹¹⁷.

Figura 29. Análise de Lisina Acetilada pelo Sistema Metilglioxal/Peroxinitrito por Eletroforese Capilar Acoplada a Espectrometria de Massas. Experimento realizado em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, com 5,0 mM de L-lisina, 10 mM de metilglioxal e 2,5 mM de peroxinitrito. **A:** Eletroferograma da mistura final de reação com detecção em 147 u, atribuível a L-lisina protonada e inserção na figura do espectro de massas do pico eletroforético. **B:** Eletroferograma da mistura final de reação com detecção em 189 u, atribuível a um aduto protonado de acetilação da L-lisina e inserção na figura do espectro de massas do pico eletroforético. **C:** Espectro de massas sequencial da fragmentação do íon molecular do pico do eletroferograma detectado a 189 u (expresso em B) compatível com o da $^{\epsilon}$ N-acetil-L-lisina.

4.3 GLIOXAL

4.3.1 Estudo Cinético do Sistema Glioxal/Peroxinitrito

Os traçados da queda de absorbância de peroxinitrito (200 μM) em 302 nm na presença de glioxal (0-30 mM) em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C, revelaram dependência da concentração de glioxal no meio (Figura 30).

Figura 30. Decaimento Temporal da Absorbância em 302 nm de Peroxinitrito na Presença de Concentrações Crescentes de Glioxal. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C com 200 μM de peroxinitrito na ausência de glioxal (a) e na presença de 2 mM (b), 3 mM (c), 5 mM (d), 7,5 mM (e), 10 mM (f), 15 mM (g), 20 mM (h), e 30 mM (i) de glioxal.

Utilizando o mesmo tratamento cinético empregado no estudo da reação de peroxinitrito com metilglioxal, biacetilo e acetoína, chegou-se à constante $k_{2,\text{ap}} = 3,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 31). Considerando que (i) apenas a forma di-aldeídica do glioxal adicione peroxinitrito, (ii) as formas hidratadas não sejam reativas, (iii) aproximadamente apenas 0,005% do glioxal está presente no meio em forma não-hidratada ou polimerizada, e (iv) $k_2 = k_{2,\text{ap}} (1 + [\text{glioxal hidratado}] \div [\text{glioxal di-aldeídico}])$, estima-se que $k_2 \approx 7,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Portanto, o glioxal é cerca de 10 vezes mais reativo com peroxinitrito que metilglioxal e 100 vezes mais reativo que biacetilo^{4,110,120}.

Figura 31. Constante de Velocidade de Segunda Ordem Aparente para a Reação de Glicoxal com Peroxinitrito. Projeção das constantes de pseudo-primeira ordem aparentes ($k_{obs,ap}$) calculadas pela concentração de glicoxal presente na solução (mM), cujo coeficiente angular da curva é correspondente ao $k_{2,ap} = 3,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Estudos do efeito do pH (6,2-8,2) do tampão fosfato de sódio 350 mM a 25°C presente no meio reacional foram conduzidos para peroxinitrito 200 μM na ausência e na presença de 15 mM de glicoxal cujo tratamento dos dados cinéticos revelaram as constantes de pseudoprimeira ordem k_0 e k_{obs} , respectivamente, para cada valor de pH estudado. Pela projeção dos valores de $k_{obs}-k_0$ pelo pH do tampão, obtivemos o perfil de pH ilustrado na Figura 32. Este perfil de pH revela uma curva ascendente até pHs próximos a 7,2, com saturação após este pH. Este fenômeno pode ser resultadoda soma de três fatores: (i) aumento da concentração de peroxinitrito com o aumento do pH ($pK_a \text{ ONOOH/ONOO}^- = 7,2$ para 500 mM de fosfato)⁹², (ii) efeito de catálise do ácido di-hidrogenofosfórico do tampão fosfato ($pK_a \text{ H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} = 7,2$), e (iii) possível catálise de desidratação do glicoxal hidratado pelo íon HPO_4^{2-} para pH acima de 7,2, conforme relatado Thornalley *et al.* para a adição de aminoguanidina ao metilglicoxal³⁶. A ocorrência da catálise de fosfato na reação de peroxinitrito com glicoxal foi suportada pela dependência linear de $k_{obs(15 \text{ mM glicoxal, } 200 \mu\text{M peroxinitrito})}-k_0$ da concentração do tampão fosfato de sódio de pH 7,2 utilizado (0,05-0,50 M), a

uma força iônica constante igual a 2 corrigida pela adição de NaCl nos tampões empregados (Figura 33).

Figura 32. Perfil de pH para a Reação de Peroxinitrito com Glioal. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 350 mM a 25°C com peroxinitrito (200 μM) na ausência e presença de glioal (15 mM).

Figura 33. Efeito da Concentração do Tampão Fosfato de Sódio na Velocidade da Reação de Glioal com Peroxinitrito. Projeção de $k_{\text{obs}} - k_0$ pela concentração do tampão demonstra a catálise de fosfato na reação de adição nucleofílica de peroxinitrito ao glioal. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio (50-500 mM) de força iônica 2 corrigida pela adição de NaCl, pH 7,2 com peroxinitrito 200 μM na ausência e presença de 15 mM de glioal.

4.3.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Glioxal/Peroxinitrito

4.3.2.1 Experimentos em Celas

4.3.2.1.1 DMPO como Captador de Spin

Usando 100 mM de DMPO como captador de spin para radicais gerados pelo sistema glioxal/peroxinitrito, em tampão fosfato de sódio aerado 500 mM, pH 7,2, a 20°C, após 4 min de incubação, pode-se observar, em celas do tipo “flat” de quartzo e na cavidade de alta sensibilidade, a geração de sinais de adutos radicalares sumarizados na Figura 34. Em experimento controle com peroxinitrito 5,0 mM, foi possível obter um sinal não atribuído, caracterizado por simulação com $a_N = 2,95$ mT, $a_N = 0,06$ mT e $a_H = 0,11$ mT, ou $a_N = 2,95$ mT, $a_H = 0,09$ mT e $a_H = 0,12$ mT. Recentemente, Nash *et al.*¹²⁹ relataram que de fato DMPO pode reagir com peroxinitrito formando vários adutos hipotéticos, porém com constantes de acoplamento hiperfino diferentes das relatadas nesta tese. Também foi observado no experimento controle com peroxinitrito (Figura 34b) e no experimento controle com glioxal (Figura 34a) a geração de sinais pouco intensos com $a_N = a_H = 1,48$ mT, atribuível ao sinal do aduto de DMPO com o radical hidroxila¹⁰⁷. Em uma cavidade de alta sensibilidade, e à uma concentração alta de DMPO (100 mM), este sinal pode ser considerado sem relevância, podendo ser resultado da degradação do próprio DMPO quando exposto à luz em solução aquosa. Por fim, na mistura final de reação contendo 100 mM de glioxal e 5,0 mM de peroxinitrito, foi possível observar, além do sinal com $a_N = a_H = 1,48$ mT pouco intenso, o aparecimento de um sexteto com $a_N = 1,58$ mT e $a_H = 2,11$ mT, atribuível ao aduto do radical formila com o DMPO, cujas constantes de acoplamento hiperfino são idênticas às descritas na literatura como referentes ao aduto do radical formila com o DMPO em solução aquosa¹³⁰.

Figura 34. Ressonância Paramagnética Eletrônica com DMPO como Captador de Spin do Sistema Glioxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 500 mM, pH 7,2, a 20°C na presença de 100 mM de DMPO. (a) Glioxal 100 mM, (b) peroxinitrito 5,0 mM, e (c) glioxal 100 mM com peroxinitrito 5,0 mM. (d) Espectro de simulação de $a_N = a_H = 1,48$ mT (atribuível ao aduto DMPO-OH[•]), (e) espectro de simulação de $a_N = 2,95$ mT, $a_N = 0,06$ mT e $a_H = 0,11$ mT (não atribuído), e (f) espectro de simulação de $a_N = 1,58$ mT e $a_H = 2,11$ mT (atribuível ao aduto do DMPO-HCO[•]). Condições experimentais (a-c): cavidade de alta sensibilidade; potência da microonda, 20,17 mW; amplitude de modulação, 0,1 mT; ganho do equipamento de 1×10^6 ; acumulação de duas leituras por espectro.

4.3.2.1.2 MNP como Captador de Spin

Usando 20 mM de MNP como captador de spin para radicais gerados pelo sistema glioxal/peroxinitrito, em tampão fosfato de sódio aerado 250 mM, pH 7,2, a 20°C, após 4 min de incubação, não se pode observar em celas do tipo “flat” de quartzo a geração de sinais de radicais formila, mesmo variando as condições instrumentais e a concentração dos reagentes (glioxal 0-100 mM e peroxinitrito 0-10 mM). Foi possível obter apenas sinais com $a_N = 1,72$ mT, inclusive nos experimentos controle, atribuíveis com o aduto *t*-butil-MNP[•], oriundo da decomposição do próprio MNP do meio de reação¹⁰⁷. Como as únicas referências de captação de radicais formila por MNP utilizava a geração eletroquímica contínua de MNP e de radical formila por *t*-butil-hidroxil-amina e formaldeído ou metanol, respectivamente, na cubeta de

leitura durante o experimento¹²¹, ou geração fotoquímica de radicais através de seus precursores na presença do captador de spin¹³¹, não seria possível prever pela literatura a estabilidade do aduto do radical formado com o MNP em solução aquosa. Por isso, passamos a conduzir experimentos de ressonância paramagnética eletrônica em fluxo para a detecção de radicais do sistema glioxal/peroxinitrito.

4.3.2.2 Experimentos em Fluxo

4.3.2.2.1 MNP como Captador de Spin

Através de fluxo contínuo de soluções de 1,4 mL/min com detecção direta de adutos radicalares na cavidade de fluxo, em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 20°C, na presença de 20 mM de MNP como captador de spin, com 200 µM de peroxinitrito e 30 mM de glioxal, foi possível detectar a presença de sinais de dois adutos de radicais livres, sendo o primeiro um quarteto (1:2:2:1; $a_N = a_{(H)} = 1,44$ mT), marcado com “I” na Figura 35a, atribuível ao sinal da redução do MNP pela captação de átomo de hidrogênio, e o segundo um tripleto (1:1:1; $a_N = 1,72$ mT), marcado com “X” na Figura 35a, atribuível ao sinal do aduto de *t*-butil-MNP[•] proveniente da decomposição do MNP¹⁰⁷. Experimentos-controle com 200 µM de peroxinitrito (Figura 35b) ou com 30 mM de glioxal (Figura 35c) mostraram a presença apenas do sinal marcado com “X”, de $a_N = 1,72$ mT, atribuível à decomposição do MNP no meio. Ao se substituir glioxal por formaldeído (30 mM) (Figura 35d), obteve-se um espectro semelhante àquele resultado da redução do MNP por H[•] ($a_N = a_H = 1,41$ mT)^{107,132,133} e do aduto de *t*-butil-MNP[•] ($a_N = 1,72$ mT).

Figura 35. Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo na Presença MNP como Captador de Spin para o Sistema Glioxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados com 20 mM de MNP em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 20°C, a um fluxo constante de 1,4 mL/min. (a) Glioxal 30 mM com peroxinitrito 200 μ M, (b) peroxinitrito 200 μ M, (c) glioxal 30 mM, (d) formaldeído 30 mM com peroxinitrito 200 μ M, (e) espectro de simulação da sobreposição dos sinais de $a_N = a_H = 1,44$ mT (atribuível ao aduto MNP-H $\bullet$) e $a_N = 1,72$ mT (atribuível ao aduto do t-butil-MNP $\bullet$). Condições experimentais (a-d): cavidade de fluxo; tempo de observação, 500 ms; potência da microonda, 10,13 mW; amplitude de modulação, 0,1 mT; ganho do equipamento, 1×10^6 ; acumulação de oito leituras por espectro.

A captação de átomo de hidrogênio pelo MNP no sistema glioxal/eroxinitrito pode ser explicada pela descarbonilação espontânea do radical formila produzindo monóxido de carbono e átomo de hidrogênio¹³⁴. A fotólise e oxidação unieletrônica de formaldeído em fase gasosa, incluindo radical hidroxila, são fontes relatadas de CO e H₂, provavelmente através de radical formila intermediário¹³⁵. Em soluções aquosas aeradas, a oxidação de formaldeído por HO $\bullet$ gerado da fotólise de H₂O₂ por laser produziu ácido fórmico e CO, o que implicaria na intermediação de um radical $\bullet$ CH(OH)₂ (formila hidratado)¹²². Além disso, glioxal fotoexcitado na faixa de 395-414 nm na fase gasosa foi relatado recentemente como uma fonte de radical formila que se decompõe a CO e H₂⁶⁴. Já a produção H $\bullet$ pelo sistema formaldeído/eroxinitrito é esperada pela adição nucleofílica do peroxinitrito ao formaldeído,

com posterior homólise da ligação O–O gerando o radical oxila, $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})\text{O}^\bullet$, o qual pode sofrer clivagem da ligação C–H gerando formiato e átomo de hidrogênio.

Aumentando-se a concentração de peroxinitrito para 750 μM e a potência da microonda para 20,21 mW, e diminuindo-se a amplitude de modulação para 0,05 mT, obteve-se o espectro reproduzido na Figura 36a. Neste, é possível visualizar, além dos sinais de $a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 1,41$ mT e $a_{\text{N}} = 1,72$ mT, um sinal pouco intenso de $a_{\text{N}} = 0,71$ mT e $a_{\text{H}} = 0,14$ mT assinalável ao aduto do radical formila com o MNP^{107,121,122}. A simulação do espectro da sobreposição desses três sinais, através do *software* Winsim, está representado na Figura 36b.

Figura 36. Experimentos Complementares de Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo na Presença MNP como Captador de Spin para o Sistema Glioxal/Peroxinitrito. Experimento realizado com 20 mM de MNP como captador de spin em tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,2, a 20°C, a um fluxo constante de 1,4 mL/min. (a) Glioxal 30 mM com peroxinitrito 750 μM . Condições experimentais: cavidade de fluxo; tempo de observação, 500 ms; potência da microonda, 20,21 mW; amplitude de modulação, 0,05 mT. ganho do equipamento, 2×10^6 ; acumulação de quatro leituras por espectro. (b) Espectro de simulação dos dados da sobreposição dos sinais de $a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 1,44$ mT (atribuível ao aduto MNP-H $^\bullet$), $a_{\text{N}} = 1,72$ mT (atribuível ao aduto t-butil-MNP $^\bullet$) e $a_{\text{N}} = 0,71$ mT e $a_{\text{H}} = 0,14$ mT (atribuível ao aduto MNP-HCO $^\bullet$).

4.3.2.2.2 Sem Captador de Spin

Através de fluxo contínuo de soluções de 20 mL/min com detecção direta de radicais em cavidade de fluxo, foi possível detectar a presença de sinal de radical livre compatível com um tripleto (1:2:1; $a_{(2\text{H})} = 0,78$ mT; $g = 2,0207$), em tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,2, a 20°C, para o sistema glioxal/peroxinitrito, sendo a amplitude do sinal aumentada com o aumento da concentração de ambos os reagentes (Figura 37). Ao se substituir glioxal

por formaldeído, metanol ou etanol nas mesmas condições experimentais e instrumentais, não foram observados sinais, excluindo a possibilidade de esses contaminantes serem os geradores do sinal observado. O sinal de $a_{(2H)} = 0,78$ mT pode ser atribuído ao radical formila hidratado pelo fato de (i) o radical formila apresenta alta constante de velocidade de hidratação ($k \approx 2 \times 10^5$ s⁻¹, uma ordem de grandeza maior do que o valor para o radical acetila, por exemplo)¹³⁶; (ii) o radical formila hidratado tem um tempo de meia-vida no meio aquoso de ≈ 20 μ s¹³⁷; (iii) pode ser formado a partir da clivagem- β do radical oxila $\text{CH}(\text{OH})_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-O}^\bullet$, que resulta da homólise do aduto peroxinitroso hipotético do glicoxal com peroxinitrito, $\text{CH}(\text{OH})_2\text{-CH}(\text{OH})\text{-OONO}$.

Figura 37. Detecção Direta de Radicais Livres Gerados pelo Sistema Glicoxal/Peroxinitrito por Ressonância Paramagnética Eletrônica em Fluxo Contínuo. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio 400 mM, pH 7,2, a 20°C, a um fluxo constante de 20 mL/min. **A:** Espectros obtidos de peroxinitrito 20 mM na ausência (a) e presença de 220 mM (b), 400 mM (c), 500 mM (d), e 1,00 M (e) de glicoxal. **B:** Espectros obtidos de glicoxal 1,00 M na ausência (a) e presença de 5,0 mM (b), 10,0 mM (c), 20,0 mM (d), e 45 mM (e) de peroxinitrito. Condições experimentais: cavidade de fluxo; tempo de observação, 3,5 ms; potência da microonda, 10,13 mW; amplitude de modulação, 0,1 mT; ganho do equipamento, 1×10^6 ; acumulação de dois espectros por espectro.

4.3.3 Detecção da Luz Gerada pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito

Verificou-se que o sistema glioxal/peroxinitrito em tampão fosfato de sódio 250 mM deuterado com pD 7,2 a 25°C emite luz no infra-vermelho próximo, em 1270 nm, atribuível à desativação monomolecular do oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) (Figura 38). A quimioluminescência também foi observada em baixos níveis em experimentos-controle com apenas peroxinitrito (1,0-5,0 mM). Esta emissão foi atribuída à produção, em pH neutro, de peroxinitrato pelo par ácido peroxinitroso/peroxinitrito, cuja decomposição gera oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) e nitrito⁸². Com a adição de glioxal (5,0-50 mM) na solução com 1,0 mM de peroxinitrito, há evidente aumento na velocidade da fotoemissão, compatível com uma geração de 1O_2 ($^1\Delta_g$) por mecanismo diferente daquele na ausência de glioxal, assim como um aumento expressivo da área do pico da emissão, sendo esta área menor em alta concentração de glioxal (50 mM) do que com concentrações menores de glioxal (5,0, 25 mM) (Figura 38A). Isso pode denotar uma supressão da fotoemissão pelo excesso de glioxal ou da supressão por H₂O presente na alíquota adicionada da solução estoque de glioxal aquoso. Por outro lado, quanto maior é a concentração de peroxinitrito (1,0-5,0 mM) adicionado no meio com 5,0 mM de glioxal, mais intensa é a fotoemissão.

Na presença de supressores clássicos de oxigênio singlete $^1\Delta_g$ como L-histidina (supressor químico), azida de sódio (supressor físico) e substituição de D₂O por H₂O como solvente do tampão, a fotoemissão de glioxal 5,0 mM tratado com peroxinitrito 2,5 mM foi significantemente diminuída, confirmando a natureza singlete da luz detectada a 1270 nm (Figura 39)^{83,138,139}.

Figura 38. Emissão de Luz a 1270 nm Atribuível à Fotoemissão Molecular do Oxigênio Singleto ($^1\Delta_g$) pelo Sistema Glioxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato deuterado 250 mM pD 7,2 a 25°C. **A:** Peroxinitrito 2,5 mM na ausência (a) e presença de 5,0 mM (b), 25 mM (c), e 50 mM (d) de glioxal. **B:** Peroxinitrito 1,0 mM (a), peroxinitrito 1,0 mM e glioxal 5,0 mM (b), peroxinitrito 2,5 mM (c), peroxinitrito 2,5 mM e glioxal 5,0 mM (d), peroxinitrito 5,0 mM (e), peroxinitrito 5,0 mM e glioxal 5,0 mM (f). Áreas (contagens s) calculadas pelas integrais dos picos de emissão pelo Software Microcal Origin Pro 7.

Figura 39. Efeito de Supressão da Emissão de Luz a 1270 nm por Supressores Clássicos da Fotoemissão Monomolecular do Oxigênio Singlete $^1\Delta_g$. Experimentos realizados em tampão fosfato deuterado 250 mM, pD/pH 7,2, a 25°C, com peroxinitrito 2,5 mM e glioal 5,0 mM na ausência (a), e na presença de H_2O como solvente do tampão (b), 2,5 mM de L-histidina (c), e 2,5 mM de NaN_3 (d). Áreas (contagens s) calculadas pelas integrais dos picos de emissão pelo Software Microcal Origin Pro 7.

Ao se substituir glioal por biacetilo (Figura 40d), não foi detectada emissão em 1270 nm, compatível com o fato desta dicetona ser um gerador exclusivo de radical acetila e não radical formila capaz de produzir oxigênio molecular singlete ($^1\Delta_g$) pelo mecanismo de Russell. Radicais acetila não apresentam um átomo de hidrogênio geminal ao carbono capaz de gerar uma radical peroxila primário ou secundário para reagir pelo mecanismo de Russell^{81,86-90}. Curiosamente, ao empregar metilglioal no lugar de glioal, a baixas concentrações de metilglioal (5,0 mM, Figura 40b), há um pequeno aumento na área da emissão a 1270 nm ($\approx 38\%$ maior em relação ao controle com apenas peroxinitrito), com aumento na velocidade desta emissão, semelhante ao observado com glioal. No entanto, em concentração mais alta de metilglioal (25 mM, Figura 40c), foi observada uma área de emissão consideravelmente menor ($\approx 1/5$) do que a observada com apenas peroxinitrito no meio reacional. Estes resultados podem indicar uma possível geração de radical formila pelo sistema metilglioal/peroxinitrito, não detectado por ressonância paramagnética eletrônica pelo fato de o radical acetila ser prevalente devido ao ataque preferencial de peroxinitrito ao C^1 do metilglioal e ser mais fácil de ser captado pelo MNP e formar um aduto com MNP mais estável do que o radical formila¹²². É importante notar que, recentemente, Tokikawa *et al.*⁹⁹ descreveram a formilação radicalar de L-lisina, derivados de L-lisina e de tetrapeptídeos contendo resíduos de L-lisina pelo sistema metilglioal/peroxinitrito.

Figura 40. Emissão de Luz a 1270 nm pelo Sistema Metilgloxal/Peroxinitrito. Experimentos realizados em tampão fosfato deuterado 250 mM, pD 7,2, a 25°C com peroxinitrito 2,5 mM na ausência (a) e presença de 5,0 mM de metilgloxal (b), 25 mM de metilgloxal (c), e 25 mM de biacetilo (d). Áreas (contagens s) calculadas pelas integrais dos picos de emissão pelo software Microcal Origin Pro 7.

4.3.4 Captação Química de Oxigênio Singlete por AVS

A captação química de oxigênio singlete por AVS é possível devido à seletividade do AVS em reagir apenas com oxigênio molecular no estado singlete através de reação de cicloadição-1,4 (Diels-Alder) gerando como produto um endoperóxido-9,10, AVSO₂ (Esquema 15).

Esquema 15. Cicloadição 1-4 de O₂ ¹Δ_g no Derivado Antracênico AVS formando 9,10-AVSO₂.

Para avaliar a viabilidade do uso de AVS, um derivado antracênico hidrossolúvel, para captar oxigênio molecular singlete em estudos com peroxinitrito, avaliou-se o efeito do captador na absorbância temporal em 302 nm de 200 μM de peroxinitrito em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C, pela adição de AVS (1,0-10 mM). A decomposição

espontânea do peroxinitrito no tampão apresentou uma pequena mudança em seu traçado com a adição de AVS, tornando-se um processo ligeiramente mais lento ($k_{\text{obs}} (0 \text{ mM}) = 0,38125 \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{obs}} (10 \text{ mM AVS}) = 0,31225 \text{ s}^{-1}$). Com o aumento da concentração de AVS na faixa estudada (1,0-10 mM), não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre as curvas de decaimento (Figura 41). Portanto, concluiu-se que AVS não é capaz de catalisar a decomposição do peroxinitrito, sendo este composto uma ferramenta apta para se realizar estudos de captação de oxigênio singlete em sistemas com peroxinitrito.

Figura 41. Cinética da Absorbância de Peroxinitrito (302 nm) na Presença de AVS. Efeito da adição de AVS (1,0-10 mM) na absorbância normalizada em 302 pelo tempo de peroxinitrito 200 μM em tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 7,2, a 25°C.

4.3.4.1 Análises de AVSO₂ por CLAE-UV

Amostras de misturas finais de reação da captação química de oxigênio molecular singlete por AVS foram analisadas por CLAE com detecção em 215 nm, obtendo-se o cromatograma da separação de AVS (tempo de retenção de 26 min) de AVSO₂ (tempo de retenção de 21 min) conforme ilustrado na Figura 42.

Figura 42. Cromatograma Representativo das Análises de AVSO₂ por CLAE-UV. Experimentos realizados em tampão fosfato de sódio deuterado 500 mM, pD 7,2, na presença do captador de ¹O₂ AVS com detecção por espectrofotometria à 215 nm. Pico de tempo de migração de 26 min correspondente ao AVS e pico de tempo de migração de 21 min correspondente ao produto de adição do ¹O₂ ao AVS (AVSO₂). (a) Peroxinitrito 2,5 mM. (b) Peroxinitrito 2,5 mM na presença de glicoxal 5,0 mM.

Amostras da reação de peroxinitrito 2,5 mM na ausência e presença de glicoxal (1,0-10 mM) em tampão fosfato de sódio deuterado 500 mM pD 7,2 com 2,5 mM de AVS indicaram o efeito multiplicador da concentração de glicoxal na produção de AVSO₂ (Figura 43), assim sustentando a hipótese do Esquema 14 de geração de oxigênio molecular singlete (¹Δ_g) pelo sistema glicoxal/peroxinitrito via radical formila e mecanismo de Russell.

Substituindo-se glicoxal por metilglicoxal observou-se que, na presença 1,0 mM de metilglicoxal, há um ligeiro aumento na área do pico correspondente a do AVSO₂, compatível com maior produção de ¹O₂, porém na presença de 5,0 mM de metilglicoxal este aumento é menos pronunciado e com 10 mM de metilglicoxal pode-se observar uma pequena diminuição em relação área do pico do peroxinitrito na ausência de metilglicoxal (Figura 44).

Figura 43. Efeito da Concentração de Glioxal na Área do Pico do AVSO₂ Analisado por CLAE-UV. Amostras de reação contendo 2,5 mM de AVS, 2,5 mM de peroxinitrito e glioxal (0-10 mM) em tampão fosfato de sódio deuterado 500 mM, pD 7,2.

Figura 44. Efeito da Concentração de Metilglioxal na Área do Pico do AVSO₂ Analisado por CLAE-UV. Amostras de reação contendo 2,5 mM de AVS, 2,5 mM de peroxinitrito e metilglioxal (0-10 mM) em tampão fosfato de sódio deuterado 500 mM, pD 7,2.

Já substituindo glioxal por biacetilo (1,0-5,0 mM), observou-se uma diminuição na área do pico correspondente a do AVSO₂ proporcional à concentração de biacetilo presente no meio (Figura 45). Estes dados de captação química de oxigênio singlete por AVS na presença metilglioxal e biacetilo são convergentes com os obtidos por luminescência em 1270 nm e indicam uma possível produção de radical formila pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito por ataque do peroxinitrito ao carbono cetônico (C²) do metilglioxal através da rota 2 do Esquema 12.

Figura 45. Diminuição na Área do Pico do AVSO₂ Analisado por CLAE-UV na Presença de Biacetilo. Amostras de reação contendo 2,5 mM de AVS, 2,5 mM de peroxinitrito e biacetilo (0-5,0 mM) em tampão fosfato de sódio deuterado 500 mM, pD 7,2.

Ao empregar-se como amostra 10,0 mM de glioxal na presença de 2,0 mM de peroxinitrito e 8,0 mM de AVS, e assumindo que (i) a concentração β do captador (concentração necessária para se captar 50% do $^1\text{O}_2$ produzido pelo sistema) seja 8,0 mM devido a sua semelhança estrutural com o 9,10-dietilantraceno disulfonato de sódio (EAS)⁸⁵; (ii) uma molécula de oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) requer dois radicais formilperoxila para ser formada; (iii) o rendimento da reação de Russell de produção de oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) é de aproximadamente 10%¹⁴⁰, estima-se que o rendimento da produção de oxigênio singlete a partir de glioxal/peroxinitrito relativo à concentração nominal de peroxinitrito é de aproximadamente 2%.

4.3.4.2 Análises de AVSO₂ por CLAE-EM/EM de Amostras de Reação Sob Atmosfera de $^{18}\text{O}_2$, $^{16}\text{O}_2$, e N_2

Ao se empregar espectrometria de massas como técnica de detecção nas análises por CLAE das misturas finais de reação contendo 10,0 mM de glioxal, 2,0 mM de peroxinitrito e 8,0 mM de AVS em 1,0 mM de $\text{D}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$ com pD final na faixa de 6,8-7,4, sob atmosfera de $^{16}\text{O}_2$, obteve-se pelo monitoramento de reações múltiplas (MRM) de m/z 210:194 a confirmação da captação de $^1\text{O}_2$ pelo AVS, formando $\text{AVS}^{16}\text{O}_2$ (massa de 210 u) (Figura

46A). Experimento controle com 10,0 mM de glioxal na ausência de peroxinitrito não gerou produto, enquanto que o experimento controle com peroxinitrito 2,0 mM na ausência de glioxal produziu AVSO₂ em pequena quantidade se comparada com a produzida pelo sistema completo. Já sob atmosfera de ¹⁸O₂, ainda MRM de *m/z* 210:194, não foi observado produto de AVS¹⁶O₂ na mistura final de reação, enquanto que sob atmosfera de N₂ este foi observado em menor quantidade se comparada à produção sob atmosfera de ¹⁶O₂. O fato de se ter observado geração de AVS¹⁶O₂ sob atmosfera de N₂ pode resultar de dois fatores: (i) contaminação por ¹⁶O₂ da solução sob atmosfera de N₂ com O₂ dissolvido na solução adicionada de peroxinitrito ao sistema; (ii) geração de O₂ pelo peroxinitrito logo que este começa a ser adicionado à mistura de reação a baixo pD. Isto foi necessário porque a reação para análise via CLAE-EM/EM teve de ser realizada a baixas concentrações de fosfato de sódio, tendo o pD final da reação calculado pela adição prévia de D₃PO₄ em D₂O antes da adição do peroxinitrito alcalino na solução. O pD final situa-se na faixa de 6,8-7,4, porém o pD inicial é ácido (≈ 3) e pD baixo favorece a decomposição do ácido peroxinitroso a O₂ em competição à adição nucleofílica de peroxinitrito ao glioxal.

Por outro lado, pelo monitoramento de reações múltiplas de *m/z* 212:194 (massa do AVS¹⁸O₂ de 212 u), houve detecção do aduto AVS¹⁸O₂ apenas na amostra de reação sob atmosfera de ¹⁸O₂, indicando uma participação inequívoca do oxigênio molecular dissolvido no tampão no mecanismo da reação na geração de ¹O₂ (¹Δ_g) pelo sistema glioxal/peroxinitrito (Figura 46B). Este resultado exclui os átomos de oxigênio do peroxinitrito e do glioxal como fonte de ¹O₂ (¹Δ_g), contrariamente à proposição de Yang *et al.*⁴ ao considerar o ataque de peroxinitrito a um intermediário dioxirano como hipotética fonte de ¹O₂. De fato, esta rota é menos provável em solução devido à alta constante de velocidade do peroxinitrito com o glioxal e a baixa concentração de dioxirano proposto como intermediário.

Figura 46. Cromatogramas das Análises de CLAE-EM/EM da Captação de Oxigênio Singlete Isotopicamente Marcado do Sistema Glioxal/Peroxinitrito. Amostras de reação contendo 10,0 mM de glioxal com 2,0 mM de peroxinitrito na presença de 8,0 mM de AVS em 1,0 mM de D_3PO_4/D_2O de pD final na faixa de 6,8-7,4. **A:** MRM de m/z 210:194, atribuível ao $AVS^{16}O_2$. (a) Glioxal + AVS sob atmosfera de $^{16}O_2$; (b) peroxinitrito + AVS sob atmosfera de $^{16}O_2$; (c) peroxinitrito + glioxal + AVS sob atmosfera de $^{16}O_2$; (d) peroxinitrito + glioxal + AVS sob atmosfera de $^{18}O_2$; (e) peroxinitrito + glioxal + AVS sob atmosfera de N_2 . **B:** MRM de m/z 212:194, atribuível ao $AVS^{18}O_2$, para as mesmas amostras de reação de A.

4.3.5 Análise de Produtos Finais de Reação (Formiato) por Eletroforese Capilar do Sistema Glioxal/Peroxinitrito

Peroxinitrito foi adicionado às soluções aquosas contendo glioxal e ácido fosfórico em água em microtubos de centrifugação de 2,0 mL de capacidade cobertos com papel alumínio para minimizar o efeito da luz na reação. Para prevenir a interferência de fosfato em altas concentrações nos eletroferogramas, as reações tiveram o pH final medido e apenas as amostras com pH final na faixa de 7,1-7,5 foram analisadas por eletroforese capilar. A

concentração de ácido fosfórico adicionado na solução antes da reação com o peroxinitrito foi previsto por cálculos de titulação com o objetivo de se alcançar um pH final aproximadamente igual a 7,2. O padrão de eletroferograma obtido para as misturas finais de reação (Figura 47) demonstra que formiato é produzido pelo sistema glicoxal/peroxinitrito, e que a produção de formiato é dependente da concentração de ambos os reagentes (Figura 48). A ausência de glicoxalato e oxalato nas misturas finais de reação indica que a oxidação parcial de glicoxal pelo peroxinitrito não ocorre. Estes resultados confirmam que a reação prossegue por uma primeira etapa de adição nucleofílica do peroxinitrito ao glicoxal, conforme Esquema 13 proposto.

Figura 47. Eletroferograma Representativo das Análises de Formiato por Eletroforese Capilar para o Sistema Glicoxal/Peroxinitrito. Mistura de reação contendo 2,5 mM de glicoxal e 1,5 mM de peroxinitrito em 3,0 mM de ácido fosfórico. Identificação dos picos: 1. Brometo (pico de sistema do tampão de corrida), 2. Nitrito, 3. Nitrato, 4. Fosfato, 5. Citrato (Padrão Interno), e 6. Formiato.

Figura 48. Dependência na Concentração de Glicoxal e de Peroxinitrito no Rendimento da Formação de Formiato. A: Peroxinitrito 3,0 mM na presença de glicoxal (1,0-10 mM). B: Glicoxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito (1,0-4,5 mM).

Assim como para os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito, o cálculo sobre a estequiometria da reação é dificultado. Espera-se que cada molécula de glioxal gere uma molécula de ácido fórmico pela adição do peroxinitrito e uma de radical formila, e que duas moléculas de glioxal produzem uma molécula de CO₂, uma de O₂ e uma de ácido fórmico através de dois radicais formila pelo mecanismo de Russell, porém (i) o peroxinitrito, quando isolado, sofre isomerização espontânea a nitrato (30%), (ii) o glioxal está presente nas formas livre e hidratadas em solução, e (iii) o radical formila pode recombinar-se a glioxal. Pela deflexão da curva da Figura 48A, temos que usando 3,0 mM de peroxinitrito e 5,0 mM de glioxal, aproximadamente 2,0 mM de formiato é formado. Assumindo que peroxinitrito reage estequiometricamente com glioxal e que duas moléculas de glioxal podem gerar três íons de formiato, o rendimento químico de formiato é cerca de 44% em termos da concentração de peroxinitrito adicionada.

4.4 POSSÍVEIS IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Os experimentos foram realizados em concentrações aparentemente não fisiológicas, tanto que as estimativas da concentração em estado estacionário fisiológicas de peroxinitrito limitadas por CO₂ estimadas por Ferrer-Sueta & Radi⁹¹ estão na faixa de 2-3 nM e muitas vezes 2 ordens de magnitude menor quando outros alvos são considerados. Assim, a velocidade de pseudo-primeira ordem da reação de peroxinitrito com metilglioxal pode ser estimada, limitada apenas pelo CO₂, como sendo de $2 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ considerando o valor de $k_{2,\text{ap}} = 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Já a velocidade de reação com glioxal pode ser estimada como sendo de $7,6 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ considerando o valor de $k_{2,\text{ap}} = 3,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Levando-se em conta que a reação de metilglioxal com proteínas do plasma exhibe valores de $\approx 2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, e a de glioxal valores de $\approx 1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$,³⁶ as reações de metilglioxal e glioxal com peroxinitrito podem competir com as de proteínas, principalmente em situações de estresse oxidativo e nitrosativo.

Além disso, já foi demonstrado que metilglioxal induz a formação de $\bullet\text{NO}$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, peroxinitrito em células vasculares do músculo liso de ratos hipertensos,¹⁴¹ portanto esses valores podem ser mais significativos. De fato, a relevância dos sistemas biaceto/peroxinitrito, metilglioxal/peroxinitrito e glioxal/peroxinitrito em sistemas biológicos deve ser considerada à luz da espacialidade e temporalidade de eventos celulares complexos. Estes são regidos por compartimentalização celular, metabolismo e duração da exposição, além de fatores de concentração, vida-média dos intermediários e constantes de velocidade de reação. Assim, é tentador propor que a reação dos compostos α -dicarbonílicos estudados com peroxinitrito pode ocorrer cronicamente em microambientes de tecido sob estresse oxidativo, nitrosativo e carbonílico, como é o caso de locais de inflamação. As conseqüências *in vivo* destas reações devem ser investigadas, levando em consideração possíveis efeitos benéficos, por exemplo, em transdução de sinais, ou deletérios, como na modificação irreversível de proteínas.

Por fim, o oxigênio singlete é um eletrófilo forte conhecido por reagir com várias biomoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas e lípidos. Apresenta efeitos benéficos e nocivos, incluindo cascatas de sinalização celular associadas com a apoptose e morte geneticamente controlada de plantas^{78,81}. Já a acetilação pós-traducional de proteínas por um mecanismo de radicalar, durante eventos normais ou patológicos, pode ser evocada como uma via adicional para as reações catalisadas por acetil-transferases, sendo que a acetilação epigenética de proteínas, especialmente em resíduos de lisina de histonas, tem conseqüências importantes na sinalização celular e regulação do ciclo celular¹¹⁷.

5 CONCLUSÕES

Os estudos descritos nesta tese demonstram claramente que a reação de adição nucleofílica do peroxinitrito a compostos α -dicarbonílicos ocorre com constantes de velocidades maiores do que as com compostos monocarbonílicos, devido a uma maior reatividade por efeito sacador de elétrons de uma carbonila ligada a outra carbonila em α . Determinou-se as seguintes constantes de velocidade de segunda ordem em pH 7,2 a 25°C em tampão fosfato de sódio 250 mM para os compostos estudados: biacetilo, $k_2 = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; metilglioxal, $k_2 \approx 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; glioxal, $k_2 \approx 7,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se comparados a compostos monocarbonílicos, estas constantes de velocidade se mostram de 10-1000 vezes maiores, sendo este efeito atribuído à maior reatividade de compostos α -dicarbonílicos. Por outro lado, estudos preliminares com a acroleína, importante metabólito reativo da degradação de lipídios e de aminoácidos, sugeriram que esta reage provavelmente via adição de Michael com peroxinitrito em tampão fosfato de sódio 500 mM, pH 7,2, a 25°C, com uma $k_2 \approx 7,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Os dados desta tese comprovam o mecanismo de adição nucleofílica de peroxinitrito a compostos carbonílicos^{95,96} via um intermediário nitrosoperoxicarbonato hipotético, cuja clivagem homolítica da ligação O-O e clivagem da ligação C-C $^\alpha$ produz radicais acila e ácidos carboxílicos (Esquema 16, no final deste capítulo). No caso do biacetilo, foi observada por ressonância paramagnética eletrônica com captação de spin a produção de radical acetila, enquanto metilglioxal produz radicais acetila, metila e provavelmente formila. Já com glioxal, foi observada a intermediação de radical formila e átomo de hidrogênio e, através de ressonância paramagnética eletrônica em fluxo direto, um sinal compatível com o de um radical formila hidratado.

As análises por oximetria e eletroforese capilar confirmaram que o radical acetila gerado pelos sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito reage com o oxigênio

molecular dissolvido na solução produzindo ácido acético. Por outro lado, metilglioxal e glioxal produziram formiato originado pela aniquilação de radical formila por oxigênio molecular ou como produto da clivagem C¹-C² do radical oxila gerado após a perda de $\bullet\text{NO}_2$ pelo aduto hipotético peroxinitroso.

A emissão de radiação eletromagnética em 1270 nm, atribuída inequivocamente à emissão monomolecular do $\text{O}_2^1\Delta_g$, foi observada para o sistema glioxal/peroxinitrito e, em menor escala, para metilglioxal/peroxinitrito, não sendo observada para biacetilo/peroxinitrito. Estes resultados estão em linha com o mecanismo de Russell, em que radicais centrados no carbono portando átomo de hidrogênio geminal podem reagir com oxigênio molecular gerando um radical alquilperoxil (nos casos em estudo, radical formilperoxil), cuja dismutação gera oxigênio singlete. A captação química de oxigênio singlete foi possível com AVS, sendo confirmado o mecanismo de Russell pelos experimentos realizados com oxigênio marcado isotopicamente ($^{18}\text{O}_2$) para a geração de oxigênio singlete $^1\Delta_g$ pela reação de glioxal com peroxinitrito.

Quando os sistemas biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito foram acoplados a biomoléculas (lisina, histidina e dGuo), foi constatada a acetilação delas por técnicas de espectrometria de massas, levantando a hipótese de que este radical pode acetilar biomoléculas e contribuir com processos de modificação pós-traducional de proteínas e de DNA, eventualmente associados à fisiopatologia ou a mecanismos de proteção do organismo.

Esquema 16. Mecanismo Geral Proposto para a Reação de Peroxinitrito com Compostos α -Dicarbonílicos (Biacetilo, Metilglioxal e Glioxal) em Meio Aquoso Aerado. I) Se $\text{R}_2 = \text{CH}_3$: aponta-se o destino do radical acetila formado por biacetilo/peroxinitrito ou metilglioxal/peroxinitrito em meio aerado na ausência e presença de biomoléculas aceptoras do radical acetila (Lisina, Histidina e dGuo). **II) Se $\text{R}_2 = \text{H}$:** mostra-se o mecanismo de reação da formação de $\text{O}_2 \text{ } ^1\Delta_g$ a partir de radical formila formado pelo sistema glioxal/peroxinitrito ou metilglioxal/peroxinitrito.

6 PERSPECTIVAS

Têm-se como perspectiva o estudo da reação de peroxinitrito com acroleína (contaminante de alimentos e catabólito de biopolímeros) e ácido 4,5-dioxovalérico (produto de oxidação de ácido 5-aminolevulínico, precursor do grupo heme) no que tange ao mecanismo de reação, os radicais intermediários envolvidos, seus produtos finais de reação, assim como outros compostos α - β -insaturados e α -dicarbonílicos como precursores de radicais centrados em carbono após reação com peroxinitrito.

Também se faz importante o prosseguimento de estudos de modelos biológicos para avaliar possível ocorrência *in vivo* (mitocôndrias, culturas de células, tecidos) das reações de adição nucleofílica de peroxinitrito aos compostos carbonílicos estudados, através da geração de radicais acetila, metila ou formila e/ou oxigênio singlete, com formação de seus adutos com biomoléculas e possíveis conseqüências normais ou patológicas. Eventualmente, os produtos destas reações podem constituir biomarcadores específicos de várias desordens genéticas e adquiridas.

7 REFERÊNCIAS

- 1 GUTHRIE, J.P.; PITCHKO, V. Hydration of Carbonyl Compounds, an Analysis in Terms of No Barrier Theory: Prediction of Rates from Equilibrium Constants and Distortion Energies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 23, p. 5520–5528, 2000.
- 2 GUTHRIE, J.P. Carbonyl Addition Reactions: Factors Affecting the Hydrate–Hemiacetal and Hemiacetal–Acetal Equilibrium Constants. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 898–906, 1975.
- 3 BELL, R.P.; MCDOUGALL, A. O. Hydration equilibria of some aldehydes and ketones. **Transactions of the Faraday Society**, v. 56, p. 1281, 1960.
- 4 YANG, D.; TANG, Y.; CHEN, J.; WANG, X.; BARTBERGER, M.D.; HOUK, K.N.; OLSON, L. Ketone-Catalyzed Decomposition of Peroxynitrite via Dioxirane Intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 51, p. 11976–11983, 1999.
- 5 MALIK, M.; JOENS, J. A Temperature dependent near-UV molar absorptivities of glyoxal and gluteraldehyde in aqueous solution. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 56, n. 14, p. 2653–8, 2000.
- 6 KALAPOS, M.P. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 145–75, 1999.
- 7 SAYRE, L.M.; LIN, D.; YUAN, Q.; ZHU, X.; TANG, X. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, n. 4, p. 651–75, 2006.
- 8 STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging and age-related diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 22–38, 2001.
- 9 DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 169–176, 2003.
- 10 AWADA, M.; DEDON, P.C. Formation of the 1,N2-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 9, p. 1247–53, 2001.
- 11 THORNALLEY, P.J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. **International Review of Neurobiology**, v. 50, p. 37–57, 2002.
- 12 MIYATA, T.; IZUHARA, Y.; SAKAI, H.; KUROKAWA, K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. **Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis**, v. 19 Suppl 2, p. S58–61, 1999.

- 13 KOVACIC, P.; COOKSY, A.L. Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. **Archives of Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 123–8, 2005.
- 14 PICKLO, M. Carbonyl Toxicology and Alzheimer's Disease. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 184, n. 3, p. 187–197, 2002.
- 15 KUHILA, B.; LÜTH, H.-J.; HAFFERBURG, D.; BOECK, K.; ARENDT, T.; MÜNCH, G. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 211–6, 2005.
- 16 OPPERMAN, U. Carbonyl reductases: the complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 293–322, 2007.
- 17 SEMCHYSHYN, H.M. Reactive Carbonyl Species In Vivo: Generation and Dual Biological Effects. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- 18 LYONS, T.J. Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. **Seminars in Vascular Medicine**, v. 2, n. 2, p. 175–89, 2002.
- 19 KALAPOPOULOS, M.P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 251–71, 2008.
- 20 TURK, Z. Glycotoxins, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. **Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 59, p. 147–156, 2010.
- 21 KERKENI, M.; SAÏDI, A.; BOUZIDI, H.; LETAIEF, A.; YAHIA, S. BEN; HAMMAMI, M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Diabetes and Vascular Disease Research: Official Journal of The International Society of Diabetes and Vascular Disease**, v. 10, n. 3, p. 239–45, 2013.
- 22 STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 207–18, 2003.
- 23 LOUREIRO, A.P.M.; ARRUDA CAMPOS, I.P. DE; GOMES, O.F.; MASCIO, P. DI; MEDEIROS, M.H.G. Structural characterization of diastereoisomeric ethano adducts derived from the reaction of 2'-deoxyguanosine with trans,trans-2,4-decadienal. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 641–9, 2004.
- 24 ROBERTS, D.W.; YORK, M.; BASKETTER, D.A. Structure-activity relationships in the murine local lymph node assay for skin sensitization: alpha,beta-diketones. **Contact Dermatitis**, v. 41, n. 1, p. 14–7, 1999.
- 25 DWORAK, J.J.; ROBERTS, D.W.; CALTER, M. A; FIELDS, C. A; BORAK, J. Is diacetyl a respiratory sensitizer? A reconsideration using QSAR, QMM, and competition experiments. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 5, p. 631–3, 2013.

- 26 BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P. A The “buttery” attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, n. 3, p. 235–52, 2004.
- 27 HARBER, P.; SAECHAO, K.; BOOMUS, C. Diacetyl-induced lung disease. **Toxicological Reviews**, v. 25, n. 4, p. 261–72, 2006.
- 28 FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 47–54, 2006.
- 29 CHENG, H. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 938–50, 2010.
- 30 OTSUKA, M.; OHMORI, S. Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcoholic drinks by gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography**, v. 577, n. 2, p. 215–20, 1992.
- 31 EGILMAN, D.; MAILLOUX, C.; VALENTIN, C. Popcorn-worker Lung Caused by Corporate and Regulatory Negligence: An Avoidable Tragedy. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 85–98, 2007.
- 32 GALBRAITH, D.; WEILL, D. Popcorn lung and bronchiolitis obliterans: a critical appraisal. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 82, n. 3, p. 407–16, 2009.
- 33 OTSUKA, M.; MINE, T.; OHUCHI, K.; OHMORI, S. A detoxication route for acetaldehyde: metabolism of diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in liver homogenate and perfused liver of rats. **Journal of Biochemistry**, v. 119, n. 2, p. 246–51, 1996.
- 34 OTSUKA, M.; HARADA, N.; ITABASHI, T.; OHMORI, S. Blood and urinary levels of ethanol, acetaldehyde, and C4 compounds such as diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in normal male students after ethanol ingestion. **Alcohol**, v. 17, n. 2, p. 119–24, 1999.
- 35 NEMET, I.; VIKIĆ-TOPIĆ, D.; VARGA-DEFTERDAROVIC, L. Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 560–70, 2004.
- 36 THORNALLEY, P.J.; YUREK-GEORGE, A.; ARGIROV, O.K. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 55–65, 2000.
- 37 THORNALLEY, P.J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 111–7, 2005.
- 38 THORNALLEY, P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 23, n. 1-2, p. 125–50, 2008.

- 39 ROYER, L.O.; KNUDSEN, F.S.; OLIVEIRA, M. A DE; TAVARES, M.F.M.; BECHARA, E.J.H. Succinylacetone oxidation by oxygen/peroxynitrite: a possible source of reactive intermediates in hereditary tyrosinemia type I. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 5, p. 598–604, 2004.
- 40 DUTRA, F.; CIRIOLO, M.R.; CALABRESE, L.; BECHARA, E.J.H. Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 4, p. 755–60, 2005.
- 41 DENG, Y.; BOOMSMA, F.; YU, P.H. Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. **Life Sciences**, v. 63, n. 23, p. 2049–58, 1998.
- 42 BECHARA, E.J.H.; DUTRA, F.; CARDOSO, V.E.S.; SARTORI, A.; OLYMPIO, K.P.K.; PENATTI, C. A A; ADHIKARI, A.; ASSUNÇÃO, N. A The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 146, n. 1-2, p. 88–110, 2007.
- 43 NEMET, I.; VARGA-DEFTERDAROVIC, L.; TURK, Z. Methylglyoxal in food and living organisms. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 12, p. 1105–17, 2006.
- 44 THORNALLEY, P.J. Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. **The Biochemical Journal**, v. 254, n. 3, p. 751–5, 1988.
- 45 HOUSE, J.D.; HALL, B.N.; BROSNAN, J.T. Threonine metabolism in isolated rat hepatocytes. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 281, n. 6, p. E1300–7, 2001.
- 46 SARTORI, A.; GARAY-MALPARTIDA, H.M.; FORNI, M.F.; SCHUMACHER, R.I.; DUTRA, F.; SOGAYAR, M.C.; BECHARA, E.J.H. Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1841–50, 2008.
- 47 SARTORI, A.; BECHARA, E.J.H. Metilglioxal: uma toxina endógena? **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2193–2201, 2010.
- 48 DHAR, A.; DESAI, K.; LIU, J.; WU, L. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: are we getting the true measure? **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 11-12, p. 1093–100, 2009.
- 49 BEISSWENGER, P.J.; HOWELL, S.K.; TOUCHETTE, A D.; LAL, S.; SZWERGOLD, B.S. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 198–202, 1999.
- 50 RANDELL, E.W.; VASDEV, S.; GILL, V. Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 51, n. 2, p. 153–7, 2005.
- 51 LAPOLLA, A.; FLAMINI, R.; DALLA VEDOVA, A.; SENESI, A.; REITANO, R.; FEDELE, D.; BASSO, E.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. Glyoxal and methylglyoxal levels in

diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM/FESCC**, v. 41, p. 1166–1173, 2003.

52 LAPOLLA, A.; REITANO, R.; SERAGLIA, R.; SARTORE, G.; RAGAZZI, E.; TRALDI, P. Evaluation of advanced glycation end products and carbonyl compounds in patients with different conditions of oxidative stress. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 7, p. 685–90, 2005.

53 KALAPOPOS, M.P. Where does plasma methylglyoxal originate from? **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 99, n. 3, p. 260–71, 2013.

54 GAENS, K.H.J.; STEHOUWER, C.D. A; SCHALKWIJK, C.G. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 1, p. 4–11, 2013.

55 AVZIANOVA, E.; BROOKS, S.D. Raman spectroscopy of glyoxal oligomers in aqueous solutions. **Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 101, p. 40–8, 2013.

56 GOBERT, J.; GLOMB, M. A Degradation of glucose: reinvestigation of reactive alpha-Dicarbonyl compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8591–7, 2009.

57 KUNTZ, S.; RUDLOFF, S.; EHL, J.; BRETZEL, R.G.; KUNZ, C. Food derived carbonyl compounds affect basal and stimulated secretion of interleukin-6 and -8 in Caco-2 cells. **European Journal of Nutrition**, v. 48, n. 8, p. 499–503, 2009.

58 VISTOLI, G.; MADDIS, D. DE; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47 Suppl 1, n. August, p. 3–27, 2013.

59 DEGEN, J.; HELLWIG, M.; HENLE, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 28, p. 7071–9, 2012.

60 SILVA FERREIRA, A.C. DA; REIS, S.; RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, C.; PINHO, P.G. DE Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. S314–8, 2007.

61 DAROWSKA, A; BORCZ, A.; NAWROCKI, J. Aldehyde contamination of mineral water stored in PET bottles. **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 12, p. 1170–7, 2003.

62 NENG, N.R.; CORDEIRO, C. A A; FREIRE, A P.; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, n. 1-2, p. 47–52, 2007.

- 63 LIU, W.; ZHANG, J.; KWON, J.; WEISEL, C.; TURPIN, B.; ZHANG, L.; KORN, L.; MORANDI, M.; STOCK, T.; COLOME, S. Concentrations and source characteristics of airborne carbonyl compounds measured outside urban residences. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 56, n. 8, p. 1196–204, 2006.
- 64 SALTER, R.J.; BLITZ, M. A; HEARD, D.E.; PILLING, M.J.; SEAKINS, P.W. New chemical source of the HCO radical following photoexcitation of glyoxal, (HCO)₂. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 29, p. 8278–85, 2009.
- 65 HO, S.S.H.; YU, J.Z.; CHU, K.W.; YEUNG, L.L. Carbonyl Emissions from Commercial Cooking Sources in Hong Kong. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 56, n. 8, p. 1091–1098, 2006.
- 66 O'BRIEN, P.J.; SIRAKI, A.G.; SHANGARI, N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 7, p. 609–662, 2005.
- 67 THORNALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **The Biochemical Journal**, v. 344 Pt 1, p. 109–16, 1999.
- 68 LAPOLLA, A; FLAMINI, R.; LUPO, A.; ARICÒ, N.C.; RUGIU, C.; REITANO, R.; TUBARO, M.; RAGAZZI, E.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. Evaluation of glyoxal and methylglyoxal levels in uremic patients under peritoneal dialysis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 217–24, 2005.
- 69 ZARDARI, L. A.; KHUHAWAR, M.Y.; LAGHARI, A. J. Capillary GC Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal in the Serum and Urine of Diabetic Patients After Use of 2,3-Diamino-2,3-dimethylbutane as Derivatizing Reagent. **Chromatographia**, v. 70, n. 5-6, p. 891–897, 2009.
- 70 PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.
- 71 WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–86, 2008.
- 72 GHIOULEH, I. AL; KHOO, N.K.H.; KNAUS, U.G.; GRIENDLING, K.K.; TOUYZ, R.M.; THANNICKAL, V.J.; BARCHOWSKY, A.; NAUSEEF, W.M.; KELLEY, E.E.; BAUER, P.M.; DARLEY-USMAR, V.; SHIVA, S.; CIFUENTES-PAGANO, E.; FREEMAN, B. A; GLADWIN, M.T.; PAGANO, P.J. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 7, p. 1271–88, 2011.
- 73 BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **The American Journal of Physiology**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424–37, 1996.
- 74 VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B. DE F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. DA S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,

antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

75 RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464–72, 2013.

76 MEDINAS, D.B.; CERCHIARO, G.; TRINDADE, D.F.; AUGUSTO, O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 59, n. 4-5, p. 255–62, 2007.

77 MEDINAS, D.B.; CERCHIARO, G.; TRINDADE, D.F.; AUGUSTO, O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 59, n. 4-5, p. 255–62, 2007.

78 RONSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. DI; MARTINEZ, G.R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563–568, 2006.

79 MASCIO, P. DI; CATALANI, L.H.; BECHARA, E.J.H. Are dioxetanes chemiluminescent intermediates in lipoperoxidation? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 6, p. 471–478, 1992.

80 SNYDER, J.W.; SKOVSEN, E.; LAMBERT, J.D.C.; POULSEN, L.; OGILBY, P.R. Optical detection of singlet oxygen from single cells. **Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP**, v. 8, n. 37, p. 4280–93, 2006.

81 MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G.E.; PRADO, F.M.; UEMI, M.; CORRÊA, T.C.; TOMA, I.N.; BERTOLUCCI, A.; OLIVEIRA, M.C.B.; MOTTA, F.D.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P. DI Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 59, n. 4-5, p. 322–31, 2007.

82 MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G.E.; CORRÊA, T.C.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P. DI Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite. **Dalton Transactions**, n. 29, p. 5720–9, 2009.

83 KHAN, A.U.; KASHA, M. Red Chemiluminescence of Molecular Oxygen in Aqueous Solution. **The Journal of Chemical Physics**, v. 39, n. 8, p. 2105, 1963.

84 MASCIO, P. DI; BECHARA, E.J.H.; MEDEIROS, M.H.G.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Letters**, v. 355, n. 3, p. 287–289, 1994.

85 MASCIO, P. DI; SIES, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylene)dipropionate endoperoxide. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 8, p. 2909–2914, 1989.

- 86 HOWARD, J.A.; INGOLD, K.U. Self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 4, p. 1056–1058, 1968.
- 87 RUSSELL, G.A. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons. Mechanism of the Interaction of Peroxy Radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 14, p. 3871–3877, 1957.
- 88 RUSSELL, G.A. Solvent effects in the reactions of free radicals and atoms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 11, p. 2977–2978, 1957.
- 89 RUSSELL, G.A. The Competitive Oxidation of Cumene and Tetralin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 77, n. 17, p. 4583–4590, 1955.
- 90 KANOFISKY, J.R.; AXELROD, B. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 3, p. 1099–104, 1986.
- 91 FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 161–77, 2009.
- 92 LOBACHEV, V.L.; RUDAKOV, E.S. The chemistry of peroxynitrite. Reaction mechanisms and kinetics. **Russian Chemical Reviews**, v. 75, n. 5, p. 375–396, 2006.
- 93 AUGUSTO, O.; BONINI, M.G.; AMANSO, A.M.; LINARES, E.; SANTOS, C.C.X.; MENEZES, S.L. DE Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 841–859, 2002.
- 94 VÁSQUEZ-VIVAR, J.; DENICOLA, A.; RADI, R.; AUGUSTO, O. Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 7, p. 786–94, 1997.
- 95 UPPU, R.M.; WINSTON, G.W.; PRYOR, W.A. Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 12, p. 1331–7, 1997.
- 96 NAKAO, L.S.; OUCHI, D.; AUGUSTO, O. Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite and hydrogen Peroxide/Iron(II). Production Of acetate, formate, and methyl radicals. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 10, p. 1010–8, 1999.
- 97 LYMAR, S. V; HURST, J.K. Rapid reaction between peroxonitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 34, p. 8867–8868, 1995.
- 98 DENICOLA, A.; FREEMAN, B.A.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 49–58, 1996.
- 99 TOKIKAWA, R.; LOFFREDO, C.; UEMI, M.; MACHINI, M.T.; BECHARA, E.J.H. Radical acylation of L-lysine derivatives and L-lysine-containing peptides by peroxynitrite-

treated diacetyl and methylglyoxal. **Free Radical Research**, v. 48, n. October 2013, p. 357–370, 2014.

100 NARDELLO, V.; AUBRY, J.-M.; JOHNSTON, P.; BULDUK, I.; VRIES, A.H.M. DE; ALSTERS, P.L. Facile Preparation of the Water-Soluble Singlet Oxygen Traps Anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS) and Anthracene-9,10-diethylsulfonate (AES) via a Heck Reaction with Vinylsulfonate. **Accounts and Rapid Communications in Synthetic Organic Chemistry**, v. 2005, n. 17, p. 2667–2669, 2005.

101 BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T.W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.A.; FREEMAN, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 4, p. 1620–1624, 1990.

102 PRYOR, W. A; CUETO, R.; JIN, X.; KOPPENOL, W.H.; NGU-SCHWEMLEIN, M.; SQUADRITO, G.L.; UPPU, P.L.; UPPU, R.M. A practical method for preparing peroxynitrite solutions of low ionic strength and free of hydrogen peroxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 1, p. 75–83, 1995.

103 BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–40, 1952.

104 KAUR, H.; LEUNG, K.H.W.; PERKINS, M.J. A Water-soluble, Nitroso-aromatic Spin-trap. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 142–143, 1981.

105 GILBERT, R.P.; BRANDT, R.B. Spectrophotometric determination of methyl glyoxal with 2,4-dinitrophenylhydrazine. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 2418–22, 1975.

106 ROBINSON, J.; COOPER, J.M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 390–399, 1970.

107 BUETTNER, G.R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, p. 259–303, 1987.

108 BONINI, M.G.; RADII, R.; FERRER-SUETA, G.; FERREIRA, A M.; AUGUSTO, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10802–6, 1999.

109 DULING, D.R. Simulation of Multiple Isotropic Spin-Trap EPR Spectra. **Journal of Magnetic Resonance, Series B**, v. 104, n. 2, p. 105–110, 1994.

110 MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G.R.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCHIO, P. DI Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using ^{18}O -labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 20, p. 6172–9, 2003.

111 MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, G.R.; MARTINS, A.P.B.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCHIO, P. DI Direct evidence of singlet molecular oxygen [$\text{O}_2(1\Delta\text{g})$] production in the

reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 15, p. 4510–7, 2003.

112 STIVERS, J.T.; WASHABAUGH, M.W. Catalysis of acetoin formation by brewers' yeast pyruvate decarboxylase isozymes. **Biochemistry**, v. 32, n. 49, p. 13472–82, 1993.

113 MASSARI, J.; FUJIY, D.E.; DUTRA, F.; VAZ, S.M.; COSTA, A.C.O.; MICKE, G. A; TAVARES, M.F.M.; TOKIKAWA, R.; ASSUNÇÃO, N. A; BECHARA, E.J.H. Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 879–87, 2008.

114 KNUDSEN, F.S.; PENATTI, C.A.A.; ROYER, L.O.; BIDART, K.A.; CHRISTOFF, M.; OUCHI, D.; BECHARA, E.J.H. Chemiluminescent Aldehyde and β -Diketone Reactions Promoted by Peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 317–326, 2000.

115 ALVES, A.N.L.; JEDLICKA, L.D.L.; MASSARI, J.; JULIANO, M.A.; BECHARA, E.J.H.; ASSUNÇÃO, N.A. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 12, p. 1983–1990, 2013.

116 KYNE, S.H.; SCHIESSER, C.H.; MATSUBARA, H. Multiorbital interactions during Acyl radical addition reactions involving imines and electron-rich olefins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 427–34, 2008.

117 KOUZARIDES, T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? **The EMBO Journal**, v. 19, n. 6, p. 1176–9, 2000.

118 NUKAYA, H.; IWAMI, T.; ISHIDA, H.; TSUJI, K.; SUWA, Y.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T.; KOSUGE, T. N-2 acetylation of 2'-deoxyguanosine by coffee mutagens, methylglyoxal and hydrogen peroxide. **Mutation Research**, v. 245, n. 4, p. 251–7, 1990.

119 OH, S.-Y.; LEE, J.; CHA, D.K.; CHIU, P.C. Reduction of acrolein by elemental iron: kinetics, pH effect, and detoxification. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 8, p. 2765–70, 2006.

120 MASSARI, J.; TOKIKAWA, R.; ZANOLLI, L.; TAVARES, M.F.M.; ASSUNÇÃO, N.A.; BECHARA, E.J.H. Acetyl radical production by the methylglyoxal-peroxynitrite system: a possible route for L-lysine acetylation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n. 11, p. 1762–70, 2010.

121 HEINZEL, A.; HOLZE, R.; HAMANN, C.H.; BLUM, J.K. The electrooxidation of methanol and formaldehyde at a platinum electrode: a SEESR study of radical intermediates-I. **Eletrochimica Acta**, v. 34, n. 5, p. 657–661, 1989.

122 JANZEN, E.G.; LOPP, I.G.; MORGAN, T.V. Detection of fluoroalkyl and acyl radicals in the gas-phase photolysis of ketones and aldehydes by electron spin resonance gas-phase spin trapping techniques. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 139–141, 1973.

- 123 KOHNO, M.; YAMADA, M.; MITSUTA, K.; MIZUTA, Y.; YOSHIKAWA, T. Spin-Trapping Studies on the Reaction of Iron Complexes with Peroxides and the Effects of Water-Soluble Antioxidants. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 64, n. 5, p. 1447–1453, 1991.
- 124 GATTI, R.M.; ALVAREZ, B.; VASQUEZ-VIVAR, J.; RADI, R.; AUGUSTO, O. Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, n. 1, p. 36–46, 1998.
- 125 ROYER, L.O.; KNUDSEN, F.S.; OLIVEIRA, M. A DE; TAVARES, M.F.M.; BECHARA, E.J.H. Peroxynitrite-initiated oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate esters by oxygen: potential sources of reactive intermediates in keto acidoses. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 12, p. 1725–32, 2004.
- 126 NAKAYAMA, M.; SAITO, K.; SATO, E.; NAKAYAMA, K.; TERAWAKI, H.; ITO, S.; KOHNO, M. Radical generation by the non-enzymatic reaction of methylglyoxal and hydrogen peroxide. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 12, n. 3, p. 125–33, 2007.
- 127 ALVAREZ, B.; DENICOLA, A.; RADI, R. Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. **Chemical Research in Toxicology**, v. 8, n. 6, p. 859–864, 1995.
- 128 TRELLE, M.B.; JENSEN, O.N. Utility of immonium ions for assignment of epsilon-N-acetyllysine-containing peptides by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 9, p. 3422–30, 2008.
- 129 NASH, K.M.; ROCKENBAUER, A.; VILLAMENA, F. A Reactive nitrogen species reactivities with nitrones: theoretical and experimental studies. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 1581–97, 2012.
- 130 JIAN-JUN, Y.; DONG-XU, L.; QING-LIN, L.; ZHI-JUN, Z.; HAN-QING, W. Mechanism of photocatalytic oxidation of formaldehyde. **Acta Physico-Chimica Sinica**, v. 17, n. 3, p. 278–281, 2001.
- 131 HARTGERINK, J.W.; ENGBERTS, J.B.F.N.; BOER, T.J. DE Photolysis of polyhalomethanes in the presence of nitrosoalkanes formation of acyl alkyl nitroxides. **Tetrahedron Letters**, v. 29, p. 2709–2712, 1971.
- 132 CHIGNELL, C.F.; KALYANARAMAN, B.; MASON, R.P.; SIK, R.H. Spectroscopic studies of cutaneous photosensitizing agents — I. Spin trapping of photolysis products from sulfanilamide, 4-aminobenzoic acid and related compounds. **Photochemistry and Photobiology**, v. 32, n. 5, p. 563–571, 1980.
- 133 KENNEDY, C.H.; PRYOR, W.A.; WINSTON, G.W.; CHURCH, D.F. Hydroperoxide-induced radical production in liver mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, n. 3, p. 1123–1129, 1986.
- 134 TROE, J. Analysis of quantum yields for the photolysis of formaldehyde at $\lambda > 310$ nm. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 19, p. 3868–74, 2007.

- 135 CARBAJO, P.G.; SMITH, S.C.; HOLLOWAY, A.-L.; SMITH, C. A; POPE, F.D.; SHALLCROSS, D.E.; ORR-EWING, A.J. Ultraviolet photolysis of HCHO: absolute HCO quantum yields by direct detection of the HCO radical photoproduct. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 48, p. 12437–48, 2008.
- 136 MAKOGON, O.; FLYUNT, R.; TOBIEN, T.; NAUMOV, S.; BONIFACIĆ, M. Dimethylselenide as a probe for reactions of halogenated alkoxy radicals in aqueous solution. Degradation of dichloro- and dibromomethane. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 26, p. 5908–16, 2008.
- 137 MASSARI, J.; TOKIKAWA, R.; MEDINAS, D.B.; ANGELI, J.P.F.; MASCIO, P. DI; ASSUNÇÃO, N. A; BECHARA, E.J.H. Generation of singlet oxygen by the glyoxal-peroxynitrite system. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 51, p. 20761–8, 2011.
- 138 KRINSKY, N.I. Singlet oxygen in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 35–38, 1977.
- 139 LENGFELDER, E.; CADENAS, E.; SIES, H. Effect of DABCO (1,4-diazabicyclo[2,2,2]-octane) on singlet oxygen monomol (1270 nm) and dimol (634 and 703 nm) emission. **FEBS Letters**, v. 164, n. 2, p. 366–370, 1983.
- 140 NIU, Q.J.; MENDENHALL, G.D. Yields of singlet molecular oxygen from peroxy radical termination. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 1, p. 165–172, 1992.
- 141 CHANG, T.; WANG, R.; WU, L. Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 2, p. 286–93, 2005.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium	125
ANEXO B. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation	137
ANEXO C. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal-Peroxynitrite System	149
ANEXO D. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Ferricytochrome <i>c</i> Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress	159
ANEXO E. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins	175
ANEXO F. SÚMULA CURRICULAR.....	185

ANEXO A. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium

Chem. Res. Toxicol. **2008**, *21*, 879–887

Radical Acetylation of 2'-Deoxyguanosine and L-Histidine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Medium

Júlio Massari,[†] Débora E. Fujiy,[†] Fernando Dutra,[‡] Sandra M. Vaz,[†] Ana C. O. Costa,[§] Gustavo A. Micke,^{§,||} Marina F. M. Tavares,[§] Rita Tokikawa,[†] Nilson A. Assunção,[†] and Etelvino J. H. Bechara^{*,†}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513-970 São Paulo, SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, SP, and Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

Received August 2, 2007

Radical Acetylation of 2'-Deoxyguanosine and L-Histidine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Medium

Júlio Massari,[†] Débora E. Fujiy,[†] Fernando Dutra,[‡] Sandra M. Vaz,[†] Ana C. O. Costa,[§] Gustavo A. Mücke,^{§,||} Marina F. M. Tavares,[§] Rita Tokikawa,[†] Nilson A. Assunção,[†] and Etelvino J. H. Bechara^{*,†}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513-970 São Paulo, SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, SP, and Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

Received August 2, 2007

Diacetyl, like other α -dicarbonyl compounds, is reportedly cytotoxic and genotoxic. A food and cigarette contaminant, it is related with alcohol hepatotoxicity and lung disease. Peroxynitrite is a potent oxidant formed in vivo by the diffusion-controlled reaction of the superoxide radical anion with nitric oxide, which is able to form adducts with carbon dioxide and carbonyl compounds. Here, we investigate the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl forming acetyl radicals, whose reaction with molecular oxygen leads to acetate. Peroxynitrite is shown to react with diacetyl in phosphate buffer (bell-shaped pH profile with maximum at 7.2) at a very high rate constant ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) when compared with monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Phosphate ions (100–500 mM) do not affect the rate of spontaneous peroxynitrite decay, but the H_2PO_4^- anion catalyzes the nucleophilic addition of the peroxynitrite anion to diacetyl. The intermediacy of acetyl radicals is suggested by a three-line spectrum ($a_N = a_H = 0.83 \text{ mT}$) obtained by EPR spin trapping of the reaction mixture with 2-methyl-2-nitrosopropane. The peroxynitrite reaction is accompanied by concentration-dependent oxygen uptake. Stoichiometric amounts of acetate from millimolar amounts of peroxynitrite and diacetyl were obtained under nonlimiting conditions of dissolved oxygen. In the presence of either L-histidine or 2'-deoxyguanosine, the peroxynitrite/diacetyl system afforded the corresponding acetylated molecules identified by HPLC-MSⁿ. These studies provide evidence that the peroxynitrite/diacetyl reaction yields acetyl radicals and raise the hypothesis that protein and DNA nonenzymatic acetylation may occur in cells and be implicated in aging and metabolic disorders in which oxygen and nitrogen reactive species are putatively involved.

Introduction

In living organisms, dioxygen and nitric oxide (NO) originate a small but highly reactive family of chemical species that govern health, disease, and death. Among them, the pair peroxynitrous acid (HOONO)/peroxynitrite (ONOO^-) ($\text{pK}_a = 6.8$), formed by the diffusion rate-limited reaction of the superoxide anion radical with NO ($k_2 \sim 3\text{--}20 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (*1*), stands out for the one- and two-electron oxidations, nitrosations, and nitrations that it can cause, directly or through radical-mediated mechanisms, to proteins, lipids, and DNA, impairing protein expression, enzyme activities, and signaling routes (*1, 2*). Peroxynitrite has been shown to react directly with many substrates, including some amino acids, nucleosides, carbonyl metabolites, sulfhydryls, ebbselen, metal complexes, heme proteins, ascorbate, and urate (*3–5*). Increased formation of peroxynitrite in tissues has been linked to Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, lung injury, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, cancer, drug-dependent toxicity, and many other diseases (*1*).

On the other hand, reactive carbonyl compounds such as alkanals (e.g., acetaldehyde, *n*-hexanal), alkenals (e.g., acrolein,

heptadienals, and nonadienals), β -keto acids (e.g., acetoacetate, 2-methylacetoacetate), β -diketones (e.g., succinylacetone), and α -dicarbonyls (e.g., diacetyl, 4,5-dioxovaleric acid, and methylglyoxal) have been identified as oxidation products of carbohydrates (*6*), lipids (*6, 7*), proteins (*6, 8, 9*), and DNA (*10*) and have been implicated in several age-related disorders (*11*), including diabetes (*9, 12, 13*), Alzheimer's disease (*9, 14*), and cancer (*15*). The accumulation of reactive carbonyls and consequent chemical injury to biological systems with loss of native functions have been referred to as "carbonyl stress" (*16*).

Of potential interest regarding carbonyl and nitrosative stress is the nucleophilic addition of peroxynitrite anion to aldehydes, ketones, and carbon dioxide, by virtue of a set of reactive oxidants that may result, including carbon and oxygen-centered radicals, nitrogen oxides, and carbonate radical (*17*). Carbon dioxide prevails in intracellular (12 mM), interstitial (30 mM), and other body fluids over carbonyl metabolites and end products and rapidly undergoes the addition of the peroxynitrite anion (pH-independent, $k_2 = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at 37 °C), thereby acting as a sink for peroxynitrite (*18*). Among biological carbonyls of interest for reaction with peroxynitrite, we can list ketone bodies (6–25 mM) in the blood of diabetic patients (*19*); succinylacetone (0.1–0.3 mM) in the urine of hereditary tyrosinemia type 1 carriers (*20*); and methylglyoxal (1–10 μM) in normal human (*21*) and rat plasma (*22*) and a higher methylglyoxal concentration (20–50 μM) in the plasma of

* To whom correspondence should be addressed.

[†] Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo.

[‡] Universidade Cruzeiro do Sul.

[§] Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo.

^{||} Universidade Federal de Santa Catarina.

Scheme 1. Hypothetical Routes for the Carbonyl-Catalyzed Isomerization of Peroxynitrite to Nitrate, Accompanied by Formation of Carboxylic Acids and Nitro Compounds^a

^a Adapted from Uppu et al. (24) and Nakao et al. (25) (routes a and b) and from Yang et al. (26) (route c).

insulin-nondependent and in insulin-dependent ($60\ \mu\text{M}$) diabetics (23). In addition to the fact that they are present in very low physiological concentrations, aldehyde and ketone reactions with peroxynitrite are much slower than with carbon dioxide (18). For example, rate constants are as follows: acetaldehyde ($k_2 = 680\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.4, $37\ ^\circ\text{C}$), propionaldehyde ($k_2 = 530\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7, $25\ ^\circ\text{C}$), isobutanol ($k_2 = 344\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.2, $25\ ^\circ\text{C}$), pyruvate ($k_2 = 88\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.4, $37\ ^\circ\text{C}$), and 3-methylacetoacetone ($k_2 = 166\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7, $25\ ^\circ\text{C}$) (24–26). Hence, these reactions have been considered of negligible biological relevance.

In contrast, α -dicarbonyls such as glyoxal, α -oxoaldehydes, and α -diketones are expected to undergo much faster nucleophilic additions than their monocarbonyl counterparts due to the electron-withdrawing effect of the adjacent carbonyl group. Thus, a comparison of the rate constants and reaction mechanisms of peroxynitrite added to mono- and α -dicarbonyls in aqueous medium is fully warranted. Biological α -dicarbonyls include several amino acid, carbohydrate, and lipid catabolites such as methylglyoxal (from triose phosphates, acetone, and threonine) (6), diacetyl (from alcohol (27), cigarettes (28), and some foods (29, 30)), oxazones (from aminosugars) (31), and 4,5-dioxovaleric acid (from 5-aminolevulinic acid) (32). Tissue accumulation of these catabolites, albeit not yet directly determined due to analytical difficulties imposed by their high reactivity with proteins, has been associated with clinical manifestations of several inborn and acquired disorders, for example, methylglyoxal in diabetes (6), diacetyl in alcohol hepatotoxicity (27) and lung disease (30), oxazones in aging-related diseases (31), and 5-aminolevulinic acid in lead poisoning, intermittent acute porphyria, and type 1 hereditary tyrosinemia (32). Glyoxal and methylglyoxal are reported as active in vitro and in vivo protein cross-linkers via Maillard reactions (6), while diacetyl has been found to modify arginine and lysine residues of proteins (33).

Otsuka et al. (34) evaluated diacetyl concentration in the plasma of volunteer male students who had ingested ethanol as ranging from 0.25 to $0.75\ \mu\text{M}$, whereas that of acetoin was about $2.2\ \mu\text{M}$. Interestingly, 2,3-butanediol raised from 10 to $50\ \mu\text{M}$

in the plasma and from 50 to $300\ \mu\text{M}$ in the urine of an aldehyde dehydrogenase 2 defective student, 3 h after ethanol ingestion. The C4 metabolites diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol had been previously found to be interconvertible in liver, brain, and kidney of rats (35). In addition, about $3\ \mu\text{M}$ diacetyl and $2\ \mu\text{M}$ acetoin were found in the plasma of adult rats, and $3.4\ \text{nmol}$ diacetyl and $3.6\ \text{nmol}$ acetoin per gram were found in the liver (36).

Pursuant to peroxynitrite nucleophilic addition to short chain aldehydes, according to Uppu et al. (24), a putative nitroso-peroxycarbonate intermediate decays into regenerated aldehyde and nitrate plus a set of secondary minor products, including organic acids and organic nitrates (Scheme 1, routes a and b). In parallel, Nakao et al. (25) reported that roughly $1\ \text{mM}$ acetate and formate can be obtained from the reaction of acetaldehyde ($100\ \text{mM}$) with peroxynitrite ($10\ \text{mM}$) in slightly alkaline medium by the same mechanism proposed by Uppu et al. (24). Two years later, Yang et al. (26) suggested that the nitroso-peroxycarbonate adduct from the reaction of diacetyl and other activated ketones cleaves to a dioxirane intermediate plus nitrite before reforming the ketone and generating nitrate (Scheme 1, route c). This hypothesis was based on the observed alkene epoxidation property of peroxynitrite/carbonyl mixtures.

We revisit here the oxygen-consuming reaction of peroxynitrite with diacetyl in phosphate buffer under continuous stirring to render molecular oxygen nonlimiting, which yields large amounts of acetyl radical intermediates and ultimately acetate ion (Scheme 2). We also show that this reaction can be coupled to the acetylation of L-histidine or 2'-deoxyguanosine (dGuo)¹ added to the reaction mixture. These findings raise the hypothesis that α -dicarbonyl catabolites produced during nitrosative and carbonyl stresses may exert cyto- and genotoxicity not only by their activity of cross-linking DNA bases and proteins but also by radical acetylation of these pivotal biopolymers.

¹ Abbreviations: CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; dGuo, 2'-deoxyguanosine; EPI, enhanced product ion; MNP, 2-methyl-2-nitrosopropane; MRM, multiple reaction monitoring.

Scheme 2. Hypothetical Mechanism of the Phosphate-Catalyzed Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Stirred Aerated Aqueous Medium, Mediated by Acetyl Radicals, Leading to Acetic Acid

Materials and Methods

Chemicals and Reagents. Acetonitrile, ammonium formate, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Chelex-100, dGuo, deuterium oxide, diacetyl, formic acid, L-histidine·HCl, 2-hydroxyisobutyric acid 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP), phosphoric acid, sodium tetraborate, and sodium nitrite were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Acetic acid, chloroform D-1, hydrochloric acid, hydrogen peroxide, manganese(IV) oxide, sodium carbonate, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, and sodium phosphate monobasic monohydrate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Diacetyl was distilled before use. Peroxynitrite was synthesized from sodium nitrite (0.6 M), hydrogen peroxide (0.7 M) in hydrochloric acid (1.1 M), and sodium hydroxide (1.5 M) in a quench-flow reactor (37). The excess hydrogen peroxide in alkali peroxynitrite solution was eliminated with manganese(IV) oxide. Concentrations of hydrogen peroxide and peroxynitrite were determined from their absorbances at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively. The concentration of peroxynitrite in stock solutions obtained by this method ranged from 300 to 400 mM. All of the solutions were prepared in distilled water treated in a Millipore Milli-Q system, and the buffer solutions were pretreated with Chelex-100.

Oxygen Consumption. Oxygen uptake was followed in a Hansatech oxygraph equipped with a Clark type electrode. All of the experiments were carried out in air-equilibrated 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, whose oxygen concentration was taken to be 220 μM at 37 $^{\circ}\text{C}$.

HPLC-MS Analyses. LC-MS analyses were carried out using an 2000 Q TRAP (hybrid triple quadrupole ion trap mass spectrometer) equipped with a 1100 Agilent HPLC system consisting of a binary pump, automatic solvent degasser, thermostatted autosampler and column compartment, and a Synergy polar RP column (4 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$). HPLC elution was made with an aqueous phase consisting of 0.1% formic acid and 1.0 mM ammonium formate (A) and an organic phase obtained with 0.1% formic acid and 1.0 mM ammonium formate in acetonitrile:H₂O (19:1) (B), at a flow rate of 250 $\mu\text{L min}^{-1}$. L-Histidine products from the peroxynitrite/diacetyl reaction were analyzed by isocratic elution with 95% A, and those from dGuo were analyzed by a linear gradient formed with 95% A (30 s) and 95% B (7 min), followed by elution with 95% B up to 11 min. Five microliters of sample was used in both analyses. The mass spectrometer was operated in the positive mode under the following conditions: voltage, 4000 V; curtain gas, 25; temperature, 370 $^{\circ}\text{C}$; gas 1, 50; gas 2, 60; DP, 21; EP, 4.5; CEP, 25; CE, 20; resolution unit for performing the experiments by enhanced product ion (EPI); and MS³.

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decomposition was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics model SX-18V) at 302 nm. The temperature was maintained constant at 25 ± 0.2 $^{\circ}\text{C}$, and the pH values of the reaction mixtures were determined by a simulated experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The peroxynitrite concentration was kept at 500 μM . Pseudofirst-order rates, k_{obs} (s^{-1}) were determined by nonlinear least-squares fitting of stopped-flow data to a single-exponential function with a nonzero offset. The results of 9–12 measurements were averaged to obtain each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was

calculated from slopes of the plots of k_{obs} vs the concentration of diacetyl. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before plotting data against pH or phosphate buffer concentration. The data were fitted using Origin 6.1 (Microcal Software, Inc.).

EPR Spin-Trapping Experiments. EPR spin-trapping spectra with MNP were recorded at room temperature using a Bruker EMX spectrometer. All of the spectra were recorded after 4 min of reagents incubation, in 500 mM phosphate buffer, pH 7.2. At the end of the experiment, the pH was measured to detect possible changes caused by the addition of alkaline stock solutions of peroxynitrite to the buffered reaction mixtures. The instrumental conditions were as follows: microwave power, 20.21 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.840 ms; and receiver gain, 2.52×10^3 .

Capillary Electrophoresis. The electropherogram traces for acetate analysis were obtained with an electrophoretic system (Agilent Technologies, model HP ³D CE, Palo Alto, CA) equipped with a diode array detector set at 191 nm and the temperature control device maintained at 25 $^{\circ}\text{C}$. The background electrolyte was 20 mM sodium tetraborate and 0.3 mM CTAB. Fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with dimensions of 48.5 cm total length (40 cm effective length) and 75 μm ID $\times$ 375 μm OD were used. Separation was performed at a constant voltage (−22 kV). Samples were injected hydrodynamically with 50 mbar for 3 s. Aliquots of peroxynitrite and phosphoric acid (5 mM), sufficient to obtain a final pH ranging from 7.1 to 7.5, were added to the millimolar diacetyl-containing solution vigorously stirred with a Vortex system before taking capillary electrophoresis measurements. 2-Hydroxyisobutyric acid was used as an internal standard, and the acetate in the reaction mixture was analyzed immediately. Tests carried out 4 min, 20 min, and 24 h after the addition of peroxynitrite revealed that the remaining diacetyl slowly underwent further oxidation, thus augmenting the final concentration of acetate in the reaction mixture.

Results

Peroxynitrite Decay. Experiments on peroxynitrite/diacetyl mixtures (Figure 1A,B) monitored at 302 nm by UV spectrophotometry/stopped-flow confirmed data previously reported by Yang et al. (26) to the fact that peroxynitrite reacts much faster ($k_2 = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in 1:9 acetonitrile:water) with diacetyl in phosphate buffer than do monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for acetaldehyde, propionaldehyde, and pyruvate) in similar experimental conditions. In the present work, the observed pseudofirst-order rate constants (k_{obs}) obtained from the peroxynitrite decay in the presence of diacetyl minus the rate of spontaneous peroxynitrite decomposition under the same conditions (k_0) were plotted against the diacetyl concentration to calculate the apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}} = 2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Figure 1B). This value was then corrected for the fraction of hydrated diacetyl in aqueous medium, 76% according to Yang et al. (26). The resulting k_2 value for the addition of peroxynitrite to diacetyl was then calculated as $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, therefore approaching that reported by Lyman and Hurst (38) and Denicola et al. (18) for carbon dioxide: 2.9

Figure 1. Stopped-flow experiments with the diacetyl/peroxynitrite system. (A) pH profile of the reaction of diacetyl (1.0 mM) with peroxynitrite (500 μM) in normally aerated 250 mM phosphate buffer. (B) Pseudofirst-order rate constants (k_{obs}) for the decomposition of peroxynitrite (500 μM) in the presence of increasing concentrations of diacetyl in the same buffer, pH 7.2, at 25 $^{\circ}\text{C}$.

$\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 24 $^{\circ}\text{C}$ and $5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at 37 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The fact that H_2PO_4^- acts as a general acid catalyst of the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl was supported by the rising values of ($k_{\text{obs}} - k_0$) measured at increasing concentrations of phosphate (not shown). A 6-fold increase in the rate constant was observed by raising the phosphate concentration, pH 7.8, from 100 to 500 mM (not shown). In addition, the peroxynitrite self-decomposition rate ($k_{\text{obs}} = 6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) was not significantly affected by the phosphate concentration. The bell-shaped pH profile of this reaction peaks at roughly 7.2, probably reflecting the overlap of two titration curves: the peroxynitrous acid dissociation ($\text{p}K_{\text{a}} = 6.8$) to peroxynitrite, a reactive nucleophile, which prevails in the ascending part, and the decrease of $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ($\text{p}K_{\text{a}}$ of $\text{H}_2\text{PO}_4^- = 7.2$), the catalyst of nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl, which governs the downward curvature (Figure 1A).

Oxygen Uptake. The addition of peroxynitrite (0.25–1.0 mM) to a normally aerated 200 mM phosphate solution ($[\text{O}_2] \sim 220 \mu\text{M}$), pH 7.2, containing diacetyl (1.0–5.0 mM) rapidly triggers oxygen consumption (Figure 2A,B). The oxygen uptake rate responds to the increase of both peroxynitrite and diacetyl

Figure 2. Time course of oxygen uptake by diacetyl treated with peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 37 $^{\circ}\text{C}$. (A) Diacetyl (5.0 mM) in the absence of peroxynitrite (a) and diacetyl 1.0 (b), 2.0 (c), 3.0 (d), and 5.0 mM (e), treated with peroxynitrite (1 mM). (B) Diacetyl (1.0 mM) in the absence (a) and in the presence of 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.0 (e), 1.25 (f), and 1.5 mM (g) peroxynitrite.

concentrations. Under our experimental conditions, molecular oxygen evolution from peroxynitrite alone was observed (control) but occurred in negligible amounts ($<5\%$) as reported previously (39). As mentioned earlier herein, the effective concentration of diacetyl is actually much lower than the nominal value due to its hydration in phosphate-buffered solutions: $[\text{hydrate}]/[\text{ketone}] = 3.3$ for diacetyl and 0 (zero) for acetone (26). This difference reflects the higher electrophilicity of diacetyl than acetone due to the electron-deficient carbonyl group of free diacetyl (Scheme 2).

Product Analysis. The reaction pathway depicted by Scheme 1 predicts formation of acetate by the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. Uppu et al. reported that carboxylic acids are formed in low yields from the reaction of aldehydes with peroxynitrite (~ 0.2 mol acetate/mol peroxynitrite) (24), whereas Yang et al. (26) disregarded the formation of carboxylic fragments from the reaction of various ketones with peroxynitrite.

Peroxyntitrite was added dropwise to a stirring solution of aqueous diacetyl contained in aluminum foil-darkened Eppendorf tubes, and the final reaction mixture was immediately subjected to electrophoretic analysis (Figure 3). To prevent interference of high phosphate in the electropherograms, the reactions were run by finely controlled, calculated additions of peroxynitrite and phosphoric acid aliquots to the diacetyl-

Figure 3. Electropherogram of acetate detected in the final reaction mixture of diacetyl/peroxynitrite. The reaction was performed in the presence (A) and absence (B) of diacetyl. (C) Standard mixture: acetate + 2-hydroxyisobutyrate (internal standard). Experimental conditions: 20 mM sodium tetraborate; 0.30 mM CTAB; capillary L_{det} , 40 cm; L_{tot} , 48.5 cm; ID, 75 μm ; detection, 191 nm; voltage, -22 kV; injection, 3 s; 50 mbar; and 25 $^{\circ}\text{C}$. Equipment Agilent CE³D. Peak identification: 1, CTAB; 2, nitrate + nitrite; 3, phosphate; 4, acetate; and 5, 2-hydroxyisobutyrate.

Table 1. Chemical Yields (mM) of Acetate Produced by the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Aqueous Solution and Determined by Capillary Electrophoresis^a

[ONOO ⁻] (mM)	[diacetyl] (mM)		
	0.50	2.0	5.0
0.00	ND ^b	ND ^b	0.09 $\pm$ 0.04
0.19	0.24 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.05
0.25	0.32 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.06
0.38	0.37 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.09
0.56	0.41 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.1
0.75	0.54 $\pm$ 0.04	1.18 $\pm$ 0.09	1.6 $\pm$ 0.1

^a The final pH is in the range of 7.1–7.5. ^b Not detected.

containing aqueous solution aiming to reach a final pH of approximately 7.2. Only reaction mixtures with pH values ranging from 7.1 to 7.5 were analyzed by capillary electrophoresis. Peroxynitrite was added to the diacetyl-containing solution under constant Vortex agitation, so that the dissolved oxygen concentration was kept at a saturating, nonlimiting level. Roughly stoichiometric acetate yields, based on the peroxynitrite concentration, were found in the spent reaction mixture in which diacetyl was not limiting (5.0 mM) (Table 1). Trace amounts of acetate, attributable to adventitious metal-catalyzed oxidation of diacetyl by dissolved oxygen, were found in the control without peroxynitrite: 0.09 mM acetate from 5.0 mM diacetyl stirred under the same conditions.

EPR Spin Trapping. EPR spin-trapping studies with MNP were conducted in normally aerated diacetyl- and peroxynitrite-containing phosphate buffer to detect and possibly identify carbon-centered radical intermediates. The intensity of the EPR signal, assignable to an MNP-acetyl radical adduct ($a_N = 0.83$ mT; lit. NIEHS 0.78–0.83 mT), is enhanced at increasing concentrations of either diacetyl or peroxynitrite (Figure 4A,B). Acetyl radical had been previously found by EPR spin trapping to be formed in the chemiluminescent reaction of 3-methylacetoacetone with hydrogen peroxide/horseradish peroxidase in normally aerated phosphate buffer. In this case, acetyl radical results from the α -cleavage of triplet diacetyl formed during the chemiluminescent reaction. As expected, the acetyl adduct signal is quenched upon addition of bicarbonate due to the competition between 5 mM diacetyl ($k_2 = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and resulting 2.5–20 mM CO_2 ($k_2 = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (18)

for the nucleophile peroxynitrite (2.5 mM) (Figure 5). Noteworthy is that complete elimination of the acetyl radical adduct could be attained only at 20 mM bicarbonate.

Once formed from the adduct diacetyl-peroxynitrite, acetyl radical is expected to be rapidly destroyed by the dissolved oxygen yielding acetylperoxyl radical, whose dismutation generates acetyloxyl radical and restores half of the oxygen consumed. Dimerization of acetyloxyl radical gives acetic peroxyanhydride, whose hydrolysis produces acetic acid and peracetic acid, and the combination of acetyloxyl radical with acetyl radical yields acetic anhydride, whose hydrolysis yields the final product, acetic acid. This hypothesis is summarized by Scheme 2.

Histidine and dGuo Radical Acetylation. The HPLC trace and mass spectrum of the spent reaction mixture of diacetyl with peroxynitrite in the presence of histidine monitored in the EPI positive mode are depicted by Figure 6A,B. The single charged ion at m/z 198 corresponds to an acetyl-histidine adduct not yet identified. Products attributable to polyacetylated histidine (e.g., $m/z = 240$ or 282) were not detected. Because amino acids with apolar side chains such as alanine, valine, and leucine were found to be equally acetylated by the diacetyl/peroxynitrite system (not shown) and EPR analysis of the histidine-containing reaction mixture did not exhibit any extra carbon-centered radical adduct signals but that of acetyl radical, it is tempting to assign the spin adduct to the N(α)-acetyl-L-histidine isomer. Noteworthy in this regard is that recent theoretical calculations conducted by Kyne et al. (40) on methanimine, ethylene, and aminoethylene indicated that the energy activation values for acetyl radical addition to $\text{C}=\text{N}$ and $\text{C}=\text{C}$ bonds are much lower in the latter case, which would predict formation of a carbon-centered adduct upon addition of acetyl radical to the histidine imidazole moiety.

Figure 7A shows the HPLC chromatogram of the final reaction mixture of diacetyl with peroxynitrite in dGuo-containing aerated phosphate buffer. The separation was also monitored in the EPI mode, using the m/z 310 ion (monoacetylated dGuo) as the precursor. Three peaks (1, 2, and 3) with the same molecular mass (310) appeared in the chromatogram, attesting the formation of three dGuo-derived acetylated isomers. The mass spectra of analytes 1–3 are shown by the spectra in Figure 7B–D, respectively. Interestingly, analytes 1 and 2 present similar mass spectra whereas analyte 3 does not originate fragment m/z 194, suggesting acetylation at the guanine moiety since 194 refers to acetylguanine. Furthermore, EPI experiments were conducted using the 352 and 394 m/z ions as precursors, corresponding to di- and triacetylated dGuo, respectively, and were carried out, but only the m/z 352 ion was detected (not shown). Aiming to confirm that analyte 3 does not originate fragment 194, an MS³ experiment was performed using the m/z 310 ion as precursor 1 and the 194 ion as precursor 2.

That in fact acetyl radical produced by the peroxynitrite/diacetyl system is scavenged by both histidine and dGuo was shown by EPR spin-trapping competitive experiments with MNP at similar experimental conditions. Histidine (0.50 and 1.0 mM) added to the reaction mixture of diacetyl (5.0 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) containing MNP (20 mM) was shown to quench the EPR signal of the MNP-acetyl radical adduct by 65 and 90%, respectively. With dGuo (0.25 mM), 75% quenching was observed with 2.5 mM diacetyl, 1.0 mM peroxynitrite, and 5.0 mM MNP in the standard phosphate buffer.

Figure 4. EPR spectra of an MNP radical adduct obtained with 20 mM MNP in phosphate buffer 500 mM, pH 7.2, after incubation with diacetyl/ peroxyntirite for 4 min at room temperature. (A) Diacetyl (10 mM) without (a) and with 1 (b), 2.5 (c), and 5 (d) mM peroxyntirite. (B) Peroxyntirite (2.5 mM) without (a) and with 5 (b), 10 (c), and 20 (d) mM diacetyl. MNP-CH₃CO[•] adduct: $a_N = a_H = 0.83$ mT (lit. NIEHS = 0.78–0.83 mT for the MNP-acetyl radical adduct).

Figure 5. Carbonate effect on the amplitude of the EPR signal of the putative MNP-CH₃CO[•] adduct. The reaction of peroxyntirite with diacetyl was performed in 200 mM aerated phosphate buffer, pH 7.2, 4 min of incubation, at room temperature. Diacetyl (5.0 mM) and peroxyntirite (2.5 mM) without (a) and with 2.5 (b), 5.0 (c), 10.0 (d), and 20 (e) mM (f) bicarbonate.

Discussion

Uppu et al. (19), Vázquez-Vivar et al. (41), and Nakao et al. (20) reported that, following the nucleophilic attack of peroxyntirite anion on the carbonyl group of propanal, pyruvate, and acetaldehyde, respectively, a small fraction of the nascent 1-hydroxyalkylperoxyntirite anion adduct undergoes O–O homolysis, yielding NO₂ and an alkoxyl radical whose β -cleavage produces a carboxylate anion and an alkyl radical (Scheme 1, route 1b). The majority of the peroxo adduct mediated by either homolytic or heterolytic cleavage at the O–O bond was suggested to give a radical or an ion pair, respectively, which rearranges to nitrate and regenerated carbonyl reagent. Consequently, the main role of carbonyls in such reactions is to catalyze the isomerization of peroxyntirite to nitrate. The studies of the aforementioned authors, in general carried out in

Figure 6. HPLC/MS studies of the reaction of diacetyl with peroxyntirite in the presence of L-histidine. (A) HPLC chromatogram of 5.0 mM diacetyl treated with 2.0 mM peroxyntirite and 2.0 mM L-histidine in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C. Acetyl-histidine (1.80 min peak) separation was monitored at 198 amu. (B) Mass spectrum of the acetylhistidine adduct, whose identification is confirmed by the molecule fragments.

nonbuffered pH 7 aqueous solutions containing millimolar amounts of carbonyl compound (≥ 10 mM), revealed low chemical yields of carboxylate anion byproducts: 19% from acetaldehyde (24), 18% from pyruvate (41), and 8% formate

Figure 7. HPLC/MS studies of the reaction of diacetyl with peroxynitrite in the presence of dGuo. (A) HPLC chromatogram of 5.0 mM diacetyl treated with 2.0 mM peroxynitrite and 2.0 mM dGuo in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C. Peaks 1, 2, and 3, corresponding to dGuo and acetyl radical adducts, were monitored at 310 amu. Inset A shows the yield of adduct 1 at increasing concentrations of diacetyl. (B–D) Acetyl-dGuo mass spectra corresponding to peaks 1–3, respectively, detected by multiple reaction monitoring (MRM) system (310: 152 amu).

and 25% acetate from acetaldehyde (25). All of the yields were calculated from the added peroxynitrite of 1–10 mM.

On the basis of a study of peroxynitrite additions to diacetyl and other ketones “activated” by vicinal electron-withdrawing groups, Yang et al. (26) reported an alkene epoxidative capacity of the peroxo adduct, which was attributed to the formation of a dioxirane intermediate plus nitrite ion, whose redox combination yields reformed ketone and nitrate (Scheme 1, route c). In 0.16 M phosphate buffer, pH 7.4, the addition of 0.64 mM peroxynitrite to 2.9 mM diacetyl led to a final consumption of only 10% of diacetyl, possibly converted to carboxylic acids (acetic acid?). However, when carried out in the presence of 1,3-dimethylcyclohexene, the diacetyl/peroxynitrite reaction also afforded 23% of *trans*-olefin epoxide, which was taken as irrefutable evidence of a diacetyl dioxirane intermediate. Possible olefin epoxidation driven by peracetic acid, expected to be formed by the reaction between diacetyl and peroxynitrite (Scheme 2), was not experimentally investigated.

We confirm here that peroxynitrite (0.25–1.5 mM) reacts rapidly with diacetyl (1–5 mM) in phosphate buffer at pH 6.4–8.0, describing a bell-shaped profile with a maximum at pH 7.2 (Figure 1A) (26). This pH profile and the phosphate concentration-dependent rates depicted in Figure 1B are consistent with the proposal that the reaction proceeds by H_2PO_4^- ($\text{p}K_a \sim 7.2$)-catalyzed nucleophilic addition of the peroxynitrite anion to the carbonyl group. Because each diacetyl carbonyl group is activated by the adjacent electron-withdrawing carbonyl group, it is not surprising that the measured k_2 rate constant for the pair diacetyl/ ONOO^- ($1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in water; this work) and $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in acetonitrile:water 19:1, pH 7.4, at 24 °C (26)—approaches that reported for the addition of peroxynitrite to CO_2 ($5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (18). Although the physiological concentrations of both peroxynitrite and diacetyl, or other α -dicarbonyls such as methylglyoxal, are expected to be several orders of magnitude lower than those tested in the present work, a high second-order rate constant ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) may render this reaction kinetically favorable if it occurs in a cell microenvironment where the formation of both NO, superoxide radicals, and carbonyls formation is exacerbated, as in the case of diabetes (42), D-serine-induced nephrotoxicity (43), and inflammatory conditions (44). The study described here should be viewed in perspective, as the actual physiological and pathological concentrations of both diacetyl and peroxynitrite are not known. Nevertheless, chemical damage to biomolecules in pathological conditions has to be characterized as a result from long-term toxicant exposure and in situ processes.

Figure 2AB indicates that the reaction of peroxynitrite with diacetyl is accompanied by oxygen uptake dependent on the concentration of both reagents, while Table 1 shows that acetate, analyzed by capillary electrophoresis (Figure 3), is the main product from this reaction. Important to note is that the acetate yields were measured in the spent reaction mixtures obtained by dripping peroxynitrite on vigorously stirred diacetyl solutions in aqueous medium, whose pH (7.1–7.5) was ascertained by the addition of calculated amounts of phosphoric acid. Under these experimental conditions, molecular oxygen is not a limiting factor for full substrate oxidation. The stoichiometric formation of acetate (0.43 mM) was obtained from 0.19 mM peroxynitrite and excess diacetyl (5.0 mM) and from 0.75 mM peroxynitrite and 5.0 mM diacetyl (Table 1). As expected, at limiting diacetyl concentrations (0.5 mM), the acetate yields were much lower: 36–66% acetate based on added peroxynitrite (0.19–0.75 mM).

The fact that, in the presence of oxygen, the reaction of peroxynitrite with diacetyl to acetate ions proceeds via acetyl radicals was strongly suggested by EPR spin-trapping experiments with MNP. A three-line spectrum with $a_H = a_N = 0.83$

Scheme 3. Radical Acetylation of L-Histidine and 2'-Deoxyguanosine Coupled to the Reaction of Peroxynitrite with Diacetyl in Aerated Aqueous Medium

mT characteristic of the MNP-CH₃CO[•] adduct was traced with MNP-containing peroxynitrite/diacetyl mixtures (Figure 4). The signal amplitudes responded to the concentrations of both reagents. In agreement with the relative k_2 rate constants measured for the reaction of peroxynitrite with diacetyl ($1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and carbon dioxide ($5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), a competition was observed between diacetyl (5 mM) and added carbonate (2.5–20 mM) for the spin trap. Complete quenching of the diacetyl EPR adduct signal was verified at 20 mM carbonate (Figure 5).

Knowing that the pair peroxynitrite/diacetyl produces acetyl radicals at apparently high yields (Figure 3A,B) prompted us to check whether this reagent can acetylate amino acids and DNA bases. Indeed, the final reaction mixtures obtained by the addition of peroxynitrite to L-histidine and dGuo-containing diacetyl solutions were shown to contain the corresponding acetylated fragments: His-COCH₃ ($M^+ m/z = 198$) and dGuo-COCH₃ ($M^+ m/z = 310$), indicated in Figures 6 and 7, respectively. The spectrum depicted by Figure 7B is identical to that reported by Nukaya et al. for standard N²-acetyl-2'-deoxyguanosine ($m/z = 310 (M + 1)$) (45). The daughter ions 194 (base peak) and 152 were assigned to fragments formed by the release of sugar and acetyl substituents, respectively.

Scheme 3 summarizes the data reported here. Worth noting is that the enzymatic acetylation/deacetylation of histones, transcription factors, nuclear import factors, α -tubulin, lenticular crystalline, adenylate kinase, cytochrome *c*, and many other proteins regulates diverse cellular functions, including DNA repair, hormone signaling, and the cell cycle (46–48). On the other hand, physiological and xenobiotic-triggered post-translational covalent alkylation of DNA bases leading to altered DNA and protein structures and functions is also a firmly established biological event. Work is in progress to promote radical acetylations of other amino acids (especially L-lysine as it is the main target of acetylases), peptides and standard proteins (e.g., serum albumin, ribonuclease, and lysozyme), as well as other DNA bases and isolated DNA, to extend our hypothesis to these biopolymers and eventually validate it for real biological systems, particularly those where nitrative and carbonyl stress are recognized to operate concomitantly. Our results pave the way for identifying nonacetylase-catalyzed reactions of biomolecules that lead to possible cell injury and for unveiling new biomarkers of cell damage.

Acknowledgment. This work was supported by the Brazilian institutions Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the

Milênio Redoxoma. We are indebted to Dr. Brian Bandy (College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, CA) for a critical reading of this manuscript.

References

- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* 32, 841–859.
- Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 274, 842–848.
- Goldstein, S., Lind, J., and Merényi, G. (2005) Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chem. Rev.* 105, 2457–2470.
- Lobachev, V. L., and Rudakov, E. S. (2006) The chemistry of peroxynitrite. Reaction mechanisms and kinetics. *Russ. Chem. Rev.* 75, 375–396.
- Kalapos, M. P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110, 145–175.
- Sayre, L. M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X., and Tang, X. (2006) Protein adducts generated from products of lipid oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab. Rev.* 38, 651–675.
- Stadtman, E. R. (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 22–38.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 169–176.
- Awada, M., and Dedon, P. C. (2001) Formation of the N²-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1247–1253.
- Beal, M. F. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biol. Med.* 32, 797–803.
- Thornalley, P. J. (2002) Glycation in diabetic neuropathy: Characteristics, consequences, causes and therapeutic options. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 37–57.
- Miyata, T., Ishikawa, N., and van Ypersele de Strihou, C. (2003) Carbonyl stress and diabetic complications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1150–1158.
- Picklo, M. J. P., Sr., Montine, T. J., Amarnath, V., and Neely, M. D. (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 187–197.
- Oppermann, U. (2007) Carbonyl reductases: The complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 293–322.
- Lyons, T. J. (2002) Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. *Semin. Vasc. Med.* 2, 175–189.
- Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. C., and Augusto, O. (1999) Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274, 10802–10806.
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49–58.

- (19) Jain, S. K., McVie, R., and Bocchini, J. A., Jr. (2006) Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* 13, 163–170.
- (20) Cansever, M. S., and Erim, F. B. (2005) Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J. Chromatogr. B* 818, 309–311.
- (21) Lo, T. W., Selwood, T., and Thornalley, P. J. (1994) The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1865–1870.
- (22) Randell, E. W., Vasdev, S., and Gill, V. (2005) Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51, 153–157.
- (23) McLellan, A. C., Phillips, S. A., and Thornalley, P. J. (1992) The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxy-benzene. *Anal. Biochem.* 206, 17–23.
- (24) Uppu, R. M., Winston, G. W., and Pryor, W. A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1331–1337.
- (25) Nakao, L. S., Ouchi, D., and Augusto, O. (1997) Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite hydrogen peroxide-iron(II). Production of acetate and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1010–1018.
- (26) Yang, D., Tang, T., Chen, J., Wang, X., Bartberger, M. D., Houk, K. N., and Olson, L. (1999) Ketone-catalyzed decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 11976–11983.
- (27) Kovacic, P., and Cooksy, A. L. (2005) Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 79, 123–128.
- (28) Fujioka, K., and Shibamoto, T. (2006) Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ. Toxicol.* 21, 47–54.
- (29) Bartowsky, E. J., and Henschke, P. A. (2004) The buttery attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 235–252.
- (30) Harber, P., Saechao, K., and Boomus, C. (2006) Diacetyl-induced lung disease. *Toxicol. Rev.* 25, 261–272.
- (31) Hiraku, Y., and Kawanishi, S. (1999) Involvement of oxidative DNA damage and apoptosis in antitumor actions of aminosugars. *Free Radical Res.* 31, 389–403.
- (32) Bechara, E. J., Dutra, F., Cardoso, V. E., Sartori, A., Olympio, K. P., Penatti, C. A., Adhikari, A., and Assunção, N. A. (2006) The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 146, 88–110.
- (33) Miller, A. G., Meade, S. J., and Gerrard, J. A. (2003) New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: Structural requirements, the effect of enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 843–852.
- (34) Otsuka, M., Harada, N., Itabashi, T., and Ohmori, S. (1999) Blood and urinary levels of ethanol, acetaldehyde, and C4 compounds such as diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in normal male students after ethanol ingestion. *Alcohol* 17, 119–124.
- (35) Otsuka, M., Mine, T., Ohuchi, K., and Ohmori, S. (1996) A detoxification route for acetaldehyde: Metabolism of diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in liver homogenate and perfused liver of rats. *J. Biochem.* 119, 246–251.
- (36) Otsuka, M., and Ohmori, S. (1992) Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcoholic drinks by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.* 577, 215–220.
- (37) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624.
- (38) Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8867–8868.
- (39) Alvarez, B., Denicola, A., and Radi, R. (1995) Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: Formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 859–864.
- (40) Kyne, S. H., Schiesser, C. H., and Matsubara, H. (2008) Multiorbital interactions during acyl radical addition reactions involving imines and electron-rich olefins. *J. Org. Chem.* 73, 427–434.
- (41) Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., and Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 786–794.
- (42) Stadler, K., Jenei, V., Somogyi, A., and Jakus, J. (2005) Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 189–196.
- (43) Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O., Sanchez-Gonzalez, D. J., Martinez-Marionez, C. M., Floriano-Sanchez, E., Santamaria, A., Ramirez, V., Bobadilla, N. A., and Pedraza-Chaverri, J. (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229, 123–135.
- (44) Kessova, I. G., Ho, Y.-S., Thung, S., and Cederbaum, A. (2003) Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. *Hepatology* 38, 1136–1145.
- (45) Nukaya, H., Iwami, T., Ishida, H., Tsuji, K., Suwa, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., and Kosuge, T. (1990) N-2 Acetylation of 2'-deoxyguanosine by coffee mutagens, methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 245, 251–257.
- (46) Kouzarides, T. (2000) Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176–1179.
- (47) Backs, J., and Olson, E. N. (2006) Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ. Res.* 98, 15–24.
- (48) Ito, T. (2007) Role of histone modification in chromatin dynamics. *J. Biochem.* 141, 609–614.

TX7002799

ANEXO B. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation

Chem. Res. Toxicol. **2010**, 23, 1762–1770

Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation

Júlio Massari,^{†,‡} Rita Tokikawa,[†] Luiz Zanolli,[‡] Marina Franco Maggi Tavares,[‡]
Nilson Antônio Assunção,[§] and Etelvino José Henriques Bechara^{*,†,§}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Received July 1, 2010

Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation

Júlio Massari,^{†,‡} Rita Tokikawa,[†] Luiz Zanolli,[‡] Marina Franco Maggi Tavares,[‡]
Nilson Antônio Assunção,[§] and Etelvino José Henriques Bechara^{*,†,§}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Received July 1, 2010

Methylglyoxal is an α -oxoaldehyde putatively produced in excess from triose phosphates, aminoacetone, and acetone in some disorders, particularly in diabetes. Here, we investigate the nucleophilic addition of ONOO^- , known as a potent oxidant and nucleophile, to methylglyoxal, yielding an acetyl radical intermediate and ultimately formate and acetate ions. The rate of ONOO^- decay in the presence of methylglyoxal [$k_{2,\text{app}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] at pH 7.2 and 25 °C was found to be faster than that reported with monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), diacetyl ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), or CO_2 ($k_2 = 3\text{--}6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The pH profile of the methylglyoxal–peroxynitrite reaction describes an ascendant curve with an inflection around pH 7.2, which roughly coincides with the pK_a values of both ONOOH and H_2PO_4^- ion. Electron paramagnetic resonance spin trapping experiments with 2-methyl-2-nitrosopropane revealed concentration-dependent formation of an adduct that can be attributed to 2-methyl-2-nitrosopropane- $\text{CH}_3\text{CO}^\bullet$ ($a_N = 0.83 \text{ mT}$). Spin trapping with 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate gave a signal that could be assigned to a methyl radical adduct [$a_N = 1.41 \text{ mT}$; $a_H = 1.35 \text{ mT}$; $a_{H(m)} = 0.08 \text{ mT}$]. The 2-methyl-2-nitrosopropane- $\text{CH}_3\text{CO}^\bullet$ adduct could also be observed by replacement of ONOO^- with H_2O_2 , although at much lower yields. Acetyl radicals could be also trapped by added L-lysine as indicated by the presence of ^6N -acetyl-L-lysine in the spent reaction mixture. This raises the hypothesis that $\text{ONOO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ in the presence of methylglyoxal is endowed with the potential to acetylate proteins in post-translational processes.

Introduction

Methylglyoxal (MG) is a highly reactive α -oxoaldehyde putatively produced in vivo by three distinct enzymatic routes [(i) formation from triose phosphates, (ii) cytochrome P450 IIE1-catalyzed acetone oxidation, and (iii) amine oxidase(s)-driven amino acid breakdown] as well as by nonenzymatic pathways from glucose, triose phosphates, acetoacetate, succinylacetone, and aminoacetone (1–9). Exogenous sources of MG include many food products, beverages, fog and rainwater, urban atmosphere, and cigarette smoke (10). Although MG is normally consumed by glyoxalases, aldehyde oxidases, and other enzymes, MG undergoes biologically adverse nucleophilic additions and promotes protein aggregations that are purportedly involved in diabetes, Alzheimer's disease, and other age-related diseases (3, 4). Nanomolar to micromolar concentrations of free MG have been reported in normal human plasma (4), the variability being probably related to conjugation of MG with proteins and to different methods used in sample preparation and analysis (4, 11). According to Beisswenger et al. (12), the concentration of MG in blood plasma of normal human subjects

is $123 \pm 37 \text{ nM}$ and in type 2 diabetics $189.3 \pm 38.7 \text{ nM}$, while cellular concentrations of MG were in the range of $1\text{--}5 \text{ }\mu\text{M}$ (4).

The high reactivity of MG and other dicarbonyl metabolites (e.g., diacetyl, 4,5-dioxovaleric acid, and osazones) to biological nucleophiles (e.g., basic amino acids, DNA bases, and thiols) lies in the electron withdrawing effect of a vicinal carbonyl group, which increases the electrophilicity of the adjacent carbonyl moiety, thereby facilitating nucleophilic attack. Accordingly, MG has been found in aqueous solutions as a mixture of hydrated derivatives in dynamic equilibrium, where MG monohydrate (56–62%) and dihydrate (38–44%) forms prevail and only traces of the free form are observed (13). Experiments conducted by Thornalley and co-workers with MG in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C revealed the approximate ratio of these forms of 28:71:1 (MG monohydrate: MG dihydrate:free MG) (14).

The higher reactivity of α -dicarbonyls, particularly MG, compared to that of monocarbonyls, explains the recently reported k_2 value for the addition of peroxynitrite anion to diacetyl ($\approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (15, 16) that is 1 order of magnitude higher than that of monocarbonyls ($< 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (16–18). In addition to being a powerful nucleophile, peroxynitrite can directly or indirectly drive one- and two-electron oxidations, nitrosations, and nitrations of biomolecules, of which a number of final products have been detected and adopted as biomarkers of disorders. The detection of these products in biological samples allows them to be linked with the clinical manifestations of various maladies such as Alzheimer's disease, rheumatoid

* To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11-30913869. Fax: 55-11-38155579. E-mail: ebechara@iq.usp.br.

[†] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[‡] Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[§] Universidade Federal de São Paulo.

Scheme 1. Hypothetical Mechanism Pathways for the Peroxynitrite-Initiated Aerobic Oxidation of MG in an Aqueous Medium to Formate and Acetate Ions, Mediated by Acetyl Radical^a

^a The data obtained from kinetic, product, and spectroscopic analyses favor route 1, predicted by the long-known higher reactivity of aldehydes with nucleophiles compared to that of ketones.

arthritis, atherosclerosis, lung injury, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, cancer, and drug-dependent toxicity (19–28).

Recently, when revisiting the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl, first studied by Yang et al. (16), we demonstrated large amounts of acetyl radical intermediate in the reaction mixture allowing coupled acetylation of added L-histidine or 2'-deoxyguanosine (dGuo) (15). On the basis of previous work by Pryor's group (17) and Augusto's group (18), the mechanism underlying acetyl radical production was envisaged as being initiated by nucleophilic attack of peroxynitrite on diacetyl yielding a hypothetical nitrosoperoxydiacetyl intermediate, whose homolysis yields nitrogen dioxide and an oxy radical. The latter then undergoes β -cleavage producing two fragments, acetate anion and acetyl radical, whose fate can be direct oxidation by dissolved dioxygen, ultimately yielding acetate anion, or addition to L-His or dGuo, forming the corresponding acetylated compounds (Scheme 1). In vivo, more than 99% of produced MG may be consumed by proteins via Schiff additions to arginine and lysine residues (29, 30). Knowing that enzymatic post-translational acetylations and deacetylations of proteins regulate key cellular events (31), the authors raised the hypothesis that diacetyl- or MG-triggered radical acetylation in vivo might contribute to these epigenetic processes.

We show here that MG reacts with peroxynitrite 10-fold faster than does diacetyl and may eventually compete with HCO_3^- /

CO_2 as an electrophilic target in the peroxynitrite reaction, although one should keep in mind the fact that the concentration of bicarbonate in tissues is 4 orders of magnitude higher than that of MG (4, 21). Acetyl radical, produced by MG-oxy radical homolysis, and methyl radical, probably formed from decarbonylation of acetyl radical, were captured by electron spin paramagnetic resonance (EPR) using appropriate spin traps. Acetate and formate are expectedly the main reaction products. Finally, previous addition of L-lysine to the reaction mixture yielded the corresponding ^εN-acetylated amino acid.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents. HPLC grade acetonitrile, ammonium formate, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Chelex-100, 3,5-dinitrobenzoic acid (DNB), 2,4-dinitrophenylhydrazine, HPCL grade methanol, 2-methyl-2-nitrosopropane dimer (MNP), a 40% aqueous methylglyoxal (MG) solution, H_3PO_4 , and NaNO_2 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Acetic acid, HCl, H_2O_2 , MnO_2 , NaOH, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). L-Lysine-HCl was acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). The spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonic acid (DBNBS) was synthesized as previously described (32). Peroxynitrite was synthesized from NaNO_2 (0.60 M) and H_2O_2 (0.70 M), in HCl (0.60 M) and NaOH (1.50 M) in a quench-flow reactor (33). Excess H_2O_2 in the alkali peroxynitrite solution was eliminated with MnO_2 . Concentrations of H_2O_2 and peroxynitrite were determined spectrophotometrically at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (34) and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (33, 35), respectively. The peroxynitrite concentrations obtained by this method ranged from 300 to 450 mM. Stock solutions of peroxynitrite were kept on ice in the dark. All the solutions were prepared in Millipore Milli-Q purified water, and the buffers were pretreated with Chelex-100 to remove metal contaminants. Methylglyoxal stock solutions were determined by previous derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine in MeOH-HCl for 40 min at 42 °C, which yields an adduct measured at 432 nm ($\epsilon = 39300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (36).

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decay was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics model SX-18 V) at 302 nm. The temperature was kept constant at 25.0 ± 0.2 °C, and the pH values of the reaction mixtures were determined by a simulated experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The initial concentration of peroxynitrite was kept at 200 μM . Pseudo-first-order rates, k_{obs} (s^{-1}), were determined by linear fit from $\ln A$ versus time (0–30 ms). The results of 9–12 measurements were averaged to yield each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was calculated from slopes of the plots of k_{obs} versus MG concentration. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before the data were plotted versus pH or phosphate buffer concentration. All the data were fit using Origin 7 (Microcal Software, Inc.).

EPR Spin Trapping Experiments. EPR spin trapping spectra with MNP were recorded at room temperature using a Bruker EMX spectrometer. All of the spectra were recorded after incubation of the reagents for 4 min, except when the spin trap was DBNBS (2 min), in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2). At the end of the experiment, the pH was measured to detect possible changes caused by the addition of alkaline stock solutions of peroxynitrite to the buffered reaction mixtures. The instrumental conditions were as follows: microwave power, 20.17 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.840 ms; and receiver gain, 2.52×10^4 for experiments conducted with MG, peroxynitrite, MNP, and bicarbonate and 2.52×10^5 for experiments with DBNBS as the spin trap or MG, H_2O_2 , and MNP.

Oxygen Consumption. Oxygen uptake was monitored in a Hansatech oxygraph equipped with a Clark type electrode. All the experiments were conducted in air-equilibrated 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C.

Capillary Electrophoretic Analysis. The electropherogram traces for carboxylic acids were obtained with a system (model P/ACE 551) from Beckman Instruments (Fullerton, CA) equipped with a filter-carrousel UV detector set at 254 nm for indirect detection, with the temperature control device maintained at 25 °C. The background electrolyte was 10 mM DNB, with 0.10 mM CTAB, and the final pH was 3.6. Fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with dimensions of 50.0 cm (total length) (40 cm effective length), 50 μm (inside diameter), and 375 μm (outside diameter) were used. Separation was performed at a constant voltage (−20 kV). Samples were injected hydrodynamically with 1 psi for 3 s. Aliquots of peroxyxynitrite and phosphoric acid (2.5–11.0 mM), sufficient to obtain a final pH ranging from 7.1 to 7.5, were added to the millimolar MG-containing solution, which was stirred vigorously in a Vortex system before capillary electrophoresis (CE) measurements were taken. Oxalic acid was used as an internal standard, and the reaction mixture was analyzed immediately.

CE-MS/MS Analysis. All analyses were performed with a P/ACE MDQ system from Beckman Instruments, coupled to a Thermo Finnigan mass spectrometer (MS), a model LCQ Ion Max Advanced with an electron spray ion source, and an ion trap analyzer from Thermo Electron Corp. (Waltham, MA). The sheath liquid (50:49.5:0.5 methanol/water/acetic acid mixture) was pumped (5 $\mu\text{L}/\text{min}$) into the interface with a syringe from Hamilton (Reno, NV) installed in the MS. An uncoated fused-silica capillary from

Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) was used (total length of 90 cm and inside diameter of 50 μm). Separation was performed at a constant voltage (25 kV). The separation buffer was 50 mM ammonium acetate (pH 3.5). The CE capillary was preconditioned with 1.00 M NH_4OH , deionized water, and finally separation buffer for 5 min in each step at a pressure of 50 psi. Samples were injected hydrodynamically (injection time of 10 s at 2 psi). Experimental MS and MS/MS conditions were as follows: number of microscans, 3; microscan time, 200 ms; capillary temperature, 275 °C; spray voltage, 27 V; and tube lens offset, −8 V. MS/MS experiments were conducted in the positive ion mode at an ion spray voltage of 4.5 kV. Mass spectrometry tuning was performed with Xcalibur 1.4 SR1 (Thermo Electron Corp.) using a direct infusion of 20 μM L-lysine at a pressure of 10 psi. Data acquisition was performed by MS/MS scans at the most intense peaks with the normalized collision energy for MS/MS set to 35% and an isolation width of m/z 1.0. A minimal signal intensity threshold of 1×10^3 was set for the acquisition of the MS/MS data. Nitrogen was used as a nebulization and sweep gas at flow rates of 15 and 5 arbitrary units, respectively, and helium was used for the fragmentation process.

Results

Peroxyxynitrite Decay. Time courses of the consumption of peroxyxynitrite (200 μM) by MG (0–20 mM), monitored at 302 nm, are shown in Figure 1A. The pseudo-first-order rate

Figure 1. Stopped-flow kinetics of peroxyxynitrite decay in the presence of MG. (A) Kinetic traces of peroxyxynitrite (200 μM) decay at different MG concentrations (0–20 mM) in air-equilibrated 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C. (B) Pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) for the decay of peroxyxynitrite in the presence of MG under the same experimental conditions. Each k_{obs} value represents the mean of nine measurements. (C) pH profile of the reaction of MG (3.0 mM) with peroxyxynitrite (200 μM) in air-equilibrated 250 mM phosphate buffer at 25 °C. (D) Catalytic effect of phosphate anion on the observed rate of peroxyxynitrite (200 μM) treated with MG (4.0 mM) at pH 7.2 and 25 °C. The ionic strength of the phosphate buffer was kept constant via the addition of sodium chloride. The data represent the means of nine independent measurements.

Figure 2. Time courses of uptake of oxygen by MG treated with peroxynitrite, in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C. (A) MG (1.0 mM) in the absence of peroxynitrite (a) and 0.05 (b), 0.10 (c), 0.25 (d), 0.50 (e), 1.00 (f), 1.50 (g), and 2.50 mM MG (h) treated with 1.0 mM peroxynitrite. (B) MG (1.0 mM) in the absence (a) and presence of 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.00 (e), 1.50 (f), and 2.00 mM peroxynitrite (g).

constants (k_{obs}) were found to increase linearly with the initial concentration of MG, revealing an apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) equal to $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (mean value of three independent $k_{2,\text{app}}$ determinations) in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C (Figure 1B). Because (i) <1% of dissolved MG is present in the free ketoaldehyde form due to extensive MG hydration (13, 14) and (ii) the phosphate-catalyzed MG diol dehydration is a very slow process ($k_d = 7.7 \times 10^{-2}$ and $5.7 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for general acid and general base phosphate catalysis, respectively, at 25 °C, $\mu = 0.2 \text{ M}$) (37), the actual value of k_2 must be corrected by the expression $k_2 = k_{2,\text{app}}(1 + \text{unreactive forms/keto aldehyde form})$ (16), which gives a k_2 value of $\approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ assuming free MG as 1% of the nominal MG concentration. This value is 2 orders of magnitude higher than that observed for monocarbonyls (17, 18), 10-fold higher than that with diacetyl (15, 16), and 2–3 times higher than the rate constant reported for $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ at pH 7.2–7.4 and 25–37 °C ($3\text{--}6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (21, 38–40). The pH profile of the MG–peroxynitrite reaction, monitored in the pH range of 6.2–8.2, obeys a third-degree equation, displaying a shoulder at pH 7.2 (Figure 1C). Going from pH 6.2 to 7.2, the ascendant curve may be attributed to an increasing concentration of the nucleophile (peroxynitrite), and the concomitant decrease of the H_2PO_4^- anion concentration, which catalyzes the nucleophilic addition to MG (14). The sharper increase in the curve above pH 7.2 may be due to dehydration of MG diol to its free, reactive carbonyl form, catalyzed by the monophosphate anion, as suggested by Thornalley et al. (14) in their study of addition of aminoguanidine to MG, a much slower reaction ($k_2 = 178 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 37 °C) (14). The occurrence of general base catalysis by phosphate anion in the reaction of MG with peroxynitrite is supported by the linear dependence of k_{obs} on phosphate buffer concentration (0.05–0.50 M; pH 7.2) (Figure 1D).

Oxygen Uptake and Product Analysis. Addition of peroxynitrite to MG is expected to be followed by rearrangement of a peroxynitroso adduct to re-formed MG and nitrate ion, in parallel with adduct homolysis to a MG-derived oxyl radical that ultimately produces formate and acetyl radical by β -cleavage (15–18). Annihilation of acetyl radical by dissolved dioxygen would lead to acetate ion as a side product. Accordingly, uptake of oxygen by the MG (0.05–2.5 mM)–peroxynitrite (0.25–2.0 mM) system was found to occur in a reagent concentration-dependent fashion (Figure 2). Control experiments

Figure 3. CE of the reaction products of MG treated with peroxynitrite. Electropherograms of a standard mixture (a) and the final reaction mixture of 1.00 mM MG, treated with 1.00 mM peroxynitrite and 2.75 mM phosphoric acid, with the final pH ranging from 7.2 to 7.5 (b). Peak identification: (1) system peak, (2) nitrite, (3) nitrate, (4) phosphate, (5) glyoxalate, (6) formate, (7) oxalate (internal standard), and (8) acetate. Experimental conditions: 10 mM DNB with 0.10 mM CTAB (pH 3.6), fused-silica capillaries with 50.0 cm L_{tot} , 40 cm L_{eff} and 50 μm inside diameter and 375 μm outside diameter, separation at -20 kV , indirect detection at 254 nm, and samples injected hydrodynamically under 1 psi for 3 s. Control experiments with MG alone did not show the presence of formate or acetate.

with peroxynitrite alone showed the expected liberation of molecular oxygen, which was subtracted from the oxygen uptake curves obtained with the complete system. The total consumption of oxygen ($70 \pm 10 \mu\text{M}$; $n = 4$) by the reaction mixture containing 1.0 mM MG and 1.0 mM peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C was not affected upon addition of nitrite (0.10–5.0 mM), a known contaminant of peroxynitrite stock solutions (33), and a product of peroxynitrate decomposition (41, 42). Formate and acetate ions were detected by CE as the main products in the final reaction mixtures maintained under continuous aeration for 30 min (Figure 3 and Table 1). The equipment was calibrated with a mixture of nitrite, nitrate, phosphate, glyoxalate, formate, and acetate (products predicted by the proposed schemes) at known concentrations, and oxalate was used as an internal standard. The absence of glyoxalate in the electropherogram strongly supports the notion that the MG carbonyl group most prone to nucleophilic attack is indeed the aldehydic (C1), not the MG ketonic group (C2). Both MG and peroxynitrite (each at 1 mM) produced 0.59 mM acetate and 0.48 mM formate, i.e., approximately 50% chemical yield of MG fragmentation to acetate and formate in a 1:1 ratio. Initial concentrations of 2.5 mM MG and 3.0 mM peroxynitrite

Table 1. Product Analysis of the Reaction of MG with Peroxynitrite^a

[MG] (mM)	1.00 mM ONOO ⁻	1.50 mM ONOO ⁻	3.00 mM ONOO ⁻	4.50 mM ONOO ⁻
1.00	0.59* 0.48#	0.59* 0.56#	0.79* 0.68#	0.78* 0.63#
2.50	0.70* 0.74#	0.79* 0.86#	0.89* 0.93#	1.06* 0.89#
10.0	0.71* 0.39#	0.85* 0.62#	1.04* 0.67#	1.44* 0.82#

^a CE was used to separate and quantify formate (*) and acetate (#) present in the reaction mixture (see the electropherograms in Figure 3).

yielded both products at ~0.90 mM (~30%). Upon addition of nitrite (0.25 and 0.50 mM; $n = 4$) to a mixture containing 1.0 mM MG and peroxynitrite, the yields of formate and acetate did not change significantly.

Important to note is the fact that the reaction samples for measuring the chemical yield of products were prepared as previously reported in a similar study with diacetyl (15), where care was taken via adjustment of the pH with phosphoric acid to keep the final pH between 7.1 and 7.5, and the oxygen concentration was not limiting because of the vigorous stirring of the reaction mixture.

EPR Spin Trapping Studies. EPR spin trapping studies with 20 mM MNP or 10 mM DBNBS were conducted in normally aerated MG-containing phosphate buffer upon treatment with peroxynitrite to possibly detect and identify carbon-centered radical intermediates.

In the presence of MNP, MG and peroxynitrite gave a triplet signal with an a_N of 0.83 mT that could be assigned to the MNP-acetyl radical adduct (for lit. NIEHS, $a_N = 0.78$ –0.83

Figure 4. EPR spin trapping studies with MNP (20 mM) and DBNBS (10 mM) of the MG–peroxynitrite or hydrogen peroxide system in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) after incubation for 4 min at room temperature. (A) Spectra of a MNP–acetyl radical adduct obtained from peroxynitrite (1.5 mM) without (a) and with 5.0 (b), 10 (c), and 20 mM MG (d). (B) Spectra of MG (10 mM) without (a) and with 0.5 (b), 1.5 (c), and 2.5 mM peroxynitrite (d). For the MNP–acetyl adduct, a_N (observed) = 0.83 mT (for lit. NIEHS, $a_N = 0.78$ –0.83). (C) Effect of carbonate on the amplitude of the EPR signal of the MNP–acetyl adduct obtained from MG (20 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) without (a) and with 2.5 (b), 5.0 (c), 7.5 (d), 10.0 (e), and 12.5 mM sodium bicarbonate (f). (D) Incubation of MG with hydrogen peroxide: (a) MNP signal control and (b) reaction mixture containing 20 mM MG and 20 mM hydrogen peroxide. The signal marked O ($a_N = 1.72$ mT) is assigned to the di-*tert*-butylnitroxide signal (MNP contaminant) (43, 44) and the signal marked X ($a_N = 0.83$ mT) to the MNP–acetyl radical adduct. Minor undetermined carbon-centered radical signals are also detected, as reported by Nakayama et al. (45) in EPR studies with DBNBS, MG, and H_2O_2 . (E) EPR spectra of a methyl radical adduct obtained with DBNBS after incubation of MG with peroxynitrite: (a) 20 mM MG (control), (b) 1.5 mM peroxynitrite (control), and (c) complete system. The signal marked X can be assigned to the oxidation product of DBNBS by peroxynitrite in the presence of sulfite that originated from DBNBS itself (48), whereas the other signal [$a_N = 1.42$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT] can be attributed to a methyl–DBNBS adduct (46, 47), which is expected to be the origin of three splittings from the three hydrogen atoms of the methyl group.

mT) (Figure 4A,B). The formyl radical adduct with MNP (for lit. NIEHS, $a_N = 0.7\text{--}0.77$ mT and $a_H = 0.14\text{--}0.25$ mT) was not detected in the EPR spectrum. The EPR signal was intensified with an increase in the concentrations of both MG (5–20 mM) and peroxynitrite (0.50–2.5 mM). That MG competes significantly with carbon dioxide for the peroxynitrite anion was indicated by the concentration-dependent quenching effect of added bicarbonate (2.5–12.5 mM) on the amplitude of the MNP triplet adduct signal obtained with 20 mM MG and 2.5 mM peroxynitrite (Figure 4C). The EPR signal was totally suppressed upon addition of bicarbonate at concentrations of >10 mM. Important to note is the fact that millimolar peroxynitrite can be replaced with H_2O_2 (20 mM) to generate the hypothetical MNP–acetyl radical adduct ($a_N = 0.83$ mT) (Figure 4D). Another signal could be assigned to di-*tert*-butylnitroxide ($a_N = 1.72$ mT), a contaminant frequently found in solutions of MNP (43, 44), and minor nonidentified signals appeared as well (Figure 4D). In this regard, it is important to note that Nakayama et al. (45) reported the occurrence of a DBNBS–methyl radical adduct, among minor nonidentified adducts, when treating MG with H_2O_2 .

In turn, using DBNBS in the reaction of MG with peroxynitrite, the characteristic EPR signal corresponding to its methyl radical adduct appears: $a_N = 1.41$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT (Figure 4E) (46, 47). Methyl radical is predicted to be formed from the decarbonylation of acetyl radical and, less probably, from the fragmentation of a peroxonitroso adduct generated by the attack of peroxynitrite on C(2) of MG. If this were so, the counterfragment of MG oxidation, glyoxalate, should have appeared as a peak in the electropherogram of the spent reaction mixture. The signal present in the control experiment without MG ($a_N = 1.25$ mT; $a_H = 0.06$ mT) can be attributed to a DBNBS– $\text{SO}_3^{\cdot-}$ adduct (48) (Figure 4E).

CE-MS/MS Analysis of Acetylated L-Lysine. Panels A and B of Figure 5 depict the electropherograms of the final reaction mixture of 5.0 mM L-lysine, 10 mM MG, and 2.5 mM peroxynitrite monitored by the MS peak at m/z 147 (L-lysine) and m/z 189 (acetyl-L-lysine), respectively. The insets show the MS spectra of the corresponding electrophoretic peaks. The MS/MS fragmentation pattern of the ion at m/z 189.04 is shown in Figure 5C. The assignment of the MS/MS spectrum to an α -N-acetyl-L-lysine adduct is supported by the following data. The $[\text{acetyllysine} + \text{H}]^+$ species (m/z 189.04) is expected to undergo dehydration to form the ion at m/z 171 and subsequent decarbonylation to the ion at m/z 143, yielding an immonium fragment whose deamination renders the ion at m/z 126. Deacetylation of the immonium ion ($-\text{CH}_2\text{CO}$) then produces the fragment at m/z 84. The high abundance of the immonium fragments at m/z 143 and 126, according to Trelle and Jensen (49), is evidence of L-lysine acetylation in the ϵ -amino group, which is mechanistically unfavorable in the case of the α -isomer. Accordingly, had an α -N-acetyl-L-lysine adduct been produced, its protonated form would have lost a H_2CO_2 group and subsequently a CH_2CO group to yield an m/z 101 fragment. This fragment is, in fact, reported by the Spectral Database for Organic Compounds (MS-NW-7638 SDBS no. 22048) for α -N-acetyl-L-lysine, but it was not found in our samples. In addition, unidentified fragments at m/z 157 and 129 are present in the spectrum of the final reaction mixture, but not in the standard spectrum of α -N-acetyl-L-lysine.

Discussion

Nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl in air-equilibrated phosphate has been shown to yield acetyl radical

(15, 16) and to acetylate L-histidine and dGuo added to the reaction mixture (15). This reaction raised the hypothesis that peroxynitrite and α -oxocarbonyls overproduced in metabolic situations such as inflammation in cellular sites might drive protein and DNA acetylation, thereby triggering adverse responses. We now studied MG, a metabolite putatively implicated in diabetes and other ketogenic disorders, as the electrophilic target for peroxynitrite, relying on the long-known higher reactivity of aldehydes compared to that of ketones. Nakayama et al. (45) recently reported that MG does, in fact, react with H_2O_2 , yielding $\text{HO}^\bullet$ and carbon-centered radicals, which was demonstrated by the use of EPR spin trapping with 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) and DBNBS. This reaction was shown to emit light in the presence of luminol, probably initiated by $\text{HO}^\bullet$ radical (indirect chemiluminescence); however, the mechanism underlying the MG– H_2O_2 reaction was not clearly determined. Here, we have extended our studies on the MG–peroxynitrite system to the MG– H_2O_2 system, because an MG– H_2O_2 adduct could also undergo homolysis to an oxyl radical, although at a slower rate, and ultimately yield acetyl radical, which was not detected by Nakayama et al. (45). By analogy, Augusto et al. (50) have demonstrated that pyruvate reacts with both peroxynitrite and H_2O_2 , yielding acetate and $\text{CO}_2^{\cdot-}$ radical.

The second-order rate constant for addition of peroxynitrite anion to MG is estimated here by stopped-flow kinetics to be approximately $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C (Figure 1). This value is higher than the values reported for diacetyl ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (15) and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ($k_2 = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), under similar experimental conditions (38, 39). The rate constants were calculated here from the experimental values, taking into consideration the actual concentrations of the free forms of MG in aqueous medium. Diacetyl and MG exist under dynamic equilibrium in aqueous medium with their mono- and dihydrate forms, where the dicarbonyl species are present at concentrations of only 23 and 1%, respectively (14, 16). The rate constant for phosphate-catalyzed dehydration of MG diol is several orders of magnitude lower than that of addition of peroxynitrite to MG (37). The hydration equilibrium constants are affected by the solvent's polarity, with the ratio of MG free to hydrate forms probably favoring the free, reacting species in hydrophobic, cell membrane environments.

Our experiments were performed at apparently nonphysiological concentrations. As the steady-state concentration of $\text{NO}^\bullet$ in physiological systems falls in the nanomolar range, that of peroxynitrite formed by the diffusion-controlled reaction of $\text{NO}^\bullet$ with superoxide anion radical is on the same order of magnitude. Indeed, estimates of the steady-state concentration of physiological CO_2 -limited peroxynitrite by Ferrer-Sueta and Radi (22) are in the range 2–3 nM and often 2 orders of magnitude lower. Therefore, the pseudo-first-order rate constant for the reaction of MG with peroxynitrite ($k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is expected to be in the range of $10^{-4}\text{--}10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Considering that the MG reaction with plasma proteins displays rate values of $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (2), reaction of MG with proteins may overwhelm that with peroxynitrite. In addition, although the k_2 value for the reaction of peroxynitrite with MG is 2–3 times higher than that with CO_2 , one cannot disregard the presence of CO_2 in the physiological medium (1.3 mM) at much higher concentrations than MG (21). Nevertheless, it is tempting to propose that radical acetylation of biomolecules may take place chronically in vivo in specific microenvironments of tissues under adverse oxidative, nitrosative, and carbonyl stress. The pH profile of the

Figure 5. CE-MS/MS product analysis of L-lysine treated with the MG-peroxynitrite system. The reaction mixture consisted of 5.0 mM L-lysine, 10 mM MG, and 2.5 mM peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2). (A) Electropherogram traced at MS m/z 147 and (B) electropherogram traced at MS m/z 189. Insets show the MS spectra of corresponding electrophoretic peaks. (C) MS/MS of molecular ion at m/z 189, which can be attributed to N -acetyl-L-lysine formed by addition of the reaction-generated acetyl radical to the amino acid. Acetylated lysine was not detected in control experiments that included L-lysine alone, L-lysine with peroxynitrite, or L-lysine with MG.

MG-peroxynitrite reaction displays an ascending curve from lower pH toward neutrality, and then a long inflection resembling a plateau at pH ~ 7.2 , which is followed by a sharp increase at alkaline pH values (Figure 1C). The ascendant portion of the curve may be attributed to increasing concentrations of the attacking peroxynitrite anion ($pK_a = 6.8$, tending to slightly higher values with increasing ionic strengths) (20) and to general acid catalysis of the nucleophilic addition to MG by the $H_2PO_4^-$ anion ($pK_a = 7.2$), but not by the conjugated

base HPO_4^{2-} . In agreement with a catalytic effect of phosphate anion on the MG-peroxynitrite reaction, the observed rate constants increase with an increase in buffer concentration (Figure 1D).

The MG reaction with peroxynitrite is accompanied by concentration-dependent oxygen uptake (Figure 2), ultimately forming acetate and formate ions (Figure 3 and Table 1), derived from oxidative fragmentation of the MG C(1)–C(2) bond. Pyruvate and glyoxalate ions were not detected in the electro-

Scheme 2. Mechanism of Acetylation of L-Lysine by the MG–Peroxynitrite System in Aqueous Medium

pherograms obtained from the spent reaction mixtures, thereby ruling out reactions involving direct oxidation of MG to pyruvate or attack of peroxynitrite on C(2) of MG leading to glyoxalate and formate ions. On the basis of previously reported works about the mechanism of addition of peroxynitrite to carbonyls such as ethanal and propanal (17), pyruvate and acetaldehyde (50, 18), and diacetyl-derived compounds (16) (diacetyl) (15, 16), we envisage the reaction as proceeding through the steps depicted by Scheme 1, probably route 1 as follows.

Following attack of the phosphate-catalyzed peroxynitrite anion on C(1) of MG, the nascent hypothetical nitrosoperoxy adduct undergoes O–O bond cleavage to form NO_2 and a MG-derived oxyl radical, whose β -scission yields acetyl radical and formate ion. Subsequent acetyl radical oxidation by molecular oxygen yields in acetate ion (Scheme 1). From classical photochemistry of carbonyl compounds, it is known that decarbonylation of acetyl radical to methyl radical (Norrish type 1 photoreactions) is expected to occur. On the other hand, had the addition of peroxynitrite to MG unexpectedly occurred at the less reactive C(2) atom (route 2b of Scheme 1), glyoxalate anion should have been detected as one of the main products, which was not the case. Moreover, all attempts to detect formyl radical by spin trapping with MNP have failed. The fact that acetyl and methyl radicals can indeed be generated by the MG–peroxynitrite reaction is strongly suggested by EPR spin trapping experiments with MNP and DBNBS, respectively (Figure 4). Therein, EPR signals that can be attributed to the MNP–acetyl radical adduct ($a_N = 0.83$ mT) and to the DBNBS–methyl radical adduct [$a_N = 1.41$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT] were obtained. Methyl radical could also yield formate anion by dioxygen insertion followed by a Russell reaction (51). Significant competition between MG and CO_2 in the peroxynitrite reaction is indicated by quenching of the MNP–acetyl adduct signal upon addition of carbonate at relatively high concentrations (Figure 4C). This finding strengthens the hypothesis of the biological relevance of this reaction. Moreover, although much less reactive, H_2O_2 can replace peroxynitrite in the acetyl radical-generating reaction of MG (Figure 4D). Noteworthy in this respect is the fact that Nakayama et al. (45) previously reported that the MG– H_2O_2 system yields methyl radical and an unidentified carbon-centered radical that supposedly spark the chemiluminescence observed by the authors upon addition of luminol to the reaction mixture. Furthermore, our work may explain the mechanism underlying the formation of acetaldehyde and formate from D-lactate, an end product of the MG bypass, hyperproduced in rats fed dimethylaminoazobenzene-rich diets (52).

Altogether, the data reported here support a mechanism of MG oxidation by peroxynitrite and molecular oxygen to acetate and formate via an acetyl radical intermediate, which is initiated by nucleophilic addition of peroxynitrite to C(1) of MG (Scheme 1). Also, the acetylation activity of the MG–peroxynitrite system, previously reported using diacetyl/peroxynitrite and

L-histidine and dGuo as targets (15), was tested here on L-lysine (Scheme 2). The assignment of the MNP spin adduct to acetyl radical (Figures 4AB) was confirmed by the isolation and identification of N -acetyl-L-lysine in the final reaction mixture by CE-MS. The hypothesis of post-translational acetylation of proteins by a radical mechanism, during normal or pathological events that lead to the accumulation of both MG and peroxynitrite, might be evoked as an additional pathway to acetyltransferase-catalyzed reactions. Further experiments are warranted to demonstrate this hypothesis. Epigenetic protein acetylations, especially in lysine residues of histones, have important consequences in cell signaling and regulation of the cell cycle (31).

Acknowledgment. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Redoxoma. We thank Luiz H. Catalani and Wilhelm Baader (University of São Paulo, São Paulo, Brazil) and Brian Bandy (University of Saskatchewan, Saskatoon, SK) for a critical reading of the manuscript.

References

- (1) Kalapos, M. P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110, 145–175.
- (2) Thornalley, P. J. (2005) Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 111–117.
- (3) Kalapos, M. P. (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem.-Biol. Interact.* 171, 251–271.
- (4) Thornalley, P. J. (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems: Role in ageing and disease. *Drug Metab. Drug Interact.* 25, 125–150.
- (5) Royer, L. O., Knudsen, F. S., de Oliveira, M. A., Tavares, M. F. M., and Bechara, E. J. H. (2004) Succinylacetone oxidation by oxygen/peroxynitrite: A possible source of reactive intermediates in hereditary tyrosinemia type I. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 598–604.
- (6) Dutra, F., Ciriolo, M. R., Calabrese, L., and Bechara, E. J. H. (2005) Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 755–760.
- (7) Deng, Y., Boomsma, F., and Yum, P. H. (1998) Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 63, 2049–2058.
- (8) House, J. D., Hall, B. N., and Brosnan, J. T. (2001) Threonine metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 281, 1300–1307.
- (9) Thornalley, P. J. (1988) Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose *in vitro*. *Biochem. J.* 254, 751–755.
- (10) Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., and Turk, Z. (2006) Methylglyoxal in food and organisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1105–1117.
- (11) Dhar, A., Desai, K., Liu, J., and Wu, L. (2009) Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 1093–1100.
- (12) Beisswenger, P. J., Howel, S. K., Touchette, A. D., Lal, S., and Szewgold, B. S. (1999) Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 198–202.
- (13) Nemet, I., Vijić-Topić, D., and Varga-Defterdarović, L. (2004) Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. *Bioorg. Chem.* 32, 560–570.

- (14) Thornalley, P., Yurek-George, A., and Argirov, O. K. (2000) Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 60, 55–65.
- (15) Massari, J., Fujii, D. E., Dutra, F., Vaz, S. M., Costa, A. C. O., Micke, G. A., Tavares, M. F. M., Tokikawa, R., Assunção, N. A., and Bechara, E. J. H. (2008) Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 879–887.
- (16) Yang, D., Tang, T., Chen, J., Wang, X., Bartberger, M. D., Houk, K. N., and Olson, L. (1999) Ketone-catalyzed decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 11976–11983.
- (17) Uppu, R. M., Winston, G. W., and Pryor, W. A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1331–1337.
- (18) Nakao, L. S., Ouchi, D., and Augusto, O. (1999) Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite hydrogen peroxide-iron(II). Production of acetate and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1010–1018.
- (19) Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* 32, 841–859.
- (20) Lobachev, V. L., and Rudakov, E. S. (2006) The chemistry of peroxynitrite: Reaction mechanisms and kinetics. *Russ. Chem. Rev.* 75, 375–396.
- (21) Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life* 59, 255–262.
- (22) Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 4, 161–177.
- (23) Pachter, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- (24) Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007) Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* 6, 662–680.
- (25) Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4003–4008.
- (26) Ferrer-Sueta, G., Vitturi, D., Batinić-Haberle, I., Fridovich, I., Goldstein, S., Czapski, G., and Radi, R. (2003) Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.* 278, 27432–27438.
- (27) Goldstein, S., and Merényi, G. (2008) The chemistry of peroxynitrite: Implications for biological activity. *Methods Enzymol.* 436, 49–61.
- (28) Rebrin, I., Bregere, C., Gallaher, T. K., and Sohal, R. S. (2008) Detection and characterization of peroxynitrite-induced modifications of tyrosine, tryptophan, and methionine residues by tandem mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 441, 283–294.
- (29) Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S. K., Beisswenger, P. J., and Thornalley, P. J. (2005) Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* 48, 1590–1603.
- (30) Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M., and Thornalley, P. J. (2005) Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 5724–5732.
- (31) Kouzarides, T. (2000) Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176–1179.
- (32) Kaur, H., Leung, K. H. W., and Perkins, M. J. (1981) A water-soluble, nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 3, 142–143.
- (33) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624.
- (34) Beers, R. F., and Sizer, W. I. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140.
- (35) Hughes, M. N., and Nicklin, H. G. (1968) Chemistry of pernitrites. I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc. A*, 450–452.
- (36) Gilbert, R. P., and Brandt, R. B. (1975) Spectrophotometric determination of methyl glyoxal with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Anal. Chem.* 47, 2418–2422.
- (37) Betterton, E. A., and Hoffman, M. R. (1987) Kinetics, mechanism, and thermodynamics of the reversible-reaction of methylglyoxal (CH₃COCHO) with S(IV). *J. Phys. Chem.* 91, 3011–3020.
- (38) Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8867–8868.
- (39) Uppu, R. M., Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 335–343.
- (40) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49–58.
- (41) Gupta, D., Harish, B., Kissner, R., and Koppenol, W. H. (2009) Peroxynitrate is formed rapidly during decomposition of peroxynitrite at neutral pH. *Dalton Trans.*, 5730–5736.
- (42) Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Corrêa, T. C., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2009) Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite. *Dalton Trans.*, 5720–5729.
- (43) Gunther, M. R., Peters, J. A., and Sivaneri, M. K. (2002) Histidinyl radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 277, 9160–9166.
- (44) Makino, K., Suzuki, N., Moriya, F., Rokushika, S., and Hatano, H. (1981) A fundamental study on aqueous-solutions of 2-methyl-2-nitrosopropane as a spin trap. *Radiat. Res.* 86, 294–310.
- (45) Nakayama, M., Saito, K., Sato, E., Nakayama, K., Terawaki, H., Ito, S., and Kohno, M. (2007) Radical generation by the non-enzymatic reaction of methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 12, 125–133.
- (46) Gatti, R. M., Alvarez, B., Vasquez-Vivar, J., Radi, R., and Augusto, O. (1998) Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 36–46.
- (47) Royer, L. O., Knudsen, F. S., de Oliveira, M. A., Tavares, M. F. M., and Bechara, E. J. H. (2004) Peroxynitrite-initiated oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate esters by oxygen: Potential sources of reactive intermediates in keto acidoses. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1725–1732.
- (48) Guo, R., Davies, C. A., Nielsen, B. R., Hamilton, L., Symons, M. C. R., and Winyard, P. G. (2002) Reaction of the spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate with human biofluids. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 133–142.
- (49) Trelle, M. B., and Jensen, O. N. (2008) Utility of immonium ions for assignment of ϵ -N-acetyllysine-containing peptides by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 3422–3430.
- (50) Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., and Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 786–794.
- (51) Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Uemi, M., Corrêa, T. C., Toma, I. N., Bertolucci, A., Oliveira, M. C., Motta, F. D., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2007) Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* 59, 322–331.
- (52) Kitamura, Y., Kawase, M., and Ohmori, S. (2008) Formate excretion in urine of rats fed dimethylaminoazobenzene-rich diets: The possibility of formate formation from D-lactate. *Acta Med. Okayama* 62, 193–203.

TX1002244

ANEXO C. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal-Peroxynitrite System

Article

pubs.acs.org/JACS

Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal–Peroxynitrite System^{||}

Júlio Massari,[†] Rita Tokikawa,[‡] Danilo B. Medinas,[‡] José P. F. Angeli,[‡] Paolo Di Mascio,[‡]
Nilson A. Assunção,[§] and Etelvino J. H. Bechara^{*,‡,§}

[†]Departamento de Química Fundamental and [‡]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[§]Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal–Peroxynitrite System^{||}Júlio Massari,[†] Rita Tokikawa,[‡] Danilo B. Medinas,[‡] José P. F. Angeli,[‡] Paolo Di Mascio,[‡] Nilson A. Assunção,[§] and Etelvino J. H. Bechara^{*,‡,§}[†]Departamento de Química Fundamental and [‡]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil[§]Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

ABSTRACT: Diacetyl, methylglyoxal, and glyoxal are α -dicarbonyl catabolites prone to nucleophilic additions of amino groups of proteins and nucleobases, thereby triggering adverse biological responses. Because of their electrophilicity, in aqueous medium, they exist in a phosphate-catalyzed dynamic equilibrium with their hydrate forms. Diacetyl and methylglyoxal can be attacked by peroxynitrite ($k_2 \approx 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively), a potent biological nucleophile and oxidant, yielding the acetyl radical from the homolysis of peroxynitrosocarbonyl adducts, and acetate or formate ions, respectively. We report here that glyoxal also reacts with peroxynitrite, yielding formate ion at rates at least 1 order of magnitude greater than does methylglyoxal. A triplet EPR signal (1:2:1; $a_{\text{H}} = 0.78 \text{ mT}$) attributable to hydrated formyl radical was detected by direct flow experiments. In the presence of the spin trap 2-methyl-2-nitrosopropane, the EPR spectrum displays the di-*tert*-butyl nitroxide signal, another signal assignable to the spin trapping adduct with hydrogen radical ($a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 1.44 \text{ mT}$), probably formed from formyl radical decarbonylation, and a third EPR signal assignable to the formyl radical adduct of the spin trap ($a_{\text{N}} = 0.71 \text{ mT}$ and $a_{\text{H}} = 0.14 \text{ mT}$). The novelty here is the detection of singlet oxygen ($^1\Delta_{\text{g}}$) monomol light emission at 1270 nm during the reaction, probably formed by subsequent dioxygen addition to formyl radical and a Russell reaction of nascent formylperoxyl radicals. Accordingly, the near-infrared emission increases upon raising the peroxynitrite concentration in D_2O buffer and is suppressed upon addition of O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$) quenchers (NaN_3 , L-His, H_2O). Unequivocal evidence of O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$) generation was also obtained by chemical trapping of $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_{\text{g}}$) with anthracene-9,10-divinylsulfonate, using HPLC/MS/MS for detection of the corresponding 9,10-endoperoxide derivative. Our studies add insights into the molecular events underlying nitrosative, oxidative, and carbonyl stress in inflammatory processes and aging-associated maladies.

■ INTRODUCTION

Ethanedial (glyoxal) is a highly reactive dialdehyde present in food,^{1,2} beverages,^{3–5} cigarette smoke,⁶ and urban air.^{7–9} In biological samples, glyoxal has been found as an end product of the aerobic oxidation of carbohydrates, proteins, polyunsaturated fatty acids, and nucleic acids.^{10–13} Like other α -dicarbonyl metabolites (e.g., methylglyoxal, 2,3-butanedione, 4,5-dioxopentanoic acid, and deoxyglucosones), glyoxal is reportedly implicated in Maillard reactions which may lead to a metabolic condition usually named “carbonyl stress”.¹³

Methylglyoxal¹⁴ and butanedione (diacetyl)¹⁵ were recently shown to undergo nucleophilic attack by peroxynitrite at much faster rates ($k_2 \approx 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_2 \approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, at pH 7.2, 25 °C)^{14–16} than do monocarbonyls ($<10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{17,18} ultimately yielding formate and acetate, or acetate ions, respectively. Importantly, the rate constant of the reaction of peroxynitrite with methylglyoxal is roughly 3-fold greater than with $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$,¹⁹ which is noted as the main intracellular target of peroxynitrite in cells. In addition to acting as a powerful nucleophile, peroxynitrite is able to directly and indirectly promote one- and two-electron oxidations, nitrosation, and nitration of biomolecules. A broad set of

peroxynitrite final products has been identified and adopted as biomarkers in human disorders such as Alzheimer’s disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, lung injury, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, cancer, and drug-dependent toxicity.^{19–27}

Here, we report that nucleophilic addition of peroxynitrite to glyoxal in normally aerated phosphate buffer produces molecular oxygen in the singlet excited state ($^1\Delta_{\text{g}}$). Generation of singlet oxygen, O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$), was assessed through the direct spectroscopic detection of its monomol light emission at 1270 nm, as well as by the observation of D_2O enhancement of O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$) production and the quenching effect of sodium azide. In addition, the reaction mechanism was investigated by chemically trapping the O_2 ($^1\Delta_{\text{g}}$) produced in the reaction using the anthracene-9,10-divinylsulfonate anion (AVS). The chemical trapping method was coupled to the detection of the corresponding endoperoxide AVSO_2 by HPLC coupled to UV and mass spectrometry in tandem. In light of previous work by Uppu et al.¹⁷ and Nakao et al.¹⁸ on the reaction of

Received: June 3, 2011

Published: November 18, 2011

peroxynitrite with carbonyls, the glyoxal reaction is envisaged as initial peroxynitrite addition to yield a hypothetical nitro-soperoxy adduct, whose homolysis yields $\cdot\text{NO}_2$ and a glyoxal-derived oxyl radical.

Subsequently, β -cleavage of the oxyl radical would generate formyl radical and formate ion, followed by reaction of formyl radical with molecular oxygen to yield a formylperoxyl radical.

Annihilation of alkylperoxyl radicals by the Russell reaction is long known to generate 3–14% O_2 ($^1\Delta_g$) and, at 3–4 orders of magnitude lower yield, triplet carbonyls.²⁸ Bearing a geminal hydrogen atom, the formylperoxyl radical is endowed with the potential of producing O_2 ($^1\Delta_g$) by the Russell reaction.^{29–33}

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. All reagents were purchased, with a high grade of purity, from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Merck (Darmstadt, Germany), and Fluka (Buchs, Switzerland). The $^{18}\text{O}_2$ gas cylinder (99% ^{18}O) was from Isotec-Sigma (St. Louis, MO). Peroxynitrite was synthesized from NaNO_2 (0.60 M) and H_2O_2 (0.70 M) in HCl (0.60 M) and NaOH (1.50 M) in a quench-flow reactor as described previously.^{14,34} Excess H_2O_2 in the alkali peroxynitrite solution was eliminated with MnO_2 ; however, nitrite and nitrate ions derived from peroxynitrite decomposition usually remain as contaminant ions. Concentrations of H_2O_2 and peroxynitrite were determined spectrophotometrically at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)³⁵ and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^{34,36} respectively. The peroxynitrite concentrations obtained by this method ranged from 300 to 450 mM. Stock solutions of peroxynitrite were kept on ice in the dark. Sodium anthracene-9,10-divinylsulfonate, a O_2 ($^1\Delta_g$) chemical trap, was prepared and purified according to procedures described elsewhere.^{37,38} All the solutions were prepared in Millipore Milli-Q purified water, and the buffers were pretreated with Chelex-100 to remove metal contaminants.

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decay was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics model SX-18V) at 302 nm. The temperature was kept constant at 25.0 ± 0.2 °C, and the pH values of the reaction mixtures were determined by an experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The initial concentration of peroxynitrite was at 200 μM . Pseudo-first-order rates, k_{obs} (s^{-1}), were determined by linear fit from $\ln A$ vs time (0–30 ms), and the first linear fit observed was assumed as the k_{obs} (s^{-1}). The results of 9–12 measurements were averaged to obtain each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was calculated from slopes of the plots of k_{obs} vs the glyoxal concentration. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before plotting data against pH or phosphate buffer concentration. All the data were fitted using Origin 7 (Microcal Software, Inc.).

Continuous-Flow EPR Studies. The experiments were conducted at room temperature (25 ± 2 °C) in a Bruker EMX spectrometer equipped with a Bruker ER 4117 D-MTV dielectric mixing resonator with 9 mm of distance between the mixing cell and the resonator center. Briefly, the reactants were loaded in 20 mL

plastic syringes mounted on a pump (Harvard Apparatus pump 22) and driven into the resonator at constant flow. Experimental conditions and equipment settings are described in the captions to the figures. The magnetic field was calibrated with the nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPOL), whose *g* value is 2.0056. Computer simulations of spectra were performed by using the program WINSIM written by Duling.³⁹

Singlet Oxygen Detection. Monomolecular photoemission of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ at 1270 nm was monitored by a photocounting equipment as described previously.^{40,41} For this purpose, reaction mixtures of glyoxal (0–10 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) were analyzed in the photon counter. The reaction was carried out in D_3PO_4 solution in D_2O , resulting in a pD between 7.1 and 7.5 by the addition of the alkali solution of peroxynitrite at 25 °C in the dark. All reactions were conducted in a quartz cuvette under continuous stirring at room temperature. The apparatus consists of a photomultiplier tube cooled to -80 °C with liquid nitrogen to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage DC power supply, and the applied potential was set to -1.5 kV. The light emitted from the sample was processed with a diffraction grate capable of selecting wavelengths in the infrared region. The phototube output was connected to the computer and the signal acquired digitally.

Chemical Trapping of Singlet Oxygen. The generation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ during the reaction of glyoxal and peroxynitrite was monitored by chemical trapping with AVS. For this purpose, glyoxal (0–10 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) in the presence of 2.5 mM AVS were analyzed by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a UV detector ($\lambda = 215$ nm). An amount of 25 μL of the spent reaction of 5.0 mM glyoxal with 2.5 mM peroxynitrite in the presence of 2.5 mM AVS was injected into the HPLC equipment supplied with a Phenomenex Gemini C-18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μm). A gradient of methanol/acetonitrile (7:3, v:v) (solvent B) and 25 mM ammonium formate (solvent A) was used at a flow rate of 0.80 mL/min. The compounds were eluted by maintaining solvent B at 18% for 30 min and increasing solvent B from 18% to 65% over 5 min.

Identification of the AVS 9,10-endoperoxide generated by glyoxal/peroxynitrite was carried out in an HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Altricham, U.K.). An amount of 20 μL of the spent reaction of 5.0 mM glyoxal with 2.5 mM peroxynitrite in the presence of 8.0 mM AVS was injected into the HPLC equipment supplied with a Phenomenex Luna C-18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μm). A gradient of methanol/acetonitrile (7:3, v:v) (solvent B) and 25 mM ammonium formate (solvent A) was used at a flow rate of 0.80 mL/min. The compounds were eluted by maintaining solvent B at 18% for 30 min, increasing solvent B from 18 to 80% over 10 min, and keeping solvent B at 80% for a further 5 min. Subsequently, solvent B was returned to the initial condition of 18% over 2 min and was kept at this concentration for 10 min. The negative multiple reactions monitoring (MRM) mode was used to monitor the specific mass transition of AVS $^{16}\text{O}_2$ (m/z 210–194) and AVS $^{18}\text{O}_2$ (m/z 212–194). The capillary voltage was set at 3.5 kV, collision energy at 10 eV, and the sample cone voltage and extractor cone voltage were at 10 and 4 V, respectively. The source and desolvation temperatures were maintained at 100 and 200 °C, respectively. The HPLC separation column and experimental conditions were the same as described above. The flow directed to the mass spectrometer was set at 0.20 mL/min.

Dioxygen labeling of AVS by $^{18}\text{O}_2$ was carried out by removing dissolved $^{16}\text{O}_2$ by successively freezing and thawing a solution of 8.0 mM AVS and 10.0 mM glyoxal in 1.0 mM $\text{D}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$ under vacuum. This procedure was repeated at least three times to ensure complete removal of $^{16}\text{O}_2$. Thereafter, the whole system was connected to an $^{18}\text{O}_2$ gas cylinder at 0.5 atm and stirred for 5 min, followed by injection through a rubber seal of 100 μL of ice cold 45 mM peroxynitrite in D_2O prepared from the stock solution of peroxynitrite. Negative controls were run by replacing $^{18}\text{O}_2$ with pure $^{16}\text{O}_2$ or N_2 .

Product Analysis by CE/UV. Analyses of formate were conducted in a Beckman P/551 capillary electrophoresis apparatus

equipped with a filter-carousel UV detector set at 254 nm for indirect detection. The background electrolyte was 10 mM 3,5-dinitrobenzoic acid, with 0.10 mM cetyltrimethylammonium bromide and final pH equal to 3.2. Fused-silica capillaries with dimensions of 50 cm total length (40 cm effective) and 75 μm i.d. $\times$ 375 μm o.d. were used. Separation was performed at a constant voltage (-20 kV). Reaction mixture samples obtained from 1.0 to 10 mM glyoxal treated with 1.0–5.0 mM peroxynitrite were injected hydrodynamically at 1 psi for 3 s.

RESULTS AND DISCUSSION

Peroxynitrite Decay. Figure 1A shows time courses of peroxynitrite (200 μM) consumption by glyoxal (0–30 mM) monitored at 302 nm. The pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) were found to increase linearly with the initial concentration of glyoxal, revealing an apparent second order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) equal to $3.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 1B). Because glyoxal dehydration in aqueous solution (pH 4–7) is a much slower process (about $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁴² than the peroxynitrite carbonyl reaction and assuming that the glyoxal reactive carbonyl form is 0.005% of the nominal glyoxal concentration,⁴³ the k_2 value for the reaction can be estimated as $7.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value is 3 orders of magnitude higher than that observed for the reaction with monocarbonyls, 2 orders of magnitude higher than that with diacetyl, and 1 order of magnitude higher than those reported with methylglyoxal and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ at pH 7.2–7.4 and 25–37 $^\circ\text{C}$ ($(3\text{--}6) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{19,44,45} The glyoxal/peroxynitrite reaction is catalyzed by phosphate (Figure 1C), and the pH profile (Figure 1D) exhibits an ascendant curve from 6.2 to 7.2 with a trend for saturation above 7.2. This shape may reflect contributing effects of the pK_a values near 7.2 of both H_2PO_4^- and peroxynitrous acid²¹ at the phosphate ionic strength. Above 7.2, increasing concentration of peroxynitrite favors the reaction, while concomitant decrease of H_2PO_4^- addition catalyst is counterbalanced by increased amounts of HPO_4^{2-} , which is expected to catalyze dehydration of glyoxal·H₂O to the carbonyl reactive form as reported by Thornalley et al.⁴³ for methylglyoxal.

Directed Flow EPR Studies. Classical spin-trapping studies with 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP) aiming to intercept the MNP-formyl radical adduct failed, either because of a high instability of the radical itself or because of the radical adduct. Using continuous-flow EPR with direct detection, the peroxynitrite/glyoxal reaction was found to produce a triplet signal (1:2:1; $a_{\text{H}} = 0.78 \text{ mT}$) in a glyoxal and peroxynitrite concentration-dependent fashion (parts A and B of Figure 2). The simulated spectrum is shown in Figure 2C. On replacement of glyoxal with formaldehyde, methanol, or ethanol under the same experimental conditions and equipment parameters, no signal was observed. This excludes possible interference of a carbon-centered radical bearing a hydrogen atom eventually formed from glyoxal products or contaminants. It is tempting to assign the 0.78 mT signal to the hydrated formyl radical, $\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ (half-life in aqueous medium of $\sim 20 \mu\text{s}$ (reference), formed from β -cleavage of the oxyl radical, $\text{CH}(\text{OH})_2\text{--CH}(\text{OH})\text{--O}\cdot$, which results from homolysis of the hypothetical peroxynitroso adduct of glyoxal, $\text{CH}(\text{OH})_2\text{--CH}(\text{OH})\text{--OONO}$. Because the putative $\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ radical is probably a poorer electrophile than the formyl radical toward MNP, accumulation of the $\text{MNP}\text{--}\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ adduct in the reaction mixture did not suffice to allow its EPR detection.

Interestingly, continuous-flow EPR experiments performed with peroxynitrite (200 μM)/glyoxal (30 mM) in the presence

Figure 1. Stopped-flow kinetics of peroxynitrite decay in the presence of glyoxal. (A) Kinetic traces of peroxynitrite (200 μM) decay at different glyoxal concentrations (2.0–30 mM) in air equilibrated 250 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 $^\circ\text{C}$. (B) Pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) for the decay of peroxynitrite in the presence of glyoxal under the same experimental conditions. Each k_{obs} value represents the mean of at least nine experiments. (C) Catalytic effect of phosphate anion on the observed rate of peroxynitrite (200 μM) treated with glyoxal (15 mM) at pH 7.2 and 25 $^\circ\text{C}$. The ionic strength of the phosphate buffer was kept constant via the addition of NaCl. (D) pH profile of the reaction of glyoxal (15 mM) with peroxynitrite (200 μM) in air-equilibrated 350 mM phosphate buffer at 25 $^\circ\text{C}$. The data represent the mean values of at least nine independent measurements.

of MNP (20 mM) display a 1:2:2:1 quartet signal with $a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 1.44 \text{ mT}$, attributable to the $\text{MNP}\text{--}\text{H}\cdot$ adduct^{46–48} (Figure 3A). The triplet signal with $a_{\text{N}} = 1.72 \text{ mT}$, also observed in the

Figure 2. Direct EPR detection studies of the glyoxal/peroxynitrite system in 400 mM phosphate buffer, pH 7.2, at room temperature and a constant flow of 20 mL/min. (A) Spectra obtained from peroxynitrite (20 mM) without (a) and with (b) 220 mM, (c) 400 mM, (d) 500 mM, (e) 1.00 M glyoxal. (B) Spectra of glyoxal (1.0 M) without (a) and with (b) 5.0 mM, (c) 10 mM, (d) 20 mM, (e) 45 mM peroxynitrite. (C) Simulated spectrum obtained with a triplet signal 1:2:1 $a_{(0.5)} = 0.78$ mT. Experimental conditions were as follows: observation time, 3.5 ms; microwave power, 10.13 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.84 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 1×10^6 ; two spectra accumulation.

control runs (200 μ M peroxynitrite or 30 mM glyoxal in the spin trapping medium buffer), is due to the di-*tert*-butyl nitroxide signal (MNP contaminant)^{49,50} (Figure 3A). Decarbonylation of the unstable formyl radical⁵¹ is indeed expected to release a hydrogen atom that can reduce MNP. Accordingly, photolysis and one-electron oxidation of formaldehyde by oxidants in the gas phase, including HO $\cdot$ radical, are long known to form CO and H $_2$ probably via a formyl radical intermediate.⁵² In aerated aqueous solutions, oxidation of formaldehyde by H $_2$ O $_2$ -generated HO $\cdot$ radical during laser photolysis experiments was found to yield formic acid and CO, which also implies the intermediacy of $\cdot$ CH(OH) $_2$ radical.⁵³ Furthermore, glyoxal photoexcited at 395–414 nm in the gas phase has recently been reported as a chemical source of formyl radical, which decomposes to CO and H $_2$.⁵⁴ In the current experiments, replacement of glyoxal with formaldehyde (30 mM) produced the same MNP spin adduct that was formed with glyoxal (quartet, $a_N = a_H = 1.44$ mT) (Figure 3A), supporting the hypothesis of MNP reduction by hydrogen atom.

The bottom spectrum in Figure 3A is the simulation of the mixture of radicals from glyoxal/peroxynitrite reaction and MNP contaminants. However, a reaction mixture containing 750 μ M peroxynitrite and 30 mM glyoxal in the presence of 20

Figure 3. EPR continuous flow studies of the glyoxal/peroxynitrite system in the presence of MNP. An amount of 20 mM MNP was mixed with the glyoxal–peroxynitrite system in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at room temperature and a constant flow of 1.4 mL/min. (A) Spectra obtained from (a) peroxynitrite (200 μ M) plus glyoxal (30 mM), (b) peroxynitrite alone (200 μ M), (c) glyoxal alone (30 mM), (d) peroxynitrite (200 μ M) plus formaldehyde (30 mM), and (e) simulation composed from the signals $a_N = 1.72$ mT and $a_H = 1.44$ mT. (B) (a) EPR spectrum obtained from 750 μ M peroxynitrite and 30 mM glyoxal, (b) simulated spectrum for the signals $a_N = 1.72$ mT, $a_H = 1.44$ mT and $a_N = 0.71$ mT and $a_H = 0.14$ mT. Experimental conditions for part A, traces a–d: observation time, 500 ms; microwave power, 10.11 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.84 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 1×10^6 ; accumulations, 8. Experimental conditions for part B, trace a: observation time, 500 ms; microwave power, 20.21 mW; modulation amplitude, 0.05 mT; time constant, 81.92 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 2×10^6 ; accumulations, 4.

mM MNP (Figure 3B, trace a) exhibits an additional signal, which is attributable to the MNP–formyl radical adduct ($a_N = 0.71$ mT; $a_H = 0.14$ mT; lit. data $a_N = 0.69$ – 0.77 mT and $a_H = 0.14$ – 0.25 mT).^{46,55,56} The bottom trace in Figure 3B depicts the simulated spectrum obtained from the signals attributable to MNP contaminant ($a_N = 1.72$ mT), the MNP–H $\cdot$ radical adduct ($a_N = a_H = 1.44$ mT), and the MNP–formyl radical adduct ($a_N = 0.69$ – 0.77 mT; $a_H = 0.14$ – 0.25 mT).

Monomolecular Photoemission of Singlet Oxygen at 1270 nm. The well-known monomol emission of O $_2$ ($^1\Delta_g$) at 1270 nm⁵⁷ was observed from the peroxynitrite/glyoxal reaction conducted in normally aerated phosphate buffer in D $_2$ O. The chemiluminescence intensity increases upon raising the concentration of peroxynitrite (Figure 4A) and of glyoxal to 25 mM (Figure 4B). Upon addition of singlet oxygen quenchers such as L-histidine and NaN $_3$ or by replacement of D $_2$ O with H $_2$ O-buffered solution,^{58,59} the red emission intensity was not observed (Figure 4C). That a putative formylperoxyl radical intermediate is the source of O $_2$ ($^1\Delta_g$) is endorsed by the lack of enhanced infrared emission when

Figure 4. Monomol emission of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen observed from the glyoxal–peroxynitrite system. Normally aerated 250 mM phosphate buffer prepared in D_2O , pD 7.2, contained (A) 1.0 mM peroxynitrite without (a) and with 5.0 mM glyoxal (b), 2.5 mM peroxynitrite without (c) and with 5.0 mM glyoxal (d), 5.0 mM peroxynitrite without (e) and with 5.0 mM glyoxal (f). (B) Peroxynitrite without (a) and with 5.0 mM (b) or 25 mM (c) glyoxal. (C) 2.5 mM peroxynitrite and 5.0 mM glyoxal without (a) and in the presence of H_2O , pH 7.2 (b), 2.5 mM *L*-histidine (c), and 2.5 mM NaN_3 (d).

glyoxal is replaced by diacetyl or methylglyoxal under identical experimental conditions (not shown). Upon reaction with peroxynitrite these reagents yield acetyl radicals that do not display a geminal hydrogen necessary to ultimately undergo the Russell reaction.

Chemical Trapping of Singlet Oxygen and HPLC/UV and HPLC/MS Analysis. Another specific and sensitive approach commonly used to detect $O_2 (^1\Delta_g)$ is chemical trapping coupled to HPLC/MS/MS. In this experiment, we used AVS, a chemical trap that is known to react with $O_2 (^1\Delta_g)$, yielding the corresponding 9,10-endoperoxide (AVSO₂). The yield of AVSO₂, determined by HPLC/UV at 215 nm, was found to be dependent on glyoxal concentration (1.0–10 mM) (Figure 5A). Formation of $O_2 (^1\Delta_g)$ in the reaction was also

Figure 5. Chemical trapping studies of singlet ($^1\Delta_g$) $^{16}O_2$ and $^{18}O_2$ with AVS. (A) HPLC/UV traces for chemical-trapping of $O_2 (^1\Delta_g)$. Reaction mixture was 5.0 mM glyoxal, 2.5 mM peroxynitrite, and 2.5 mM AVS in normally aerated 500 mM D_2O buffer, pD 7.2. Inset: Concentration effect of glyoxal (1.0–10 mM) on the peak area attributed to the AVS reaction product with $O_2 (^1\Delta_g)$. (B) HPLC/MS/MS evidence for the specific transition of AVS $^{16}O_2$ to AVS (m/z 210–194) in the MRM mode. Complete reaction mixture was 10.0 mM glyoxal, 2.0 mM peroxynitrite, and 8.0 mM AVS in 1.0 mM D_3PO_4/D_2O , final pD in the range 6.8–7.4. (a) glyoxal + AVS under $^{16}O_2$; (b) peroxynitrite + AVS under $^{16}O_2$; (c) peroxynitrite + glyoxal + AVS under $^{16}O_2$; (d) peroxynitrite + glyoxal + AVS under $^{18}O_2$; (e) peroxynitrite + glyoxal + AVS under N_2 . (C) Same as (B) by monitoring the specific transition of AVS $^{18}O_2$ to AVS (m/z 212–194) in the MRM mode.

evaluated by HPLC/MS/MS in the MRM mode, monitoring the specific conversion of AVSO₂ to AVS (m/z 210–194) (Figure 5B, trace c). The intense peak at 18 min was identified in the MRM chromatogram as AVSO₂, since it displays the same retention time and fragmentation pattern as an AVSO₂ standard generated by photooxidation (data not shown).³⁸ One can estimate that the reaction studied here generates ~2% of

molecular oxygen in the $^1\Delta_g$ state considering the nominal peroxyxynitrite concentration (from the observed consumption of AVS (8.0 mM), evaluated by the corresponding HPLC/UV peak area when in the presence of the glyoxal (10.0 mM)/peroxyxynitrite (2.0 mM) system) and considering that (i) one molecule of $O_2 (^1\Delta_g)$ requires two formylperoxyl radicals, (ii) the Russell reaction forms $\sim 10\%$ $O_2 (^1\Delta_g)$,²⁸ and (iii) the chemical yield of $O_2 (^1\Delta_g)$ trapping by AVS is about 50%. As expected from work published elsewhere,⁶⁰ peroxyxynitrite alone gives rise to $O_2 (^1\Delta_g)$ at lower yields, as shown in traces b and e of Figure 5B. That the oxygen atoms of AVSO₂ are not derived exclusively from peroxyxynitrite was confirmed by repeating the experiment under N₂ (Figure 5B, trace e) compared to normally aerated solution (Figure 5B, trace c).

Unequivocal evidence for glyoxal/peroxyxynitrite-generated $O_2 (^1\Delta_g)$ cycloaddition to AVS by a mechanism involving a Russell reaction of formylperoxyl radical intermediate was provided by oxygen labeling experiments with $^{18}O_2$. The MRM trace of the 212–194 transition depicted by Figure 5C, trace d, shows that in $^{18}O_2$ -purged solutions, treatment of glyoxal with peroxyxynitrite renders almost exclusively AVS $^{18}O_2$. Control experiments described in the caption to the figure show no AVS $^{18}O_2$ formation. Furthermore, generation of small amounts of AVS $^{16}O_2$ in the experiment performed with $^{18}O_2$ -purged solutions (Figure 5B, trace d) may be due to peroxyxynitrite⁶⁰ and/or a dioxirane intermediate¹⁶ acting as a minor source of $O_2 (^1\Delta_g)$.

Formate Analysis. Formate was the main product detected by CE-UV in the final reaction mixture from the glyoxal/peroxyxynitrite system (Figure 6). Consistent with the

known concentrations, and citrate was used as an internal standard. The insets in Figure 6 show the dependence of formate concentration in the final reaction mixture on reacting glyoxal (1.0–10 mM) and peroxyxynitrite (1.0–5.0 mM) under continuous vortex aeration. Using 1.5 mM peroxyxynitrite and 4.5 mM glyoxal (inset B), 2.0 mM formate was found from curve deflection. Assuming peroxyxynitrite reacts stoichiometrically with glyoxal and each glyoxal molecule can generate maximally two formate ions, the chemical yield of formate is roughly 66%.

The absence of glyoxalate and oxalate in the final reaction mixtures indicates that partial oxidation of glyoxal by peroxyxynitrite does not occur. These results attest that the reaction proceeds by an initial step of nucleophilic addition of peroxyxynitrite to glyoxal, followed by oxidative fragmentation to formate ion in the presence of molecular oxygen, as previously reported for other peroxyxynitrite-treated α -dicarbonyls.^{14,15}

Potential Biological Implications. Singlet oxygen is a strong electrophile known to react with various biomolecules, including nucleic acids, proteins, and lipids. It has been suggested to play beneficial and deleterious cellular roles including in cell signaling cascades associated with apoptosis and in genetically controlled death of plants. To date, singlet oxygen is reportedly formed in vivo (i) chemically, from ClO^- anion and peroxides (e.g., H_2O_2 , $ONOO^-$) and from dismutation of $ROO^\bullet$ radicals derived from polyunsaturated fatty acids, nucleobases, and amino acids, (ii) enzymatically from prostaglandin cyclooxygenase, hemoglobin or myoglobin/ H_2O_2 , and lactoperoxidase/ H_2O_2 , (iii) UVA radiation, or (iv) through photosensitization of molecular oxygen by endogenous (e.g., protoporphyrin IX) and xenobiotic dyes used in photodynamic therapy.^{57–64}

Although normally present at very low concentrations in tissues, glyoxal and peroxyxynitrite are accumulated in some human disorders and might spark adverse responses associated with the chemistry of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen. For example, glyoxal concentration is reportedly in the range 0.05–0.08 $\mu\text{g/mL}$ in serum⁶⁵ and $12.5 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ in plasma⁶⁶ of healthy individuals but reaches 0.19–0.33 $\mu\text{g/mL}$ ⁶⁵ in serum, $22.6 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ in plasma,⁶⁶ and 0.18–0.40 $\mu\text{g/mL}$ ⁶⁵ in the urine of diabetes patients. On the other hand, very high fluxes ($>2 \mu\text{M/s}$) of $NO^\bullet/O_2^{\bullet-}$ were found to be required in vitro to yield peroxyxynitrite at concentrations able to ultimately accomplish tyrosine nitration and dimerization.⁶⁷ Nevertheless, the relevance of the glyoxal/peroxyxynitrite pair in biological systems must be considered in light of the complex spatiality and temporality of cellular events.⁶⁸ These are governed by cell compartmentalization, metabolism, and duration of toxicant exposure, in addition to concentration factors, intermediate lifetimes, and reaction rate constants. Thus, it is tempting to propose that the glyoxal–peroxyxynitrite reaction may take place chronically in tissue microenvironments under adverse oxidative, nitrosative, and carbonyl stress, as is the case of inflammation sites.

Noteworthy, on the basis of the short lifetime and lack of chemical selectivity of such highly oxidant species, a role of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen as well as of hydroxyl radical in cell signaling was recently questioned by Forman et al.⁶⁸ However, secondary products of singlet oxygen activity may influence cell signaling. For example, a cholesterol carboxaldehyde specifically formed from cholesterol oxidation by singlet oxygen or exogenous ozone,⁶⁹ and implicated in the pathophysiology of atherosclerosis and Alzheimer diseases, induces cytotoxicity in cardiomyocytes through an H_2O_2 and

Figure 6. CE-UV electropherogram obtained for the final reaction mixture of glyoxal (2.5 mM) treated with peroxyxynitrite (1.5 mM). Citrate (1 mM) was added as an internal standard. Inset: Dependence of formate ion yield on the concentrations of peroxyxynitrite and glyoxal. (A) Peroxyxynitrite (1.0–4.5 mM) in the presence of 5.0 mM glyoxal. (B) Peroxyxynitrite (3.0 mM) in the presence of glyoxal (1.0–10 mM).

hypothetical intermediacy of a nitrosoperoxy carbonyl adduct, whose homolysis yields $^\bullet NO_2$,^{17,18} an increased nitrite/nitrate ratio is expected to be found in the spent reaction mixture.^{16,17}

However, the concentration of these anions is normally high in peroxyxynitrite stock solutions, thereby offering low analytical accuracy and allowing detection of just a trend for relative increase of nitrite. The equipment was calibrated with a mixture of nitrite, nitrate, phosphate, glyoxalate, formate, and oxalate at

p38 mitogen activated protein kinase-mediated signaling process.⁷⁰

CONCLUSION

The reaction of glyoxal with peroxyxynitrite in aerated medium is envisaged here as being initiated by phosphate-catalyzed peroxyxynitrite addition to glyoxal to form a hypothetical nitrosoperoxy intermediate (Scheme 1). Subsequent homolysis

Scheme 1. Chemical Mechanism Proposed for the Generation of Singlet Oxygen from the Glyoxal–Peroxyxynitrite System in Aerated Phosphate Buffer, pH 7.2

of this intermediate yields $\cdot\text{NO}_2$ and a glyoxal-derived oxyl radical. β -Cleavage of the latter radical is expected to generate formate ion and formyl radical, followed by formyl radical annihilation by molecular oxygen to a formylperoxyl radical. By virtue of displaying a geminal hydrogen, the formylperoxyl radical is prone to dismutation (Russell reaction) yielding molecular oxygen in the singlet ($^1\Delta_g$) state, formic acid, and CO_2 . This mechanism is strongly supported by (i) the observed concentration-dependent phosphate-catalyzed peroxyxynitrite consumption by glyoxal (Figure 1), ultimately yielding formate as the only product (Figure 6), (ii) direct flow EPR experiments with glyoxal/peroxyxynitrite in the presence of MNP which reveal a radical adduct with hydrogen atom expectedly formed from formyl radical decarbonylation (Figures 2 and 3), and (iii) detection of the monomolecular emission of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) at 1270 nm in buffered D_2O , which can be quenched by L-histidine and azide ion and trapped with AVS to form the corresponding 9,10-endoperoxide.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

ejhbechara@gmail.com

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. B. Bandy (University of Saskatchewan, Canada) for kindly reading the manuscript and F. M. Prado for technical assistance. Funding sources for this work are the following: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma).

DEDICATION

[†]Dedicated to Dr. Thérèse Wilson (Harvard University, MA).

REFERENCES

- (1) Gobert, J.; Glomb, M. A. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8591.
- (2) Kuntz, S.; Rudloff, S.; Ehl, J.; Bretzel, R. G.; Kunz, C. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48*, 499.
- (3) Darowska, A.; Borcz, A.; Nawrocki, J. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 1170.
- (4) da Silva Ferreira, A. C.; Reis, S.; Rodrigues, C.; Oliveira, C.; de Pinho, P. G. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S314.
- (5) Neng, N. R.; Cordeiro, C. A.; Freire, A. P.; Nogueira, J. M. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1169*, 47.
- (6) Fujioka, K.; Shibamoto, T. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 47.
- (7) Liu, W.; Zhang, J.; Know, J.; Weisel, C.; Turping, B.; Zhang, L.; Korn, L.; Morandi, M.; Stock, T.; Colome, S. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **2006**, *56*, 1196.
- (8) Salter, R. J.; Blitz, M. A.; Heard, D. E.; Pilling, M. J.; Seakins, P. W. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8278.
- (9) Ho, S. S.; Yu, J. Z.; Chu, K. W.; Yeung, L. L. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **2006**, *56*, 1091.
- (10) Grillo, M. A.; Colombatto, S. *Amino Acids* **2008**, *35*, 29.
- (11) Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Iwamoto, N.; Kasai, H. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2251.
- (12) Awada, M.; Dedon, P. C. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1247.
- (13) Thornalley, P. J. *Drug Metab. Drug Interact.* **2008**, *23*, 125.
- (14) Massari, J.; Tokikawa, R.; Zanolli, L.; Tavares, M. F. M.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1762.
- (15) Massari, J.; Fujii, D. E.; Dutra, F.; Vaz, S. M.; Costa, A. C. O.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; Tokikawa, R.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 879.
- (16) Yang, D.; Tang, T.; Chen, J.; Wang, X.; Bartberger, M. D.; Houk, K. N.; Olson, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11976.
- (17) Uppu, R. M.; Winston, G. W.; Pryor, W. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1331.
- (18) Nakao, L. S.; Ouchi, D.; Augusto, O. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *12*, 1010.
- (19) Medinas, D. B.; Cerchiaro, G.; Trindade, D. F.; Augusto, O. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 255.
- (20) Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C.; Menezes, S. L. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *32*, 841.
- (21) Lobachev, V. L.; Rudakov, E. S. *Russ. Chem. Rev.* **2006**, *75*, 375.
- (22) Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 161.
- (23) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315.
- (24) Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 662.
- (25) Radi, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 4003.
- (26) Goldstein, S.; Merényi, G. *Methods Enzymol.* **2008**, *436*, 49.
- (27) Rebrin, I.; Bregere, C.; Gallaher, T. K.; Sohal, R. S. *Methods Enzymol.* **2008**, *441*, 283.
- (28) Niu, Q.; Mendenhall, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 165.
- (29) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871.
- (30) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4583.
- (31) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1047.
- (32) Howard, J. A.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1056.
- (33) Kanofsky, J. R.; Axelrod, B. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1099.
- (34) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 1620.
- (35) Beers, R. F.; Sizer, W. I. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133.
- (36) Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *J. Chem. Soc. A* **1968**, 450.
- (37) Nardello, V.; Aubry, J. I. M.; Johnston, P.; Bulduk, I.; de Vries, A. H. M.; Alsters, P. L. *Synlett* **2005**, 2667.
- (38) Prado, F. M.; Oliveira, M. C. B.; Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Ronsein, G. E.; Di Mascio, P. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 401.
- (39) Duling, D. R. *J. Magn. Reson.* **1994**, *104*, 105.
- (40) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172.
- (41) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Martins, A. P. B.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4510.
- (42) Betterton, E. A.; Hoffmann, M. R. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3011.
- (43) Thornalley, P. J.; Yurek-George, A.; Argirov, O. K. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 55.
- (44) Denicola, A.; Freeman, B. A.; Trujillo, M.; Radi, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 49.

- (45) Lyman, S. V.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8867.
- (46) Buettner, G. R. *Free Radical Biol. Med.* **1987**, *3*, 259.
- (47) Kennedy, C. H.; Pryor, W. A.; Winston, G. W.; Church, D. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 1123.
- (48) Chignell, C. F.; Kalyanaraman, B.; Mason, R. P.; Sik, R. H. *Photochem. Photobiol.* **1980**, *32*, 563.
- (49) Gunther, M. R.; Peters, J. A.; Silvaneri, M. K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9160.
- (50) Makino, K.; Suzuki, N.; Moriya, F.; Rokushika, S.; Hatano, H. *Radiat. Res.* **1981**, *86*, 294.
- (51) Troe, J. J. *Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 3868.
- (52) Carbajo, P. G.; Smith, S. C.; Holloway, A.-L.; Smith, C. A.; Pope, F. D.; Shallcross, D. E.; Orr-Ewing, A. J. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12437.
- (53) McElroy, W. J.; Waygood, S. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 1513.
- (54) Salter, R. J.; Blitz, M. A.; Heard, D. E.; Pilling, M. J.; Seakins, P. W. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8278.
- (55) Janzen, E. G.; Lopp, I. G.; Morgan, T. V. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 139.
- (56) Heinzel, A.; Holze, R.; Hamann, C. H.; Blum, J. K. *Electrochim. Acta* **1989**, *34*, 657.
- (57) Khan, A. U.; Kasha, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3293.
- (58) Lengfelder, E.; Cadenas, E.; Sies, H. *FEBS Lett.* **1983**, *164*, 366.
- (59) Krinsky, N. I. *Trends Biochem. Sci.* **1977**, *2*, 35.
- (60) Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Corrêa, T. C.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *Dalton Trans.* **2009**, 5720.
- (61) Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Prado, F. M.; Uemi, M.; Corrêa, T. C.; Toma, I. N.; Bertolucci, A.; Oliveira, M. C. B.; Motta, F. D.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 322.
- (62) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685.
- (63) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 903.
- (64) Alarcón, E.; Henríquez, C.; Aspée, A.; Lissi, E. A. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 475.
- (65) Zardari, L. A.; Khuhawar, A. J.; Laghari, A. J. *Chromatographia* **2009**, *70*, 891.
- (66) Lapolla, A.; Flamini, R.; Lupo, A.; Aricò, N. C.; Rugiu, C.; Reitano, R.; Tubaro, M.; Regazzi, E.; Seraglia, R.; Traldi, P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 217.
- (67) Pfeiffer, S.; Schmidt, K.; Mayer, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6346.
- (68) Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F. *Biochemistry* **2010**, *49*, 835.
- (69) Uemi, M.; Ronsein, G. E.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 875.
- (70) Laynes, L.; Raghavamenon, A. C.; D'Auvergne, O.; Achuthan, V.; Uppu, R. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 90.

ANEXO D. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Ferricytochrome *c* Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress

OPEN ACCESS Freely available online

Ferricytochrome *c* Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress

Adriano Sartori^{1,2}, Camila M. Mano¹, Mariana C. Mantovani³, Fábio H. Dyszy⁴, Júlio Massari¹, Rita Tokikawa¹, Otaciro R. Nascimento⁴, Iseli L. Nantes⁵, Etelvino J. H. Bechara^{1,3*}

1 Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil, **5** Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brazil

Ferricytochrome *c* Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress

Adriano Sartori^{1,2}, Camila M. Mano¹, Mariana C. Mantovani³, Fábio H. Dyszy⁴, Júlio Massari¹, Rita Tokikawa¹, Otaciro R. Nascimento⁴, Iseli L. Nantes⁵, Etelvino J. H. Bechara^{1,3*}

1 Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil, **4** Departamento de Física e Informática, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil, **5** Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, São Paulo, Brazil

Abstract

Age-related diseases are associated with increased production of reactive oxygen and carbonyl species such as methylglyoxal. Aminoacetone, a putative threonine catabolite, is reportedly known to undergo metal-catalyzed oxidation to methylglyoxal, NH_4^+ ion, and H_2O_2 coupled with (i) permeabilization of rat liver mitochondria, and (ii) apoptosis of insulin-producing cells. Oxidation of aminoacetone to methylglyoxal is now shown to be accelerated by ferricytochrome *c*, a reaction initiated by one-electron reduction of ferricytochrome *c* by aminoacetone without amino acid modifications. The participation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and $\text{HO}^{\cdot}$ radical intermediates is demonstrated by the inhibitory effect of added superoxide dismutase and Electron Paramagnetic Resonance spin-trapping experiments with 5,5'-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide. We hypothesize that two consecutive one-electron transfers from aminoacetone (E_0 values = -0.51 and -1.0 V) to ferricytochrome *c* ($E_0 = 0.26$ V) may lead to aminoacetone enoyl radical and, subsequently, imine aminoacetone, whose hydrolysis yields methylglyoxal and NH_4^+ ion. In the presence of oxygen, aminoacetone enoyl and $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals propagate aminoacetone oxidation to methylglyoxal and H_2O_2 . These data endorse the hypothesis that aminoacetone, putatively accumulated in diabetes, may directly reduce ferricyt *c* yielding methylglyoxal and free radicals, thereby triggering redox imbalance and adverse mitochondrial responses.

Citation: Sartori A, Mano CM, Mantovani MC, Dyszy FH, Massari J, et al. (2013) Ferricytochrome *c* Directly Oxidizes Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress. PLoS ONE 8(3): e57790. doi:10.1371/journal.pone.0057790

Editor: Ferenc Gallyas, University of Pecs Medical School, Hungary

Received: December 19, 2012; **Accepted:** January 25, 2013; **Published:** March 6, 2013

Copyright: © 2013 Sartori et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the INCT Processos Redox em Biomedicina (Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ejhbechara@gmail.com

Introduction

Age-related illnesses such as atherosclerosis, diabetes and Alzheimer's disease have been associated with increased iron and copper release from metal storage proteins and the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) [1–23]. These species are known to trigger the peroxidation of lipids, proteins, carbohydrates and DNA ultimately yielding reactive carbonyls such as α -oxoaldehydes, α,β -alkenals, and epoxy- α,β -alkenals, for which conjugation with the nucleophilic amino groups of proteins and nucleobases can lead to a pathogenic condition called “carbonyl stress” [4]. Methylglyoxal (MG) [5], glyoxal [6], acrolein [7], 4-hydroxy-2-nonenal [8], and 3-deoxyglucosone [9] exemplify catabolites that are connected with carbonyl stress. MG produced in cells from triose phosphates, and putatively from aminoacetone (AA) metabolism [10], has been reported to originate ethane cycloadducts with DNA bases and Schiff conjugates with Arg/Lys amino groups of proteins leading to advanced glycation endproducts (AGEs) formation [11]. Methylglyoxal has been implicated in the microvascular alterations that underlie the

neuropathy, nephropathy, retinopathy, and atherosclerosis manifested in diabetes [12] and to be associated with the neurological symptoms of Alzheimer's disease [13].

Conversely, AA is a putative threonine and glycine catabolite produced in the mitochondrial matrix that reportedly undergoes enzymatic and iron/copper-catalyzed oxidation to MG, H_2O_2 , and NH_4^+ ion [14] (Figure 1). AA enzymatic oxidation is accomplished by a non-specific semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) [15] found at high activity levels in the plasma of type I and II diabetics [16]. Dutra et al. [14,17–18] reported that AA *in vitro* promotes oxygen-dependent copper and iron release from horse spleen ferritin and human plasma ceruloplasmin concomitantly with protein modification and function losses. AA is also associated with a variety of injuries in biomolecules and with mitochondrial and cell dysfunction and apoptosis [14,19–20]. Among other α -aminoketones of biological interest that can produce reactive α -oxoaldehydes and ROS by aerobic oxidation, we mention 5-aminolevulinic acid (ALA) [21], a heme precursor accumulated in porphyric disorders, and 1,4-diaminobutanone (DAB), a wide spectrum microbicide [22,23].

Figure 1. Proposed mechanism of AA oxidation catalyzed by iron and copper ions (Adapted from Dutra et al. [14]).
doi:10.1371/journal.pone.0057790.g001

With regard to mitochondrial protein and DNA damage in aging, diabetes and neurodegenerative diseases, the multifaceted, beneficial and harmful roles of cytochrome *c* in electron transport, peroxidatic reactions and apoptosis are documented in detail [24]. Ferricytochrome *c* (ferricyt *c*) can react with lipid-derived peroxides and aldehydes yielding free radical intermediates and triplet carbonyl products, which can promote oxidative damage in a number of biomolecules, including the heme protein itself [25–26]. On the other hand, the ferricyt *c* ability to be promptly reduced by the $O_2^{\bullet -}$ radical may contribute to prevent the initiation of deleterious radical chains because the competitive formation of H_2O_2 by superoxide dismutation can be lessened [27].

Considering that (i) mitochondrial dysfunction appears to be implicated in the pathophysiology of diabetes [28], (ii) pro-oxidant AA is putatively biosynthesized in the mitochondrial matrix [29], (iii) aminoacetone degradation has been proposed as a contributing source of plasma MG under normal conditions [30], and (iv) the reduction potential of ferricyt *c* [31] and of AA measured here are thermodynamically favorable to one-electron oxidation of AA yielding a resonant $AA^{\bullet}$ enoyl radical, which is expected to initiate a radical oxidation chain by molecular oxygen, we embarked on an investigation of the reaction mechanism of AA aerobic oxidation initiated by ferricyt *c* and the structural susceptibility of the hemeprotein to the reaction radical intermediates and the final product, MG.

Materials and Methods

Reagents

Reagents of the highest available purity were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and HPLC quality solvents were acquired from Merck (Darmstadt, GE). AA.HCl was prepared according to Hepworth [32] and recrystallized from ethanol:ether (8:2). Light yellow AA crystals [34% yield; δ (ppm), in D_2O : 2.08 (3H, s), 3.88 (2H, s)] were weighed, sealed in Eppendorf vials, placed in a nitrogen glove box and stored at $-20^\circ C$. Stock solutions of AA were prepared in nitrogen-purged Milli-Q purified water immediately before use. Stock solutions of horse heart ferricyt *c* type III (1.0 mM) were obtained by dissolving the heme protein in Milli-Q purified water. All of the experiments were performed in 50 mM Chelex-treated phosphate buffer, pH 7.4, prepared with Milli Q water.

Oxygen Uptake

Oxygen uptake was monitored in a Hansatech Oxygraph equipped with a Clark-type electrode. Oxygen consumption by AA (1.0–5.0 mM) was monitored for 30 min at $37^\circ C$ in the absence and presence of ferricyt *c* (50 μM). Involvement of ROS in the reaction mechanism was verified upon the pre-addition of the antioxidant enzymes catalase (5 μM) and copper-zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) (50 U/mL) in the reaction mixture.

EPR Spin-trapping

EPR spin-trapping studies of the AA/ferricyt *c*-containing reaction mixtures were performed with 5,5'-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) (25–400 mM) and alpha-phenyl-*N*-tert-butyl nitron (PBN) (50 mM) in the presence or absence of dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethanol (30%) at $25^\circ C$, using a Bruker EMX spectrometer. The EPR spectra were traced 4 min after the addition of 15 mM AA. Catalase (15 μM), CuZnSOD (150 U/mL), desferoxamine (100 μM) and diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) (100 μM) were added to the reaction mixture in order to verify contribution of adventitious iron to the generation of ROS by the complete system. The operating conditions are indicated in the figure legends. EPR spectra were analyzed using the EasySpin program [33], which is frequently employed for the simulation of liquid- and solid-state EPR, including both Gaussian and Lorentzian line shapes.

UV-Vis Spectrophotometry

Absorption spectra of the samples were recorded with a Varian Cary 50 Bio spectrophotometer at $37^\circ C$. Ferricyt *c* (5.0–100 μM) spectral changes during reactions with AA (0.5–30 mM), in the presence or absence of CuZnSOD (50 U/mL), were analyzed by monitoring the bathochromic shift of the Soret band (409 nm) and the increase of the 550 nm absorption band.

Kinetic Measurements

The initial rates of ferricyt *c* (50 μM) conversion to its ferrous form upon addition of AA at increasing concentrations (0.50–30 mM) (k_{obs}) were spectrometrically followed at 550 nm, from which the apparent second order rate constant (k_2) was evaluated. All experiments (triplicates) were performed in normally aerated Chelex-treated 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at $37^\circ C$.

Cyclic Voltammetry

Electrochemical studies of AA (5.0 mM) were conducted under strictly anaerobic conditions in DMSO purged with pure nitrogen. The cyclic voltammograms were traced at 25°C, at a scan rate of 100 mV/s. A platinum working electrode was employed in all of the experiments, with a platinum foil as a counter electrode. Potentials were referred to an Ag/AgCl (1.0 M KCl) electrode (+0.503 V) versus a Standard Hydrogen Electrode (SHE). Tetrabutylammonium perchlorate (0.10 mol/L) was used as a background electrolyte.

Raman Spectroscopy

Ferricytochrome *c* (50 μ M) was incubated for 2 h in the presence and absence of AA (5.0 mM), or H₂O₂ 200 μ M, or MG (200 μ M). Before recording the Raman resonance spectra, ferricyt *c* was filtered (Amicon Ultra 10K device), and the pellet was resuspended in 50 mM Chelex-treated phosphate buffer, pH 7.4. Resonance Raman spectra were recorded at 413.1 nm (Kr⁺ ion laser, Coherent INNOVA 90) using a Jobin-Yvon T64000 triple spectrometer, with a liquid nitrogen-cooled CCD detector. The spectral resolution was 4 cm⁻¹, and the laser power was maintained at 25 mW. A homemade spinning cell was used to prevent local heating.

Product Analysis

Methylglyoxal in the spent reaction mixture was derivatized with 1,2-diaminobenzene to form a stable product, 2-methylquinoxaline, and analyzed by HPLC/diode array detection, using a procedure adapted from Deng and Yu [34], as follows. The reaction mixture contained 5.0 mM AA and 50 μ M ferricyt *c* or 30 μ M FeSO₄.EDTA prepared immediately before use, dissolved in air-equilibrated 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C, and prepared in an Eppendorf flask with minimal headspace, where dissolved oxygen is expected to be roughly 200 μ M. After 2 h of reaction, 1.0 M HClO₄ and 1.0 mM 1,2-diaminobenzene were added to stop the reaction and stabilize the product. In all experiments, MG was determined in parallel to control runs (in the absence of AA or ferricyt *c*) using 1,2-diaminobenzene or 2-methylquinoxaline (internal standard) heated at 60°C for 3 h, followed by HPLC/diode array analysis with detection at 315 nm. No change of 2-methylquinoxaline (B.P. 245–247°C) concentration was observed in the control HPLC traces, thereby discarding the possibility of product degradation by heating [14].

Tryptophan Fluorimetry

Ferricyt *c* (50 μ M) was treated with (1.0–5.0 mM) AA at 37°C for 4 h, and an aliquot of 300 μ L of the reaction mixture was removed and filtered (Amicon Ultra 10K device). Protein remaining on the filter was resuspended in 50 mM Chelex-treated phosphate buffer, pH 7.4. This step was necessary to eliminate the interference of AA oxidation products in the fluorescence measurements. The fluorescence intensities of the tryptophan residue of cytochrome *c* (λ_{em} 340 nm, λ_{exc} 280 nm) were measured in a microplate reader (Molecular Devices, model Spectramax M2e).

CD Analysis

Ferricyt *c* (60 μ M) was treated with AA (1.0–5.0 mM) at 37°C for 12 h, diluted 5 times in Milli-Q purified water and then analyzed. The CD spectra were collected in the range 190–630 nm (Far-UV, Near-UV, and Soret regions) in a Jasco J-720 spectropolarimeter, at room temperature. Quartz cells with 0.10- and 0.50-cm light paths were used for measurements in the far-UV

and in the near-UV/Soret regions, respectively. All spectra were corrected by subtracting the corresponding backgrounds. The spectra were acquired with 10 nm/min resolution, applying an average of 4 scans per spectrum. The CD spectrum of ferricyt *c* (60 μ M) treated with ascorbate (5.0 μ M) was traced in parallel to depict the total reduction of the protein to its ferro form.

Low-temperature EPR Spectrometry

Ferricyt *c* (300 μ M) in the presence and absence of AA (1.0–5.0 mM) was incubated in the buffer at 37°C for 12 h before recording the EPR spectra. EPR continuous wave spectra were recorded in a standard rectangular cavity-equipped X-band spectrometer (Bruker Elexsys line E-580). The temperature of ~11 K was maintained by liquid helium (Helitran Oxford Systems). The samples were placed in a quartz tube and frozen in liquid nitrogen prior to introduction into the microwave cavity for spectral recording. The experimental parameters were set as follows: microwave frequency, 9.5 GHz; microwave power, 5.05 mW; magnetic field scan range, 35–425 mT; and modulation amplitude, 1 mT.

Magnetic Circular Dichroism (MCD) Spectrometry

Measurements of ferricyt *c* (40 μ M) in the absence or presence of AA (1.0–5.0 mM) were conducted in a Jasco J-720 spectropolarimeter. The magnetic field was 870 mT, and the optical path was 5 mm. The spectra were recorded at room temperature, pH 7.4, after 12 h of ferricyt *c* treatment with AA (1.0–5.0 mM). MCD traces with AA (1.0 mM) were also obtained after 1 and 2 h of treatment.

Preparation of Liposomes

Cellular and mitochondrial mimetic membranes were prepared from stock chloroform solutions of soybean phosphatidylcholine (PC) (2.0 mM) alone, and from a mix of PC (0.85 mM), dipalmitoyl phosphatidylethanolamine (PE) (0.65 mM), and cardiolipin (CP) (0.50 mM), respectively. The solvent was evaporated by flushing with N₂ to allow for the formation of a homogeneous dry film. Lipid films were stored in the dark in a vacuum to eliminate traces of chloroform. Multilamellar vesicles were prepared by mixing 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, with the lipid film, followed by an ultrasonic water bath for 5 min at 35°C. Next, unilamellar liposomes were prepared at room temperature by extrusion from the previous multilamellar suspension in a Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL, USA) through 0.1- μ m mesh polycarbonate membranes.

Liposome Peroxidation Measurements

Liposomes were incubated with ferricyt *c* (50 μ M) in the presence or absence of AA (1.0–5.0 mM), 1.0 mL final volume, at 37°C, for 2 h. Malondialdehyde (MDA) production was analyzed in a Waters HPLC equipped with a 515 HPLC pump, 474 scanning fluorescence, and 515 photodiode array detectors. MDA separation was performed in a reverse-phase column C-18 (150×4.60 mm, Phenomenex®) with a mixture of 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, and with methanol (70:30 v/v) as the mobile phase. The isocratic flow rate was maintained at 0.60 mL/min, and the analyte absorbance was monitored at 532 nm in 30-min runs. The results are expressed as a fold change relative to control groups.

Statistical Analysis

All the experiments were performed at least in triplicate. The results were analyzed by One-Way ANOVA, using the Tukey's

Significant Test (Origin version 8.0). A probability of $p < 0.05$ was used as the criterion for statistical significance.

Results

Ferricyt *c* Reaction with AA is Accompanied by Oxygen Consumption and Free Radical Generation

Similar to other α -aminoketones such as ALA, a heme precursor, and DAB, a *Trypanosoma cruzi* toxin, AA undergoes phosphate-catalyzed enolization followed by metal-catalyzed oxidation, which is propagated by $O_2^{\cdot-}$ and enoyl AA radicals (Figure 1), to ultimately produce MG, H_2O_2 , and NH_4^+ ion [21–23] (Eq. 1).

Figure 2 shows that AA (5.0 mM) consumes the dissolved O_2 at a significantly augmented initial rate upon the addition of ferricyt *c* (10 μ M): $5.6 \pm 0.7 \mu$ M O_2 /min ($n = 5$) vs. $3.0 \pm 0.9 \mu$ M O_2 /min ($n = 5$). The addition of catalase (5 μ M) or CuZnSOD (50 U/mL) to the complete system inhibit oxygen consumption by 50% ($2.8 \pm 0.4 \mu$ M O_2 /min, $n = 5$) and 40% ($3.4 \pm 0.6 \mu$ M O_2 /min, $n = 5$), respectively, indicating the involvement of H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ in the mechanism of AA oxidation induced by ferricyt *c*. For comparison, the reaction of ferricyt *c* (50 μ M) reduction by AA (1.0 mM), was found to be roughly 10-fold faster and 2-fold slower than those observed with two other α -aminoketones, - ALA and DAB-, respectively, both at 1.0 mM concentration in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4 at 36°C (data not shown). At this pH, the enol form of ALA is a carboxylate anion [$CH(NH_2) = C(OH)CH_2CH_2COO^-$; pK_a $-COOH \sim 4.5$] [35], DAB is an alkylammonium cation [$CH(NH_2) = C(OH)CH_2CH_2NH_3^+$; pK_a $-NH_3^+ \sim 9.5$] [22], and AA is present in the neutral form [$CH(NH_2) = C(OH)CH_3$]. How the ionic character affects the aminoketone reduction potential, its affinity for cyt *c* and reaction rates awaits further studies.

That $O_2^{\cdot-}$ and $HO^{\cdot}$ radicals are formed during the aerobic oxidation of AA both in absence and the presence of ferricyt *c* was demonstrated by EPR spin-trapping experiments with DMPO (Figure 3A). Accordingly, upon incubation of 15 mM AA system with 25 mM DMPO, the characteristic 4-line signal (1:2:2:1) of the DMPO- $\cdot OH$ radical adduct was observed ($a_N = a_H = 1.49$ mT) (Figure 3A, trace b) [36]. The DMPO- $\cdot OH$ adduct probably results from the spontaneous, rapid decay of the DMPO-superoxide adduct (DMPO- $\cdot OOH$), whose $t_{1/2} = 27$ s and 91 s at pH 9 and 5, respectively [37]. This signal was significantly intensified in the presence of 150 μ M ferricyt *c* (Figure 3A, trace d) that has been shown to accelerate the oxygen-consuming AA reaction (Figure 2). To preclude participation of contaminant iron in the generation of hydroxyl radicals by a Haber-Weiss reaction, parallel experiments were run in the presence of 100 μ M desferoxamine or DTPA, which were shown to not decrease the EPR amplitude signal (Figure 3A, trace c). Expectedly, the addition of CuZnSOD (150 U/mL) strongly abated the DMPO- $\cdot OH$ signal (Figure 3A, trace e). Conversely, the inhibitory effect of catalase (Figure 3A, trace f), although weaker than with CuZnSOD, implies concomitant $HO^{\cdot}$ radical formation from H_2O_2 . Possibly, the resonant enoyl AA $\cdot$ radical intermediate behaves like a semiquinone by donating an electron to H_2O_2 yielding $HO^{\cdot}$ radical, as recently demonstrated by Shang *et al.*

when studying the redox cycling of 1,4-naphthoquinone [38]. Accordingly, DMSO addition to the reaction mixture resulted in a signal attributable to the DMPO- $\cdot CH_3$ adduct ($a_H = 2.24$ mT; $a_N = 1.59$ mT) [39], which is reportedly originated by hydroxyl radical-promoted methyl radical release from DMSO (Figure 3B). Additional experiments were conducted in the presence of CuZnSOD and catalase to demonstrate primary formation of superoxide radicals by the reaction of AA with ferricyt *c*. Expectedly, CuZnSOD addition was highly efficient in decreasing the signal of the DMSO-derived methyl radical (Figure 3B, trace c), whereas 15 μ M catalase had little effect on the EPR signal amplitude obtained with 150 μ M ferricyt *c* and 15 mM AA (data not shown). Because DMSO is known to lessen the catalase activity [40], ESR spin-trapping experiments were performed using DMPO/ethanol to demonstrate that H_2O_2 is the main source of $HO^{\cdot}$ radical in the AA/ferricyt *c* system (Figure 3C). Ethanol is known to be harmless to catalase and can be oxidized by $HO^{\cdot}$ radical to an α -hydroxyethyl radical yielding the stable adduct DMPO- $\cdot CHOH-CH_3$ ($a_H = 2.28$ mT; $a_N = 1.58$ mT) [41]. The spin signals decreased upon CuZnSOD or catalase addition (Figure 3C, traces d and e, respectively), which corroborates the generation of $O_2^{\cdot-}$ and $HO^{\cdot}$ radicals by the mechanisms described above.

Further EPR spin-trapping experiments with PBN (α -phenyl-*N*-tert-butyl nitrene) were conducted using AA/DMSO to confirm $O_2^{\cdot-}$ and $HO^{\cdot}$ radical involvement in the AA/cyt *c* reaction. A 6-line EPR signal assignable to the PBN- $\cdot CH_3$ adduct ($a_H = 0.36$ mT; $a_N = 1.65$ mT) was recorded, as previously described by Burkitt and Mason [42] (data not shown). As expected from the DMPO-containing experiments, the PBN- $\cdot CH_3$ EPR signal grew less upon addition of CuZnSOD.

Aiming to demonstrate generation of AA $\cdot$ radical by the AA/cyt *c* system, EPR spin trapping experiments with DMPO at a higher concentration (400 mM) were performed (Figure 4AB). An additional radical adduct appears in Figures 4Aa and 4Ba inside the hydroxyl radical adduct lines that may be attributable adducts derived from superoxide or peroxy radicals [35]. On the other hand, Dutra *et al.* [14] previously attributed a 6-line EPR signal obtained during treatment of AA with Fe(II)EDTA in the presence of DMPO to an AA-derived secondary carbon-centered radical, probably the enoyl AA $\cdot$ radical generated by hydrogen abstraction from AA. Indeed, in the absence of ferricyt *c*, AA yielded two adduct signals (trace a) that were assigned by computer simulation (trace b) to DMPO- $\cdot OH$ ($a_N = 1.51$ mT; $a_H = 1.47$ mT, trace c), and DMPO-AA ($a_H = 2.24$ mT; $a_N = 1.59$ mT, trace d) adducts (Figure 4A) [14]. In the presence of ferricyt *c*, an unidentified adduct with $a_H = 1.86$ mT; $a_N = 1.53$ mT (trace e) was also detected. Consistently, the α -aminoketone DAB was also found to generate the 4-line DMPO- $\cdot OH$ signal adduct and the putative 6-line POBN-DAB $\cdot$ adduct during incubation in aerated phosphate buffer [22].

AA Promotes Direct Reduction of Ferricyt *c* Initiating the AA Aerobic Oxidation

The incubation of ferricyt *c* (10 μ M) with 100- to 500-fold molar excess of AA led to UV-visible spectral changes that are characteristic of heme iron reduction to the ferrous form (Figure 5A). The initial rate of heme iron reduction by AA, monitored at 550 nm, was found to be dependent on the concentration of AA (Figure 5B), and initial rates and k_{obs} values were plotted as a function of AA concentration (Figure 5C), from which $k_2 = 1.89 \pm 0.04$ M $^{-1}$ s $^{-1}$ was calculated. This value is approximately 10-fold higher than that measured in the absence of ferricyt *c* (0.160 ± 0.007 M $^{-1}$ s $^{-1}$) [14]. The plot of initial rate

Figure 2. Oxygen uptake by AA in the presence of ferricyt c. Experimental conditions: (50 μM) ferricyt c in the presence or absence of (5.0 mM) AA in 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C for 30 min. Experiments were performed in the absence or presence of catalase (5.0 μM) or CuZnSOD (50 U/mL). Data are representative of five independent runs. **p*<0.05 relative to the system containing only AA and #*p*<0.05 relative to the AA/ferricyt c system.
doi:10.1371/journal.pone.0057790.g002

versus ferricyt c concentration (Figure 5D) revealed a two-step behavior curve suggestive of two populations of cytochrome c reacting with AA, possibly the native form and the MG-modified cytochrome c form [43]. An inflexion occurred at 50 μM ferricyt c with the AA concentration fixed at 15 mM, which coincides with the saturation effect of AA in Figure 5B.

The initial rate of ferricyt c reduction by AA was only partially affected by CuZnSOD addition, which is indicative of the occurrence of the direct reduction of ferricyt c by the enolAA and/or AA[•] radical (Figure 5E). To ascertain whether AA can reduce ferricyt c, the reduction potential of AA was evaluated by cyclic voltammetry in DMSO containing 0.10 M tetrabutylammonium perchlorate (as a supporting electrolyte). Two reduction waves, at E_0 (AA[•]/AA) = −0.51 V and E_0 (AA[•]/AA_{imino}) = −1.0 V (*vs.* SHE), were found (not shown). Therefore, knowing that the E_0 of the cyt c-Fe³⁺/cyt c-Fe²⁺ pair is +0.26 against SHE [30], the reduction of ferricyt c by AA is, in fact, thermodynamically feasible. The measured reduction peaks of AA could conceivably correspond to the enolAA oxidation to the resonant enoylAA[•] radical, followed by a second electron abstraction to yield iminoAA, for which the hydrolysis culminates in the MG and NH₄⁺ ion formation (Figure 1). On the other hand, knowing that the reduction potentials of the AA[•]/AA_{imino} (in DMSO) and H₂O₂/HO[•] (in H₂O) pairs are −1.0 V and +0.38 V [44]), respectively, electron transfer from AA[•] to H₂O₂ leading to HO[•] radical generation may also be thermodynamically favorable.

Based on the data reported hereto, the mechanism of AA oxidation by ferricyt c (Figure 1) can be envisaged as follows:

A. In the absence of oxygen:

B. In the presence of oxygen, the enoyl AA radical formed by the reaction represented by Eq. 3 initiates the oxidation chain, as follows:

Figure 3. EPR spin-trapping studies of the ferricyt *c*/AA system under aerobic conditions. EPR spectra of DMPO-radical adducts were obtained after a 4-min incubation of 15 mM AA at 25°C in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) with (25 mM) DMPO: (A) DMPO experiments, (B) DMPO in the presence of DMSO 30% v/v, (C) DMPO in the presence of ethanol 30% v/v. For all of the figures: (a) control with ferricyt *c* (150 μM); (b) AA (15 mM); (c) AA (15 mM)+desferoxamine (100 μM); (d) ferricyt *c* (150 μM)+AA (15 mM); (e) system d+CuZnSOD (50 U/mL); (f) system d+catalase (15 μM) for Fig. 2A and 2C only. Instrumental conditions: microwave power, 20.2 mW; modulation amplitude, 1.0; time constant, 1.63 s; scan rate 0.1 G/s; and receiver gain, 1.12×10⁶. doi:10.1371/journal.pone.0057790.g003

The iminoAA species (methylglyoximine) can be formed either anaerobically or in the presence of oxygen and is expected to undergo spontaneous hydrolysis to MG and NH_4^+ ion (Eq. 6). Ferricytochrome *c*, in turn, can also be reduced by the $\text{O}_2^{\bullet-}$ radical. Even though it is thermodynamically favored, direct oxidation of AA ($E_0 \text{ AA/AA}^{\bullet} = -0.51 \text{ V}$) by molecular oxygen ($\text{O}_2^{\bullet-}/\text{O}_2 = -0.33 \text{ V}$) [46] probably does not occur because of the spin forbiddance of this process. Because the reduction potential of the enoylAA/iminoAA pair was found to be -1.00 V , the enoylAA[•] radical species can indeed reduce ferricyt *c* (Eq. 4) as well as molecular oxygen (Eq. 7), leading to iminoAA and $\text{O}_2^{\bullet-}$, respectively. It is worth noting that the ALA-derived enoyl radical (ALA[•]), similar to the AA[•], semiquinones, and $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals, can reduce and release iron from the ferritin core, thereby amplifying potentially deleterious oxidizing free radical chains sparked by α -aminoketones [17,47].

Ferricyt *c* Reaction with AA Yields MG as the Final Product

The incubation of 5.0 mM AA in phosphate buffer, pH 7.4, in the absence and presence of 50 μM ferricyt *c* for 2 h in a sealed flask, under a condition of limiting oxygen concentration (approx. 200 μM), produced $(39.3 \pm 1.9 \text{ μM})$ and $(45.3 \pm 4.6) \text{ μM}$ MG (triplicates), respectively, after its derivatization with 1,2-diaminobenzene (See Methods). For comparison, a 2-fold higher concentration of MG $(92.9 \pm 1.2 \text{ μM})$ was detected in 30 μM Fe(II)EDTA-containing solution under the same experimental conditions. In addition, in the absence of AA, the HPLC 2-methylquinoxaline peak area was not significantly altered, attesting that the internal standard does not decompose to methylglyoxal plus 1,2-diaminobenzene under the experimental conditions. Sub-stoichiometric amounts of MG have also been reported in the SSAO-catalyzed aerobic oxidation of AA to MG [33]. Low yields of the MG product are actually expected because MG, an α -oxoaldehyde, may undergo Schiff condensation with non-reacted AA to form pyrrole derivatives. Accordingly, Soares *et al.* [22] recently reported formation of a dipyrrole adduct of DAB with its oxidation product, under experimental conditions similar to those used with AA. By the way, covalent Schiff attachment of MG to cytochrome *c*, a lysine-rich protein, has been pointed out to have biological relevance [41,48].

AA does not Promote Structural Alterations in Cytochrome *c* and does not Affect the Heme Iron Coordination Sphere

Radical intermediates, H_2O_2 and MG formed by AA aerobic oxidation initiated by ferricyt *c* can potentially cause protein amino acid modifications, secondary and tertiary structural changes and heme degradation [14,49], eventually leading to partial protein denaturation and even alterations in biological functions. Electron transfer from AA to ferricyt *c* may proceed by an inner sphere

Figure 4. EPR spin-trapping studies and computer simulation of the AA system in the presence and absence of ferricyt c, under aerobic conditions. EPR spectra of DMPO-radical adducts were obtained after a 4-min incubation of (15 mM) AA at 25°C with (150 μ M) cyt c in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) with (400 mM) DMPO. (A) Experimental spectrum (trace a) and computer simulations (traces b-d) of the DMPO/AA system, (B) Experimental spectrum (trace a) and computer simulations of the DMPO/AA/cyt c system (traces b-e). Trace c in panels A and B represents the DMPO- $\cdot$ OH adduct spectrum, and trace d can be attributable to the DMPO-AA $\cdot$ adduct. Trace e in panel B represents an unknown DMPO adduct. Instrumental conditions: microwave power, 20.2 mW; modulation amplitude, 1.0; time constant, 1.63 s; scan rate 0.1 G/s; and receiver gain, 1.12×10^6 . doi:10.1371/journal.pone.0057790.g004

Figure 5. UV-Vis spectral changes in ferricyt *c* treated with AA. (A) UV-Vis spectral changes of the ferricyt *c* (10 μM)/AA (5.0 mM) system. The ferricyt *c* spectrum is shown by the solid line, and the ferricyt *c*/AA spectrum is shown by the dashed line. (B) Observed initial rates of the reduction of ferricyt *c* (50 μM) by AA (0.50–30 mM) monitored for 20 min. (C) Values of k_{obs} measured at increasing concentrations of AA to calculate the k_2 value. (D) The effect of cyt *c* concentration (5.0–100 μM) on the initial rate of AA (15 mM)-promoted ferricyt *c* reduction. (E) Temporal increase of the ferricyt *c* (50 μM) reduction by AA (1.0 mM) in the presence or absence of CuZnSOD (50 U/mL). All of the experiments ($n=3$) were performed in Chelex-treated 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C.
doi:10.1371/journal.pone.0057790.g005

mechanism involving aromatic amino acid residues of the protein [50–51]. However, both the Near-UV CD (Figure 6A) and the Far-UV CD spectra (Figure 6B) of ferricyt *c* in the presence of AA revealed no significant alterations in tertiary structure, the observed changes being only related to formation of ferrocyanide. Accordingly, the addition of ascorbate (5 μM) in the presence of ferricyt *c* resulted in similar Far and Near-UV spectra obtained for ferricyt *c* AA-treated samples. Worth to note, a significant increase (ca. 50%) of the fluorescence intensity (λ_{em} 340 nm, λ_{exc} 280 nm; $n=5$) assignable to Trp residue oxidation was observed after 4 h of ferricyt *c* (50 μM) treatment with AA (5.0 mM) (not shown). This might indicate that electron transfer from AA to ferricyt *c* proceeds by an inner sphere mechanism involving aromatic amino acid residues of the protein [48–49]. Accordingly, no protein oligomerization or fragmentation was detected by 24-h SDS-PAGE experiments with AA (1.0–5.0 mM)-treated ferricyt *c* (50 μM) (data not shown).

Given that the AA/ferricyt *c* system generates free radicals when oxidized by O₂ (Figure 3), direct EPR analysis at low temperature was also performed to investigate possible changes in the heme iron coordination sphere. The EPR spectrum of ferricyt *c* (Figure 7A) obtained before AA addition is assigned to the well-characterized low-spin form of ferricyt *c* with a rhombic structure, containing traces of oxidized prosthetic group [52]. The ferricyt *c* EPR spectrum, which was run successive times during incubation with AA, revealed only the loss of the heme iron signal, with no increase in the $g=4.3$ signal (Figure 7A). The experiment depicted in Figure 7B shows that AA (1.0 mM) promotes a total reduction

of the ferryl low-spin form in only 30 min of treatment. That ferricyt *c* (50 μM) is totally reduced to its ferrous form when incubated with AA (5.0 mM) at 37°C for 2 h was also confirmed by Raman spectroscopy studies, which exhibited initial and final acquired spectra that were identical to those reported for ferri- and ferrocyanide (not shown) [53]. Consistent with the results obtained by UV-visible spectroscopy (Figure 5B), an AA dose-dependent (1.0–5.0 mM) decrease in the iron EPR signal was observed (Figure 7B). However, the signals assigned to ferricyt *c* heme were not altered, which suggests no oxidative damage promoted by AA on the protein amino acid residues. Additional MCD and CD measurements in the wavelength region of heme absorption were also run for ferricyt *c* treated with AA and, again, resulted only in the typical ferrous heme protein signal without evidence of damage to the heme group or changes in its coordination sphere. Therefore, almost complete ferricyt *c* conversion to its ferro form by 1.0 mM AA was confirmed after 2 h of treatment (Figure 7CD), with no evidence of changes in the heme iron coordination sphere. The CD spectra of AA-treated ferricyt *c* predominantly result from the contribution of ferrous species and remnant non-reduced heme iron. With respect to the reduction mechanism of ferricyt *c* by AA, it might involve direct transfer by either an inner (coordination) or an outer (electrostatic interaction) sphere mechanism, or a transfer through the porphyrin or aromatic amino acid (Tyr, Trp) residues of the protein, similar to that long proposed by Wallace *et al.* [48] based on their study of oxyhemoglobin oxidation to methemoglobin, which was induced by several nucleophiles.

Figure 6. CD spectra of ferricyt *c* incubated with AA. (A) near UV, and (B) far CD spectra of (10 μM) ferricyt *c* treated with (5.0 mM) AA for 12 h. The thick black line in all of the spectra represents the ferricyt *c* control. Experimental conditions: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C. doi:10.1371/journal.pone.0057790.g006

Considering that ferricyt *c* may potentially acquire peroxidase activity when exposed to AA-generated reactive radicals and MG, the effect of AA on liposome-incorporated ferricyt *c* was investigated. Incubation of native ferricyt *c* with PC/PE/CL liposomes, a mimetic of the inner mitochondrial membrane, resulted in an increase in the MDA content, which was similar to previously reported data [54]. However, MDA production in the presence of AA-treated ferricyt *c* was significantly lower (approx.

2.5 times), thus eliminating possible gains of peroxidatic activity by the cytochrome *c*. This scenario was actually predicted based on the UV-Vis, EPR, MCD, and Raman spectra, which were indicative of no changes in the cytochrome *c* coordination sphere, a response that is clearly observed when the protein displays peroxidase activity.

Figure 7. Low-temperature EPR spectra of ferricyt c treated with AA. (A) EPR spectra of (300 μM) ferricyt c after a 12-h incubation with (1.0–5.0 mM) AA. (B) Time-response ERP spectra of ferricyt c treated with (1.0 mM) AA for 30 min. Incubation conditions: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C. (C) MCD spectra of ferricyt c in the presence of AA. The conditions are ferricyt c (40 μM) MCD spectrum before treatment with AA (thick line) and MCD ferricyt c spectrum after 12 h of (5.0 mM) AA treatment (thin line). (D) CD spectrum of ferricyt c treated with 5.0 mM AA. Incubation conditions: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C. doi:10.1371/journal.pone.0057790.g007

Discussion

Ferricyt c-induced oxidation of AA by O₂ (Figure 2) is shown here to be initiated by a one-electron transfer from AA to the heme Fe(III), yielding the resonance stabilized enoyl radical of AA, $\text{C}^{\bullet}\text{H}\text{NH}_2\text{CO}-\text{CH}_3 \leftrightarrow \text{CH}_2\text{NH}_2\text{CO}^{\bullet}-\text{CH}_3$ (AA[•]) (Eq. 3). Subsequent electron transfer from AA[•] to a second ferricyt c molecule yields the imineAA product ($\text{CHNHCO}-\text{CH}_3$) (Eq. 4), which can be hydrolyzed to form the MG and NH_4^+ ion (Eq. 6). This mechanism is analogous to that postulated by Castro *et al.* [55] to describe the mechanism of primary and secondary amine oxidations by ferriporphyrin complexes. These authors claimed that a -CHNH-amine moiety is essential for iron reduction. The most reactive amine studied was 2-amino-1-phenylethanone, an α-aminoketone similar to AA and ALA. No apparent rate constant of reduction of the Fe(III)porphyrin by 2-amino-1-phenylethanone in benzene was provided by the authors, who only described it as “too fast”. The extremely high reactivity of 2-amino-1-phenylethanone was attributed by the authors to its enolization and to the resulting highly stable enoyl radical, which could exhibit a higher binding constant to Fe^{2+} . In this regard, we note that the

H_2PO_4^- anion in phosphate buffer (pH 7.4) reportedly acts as a bifunctional catalyst of aldehyde and ketone enolization (Eq. 2), including isobutanol, ALA and AA, thus favoring AA oxidation [14–21].

Once formed, the AA[•] radical behaves similar to a semiquinone by undergoing dismutation (Eq. 5), transferring one electron to O₂ yielding O₂^{•-} radical (Eq. 7), and electron transfer to H₂O₂ rendering HO[•] radical (Haber-Weiss type reaction) (Eq. 11). A radical oxidation chain of AA propagated by superoxide and AA[•] could then take place (Eqs. 7 and 8). In contrast, in the absence of oxygen, the oxidation of AA by ferricyt c can still occur in two consecutive unielectronic steps, which would also generate imineAA (Eqs. 3–5), subsequently yielding MG by hydrolysis (Eq. 6), albeit at a much lower concentration than in the presence of air.

Accordingly, ferricyt c is shown here to increase the rate of oxygen consumption by AA (Figure 2) while being reduced to its ferro form toward oxygen depletion (Figure 4A–D). Iron reduction is also observed upon treatment of ferricyt c with millimolar AA under CuZnSOD addition (Figure 5E). AA could interact with the iron center simply by electrostatic attraction or by electron transfer

through the porphyrin or aromatic amino acid residues of the protein, starting from affinity binding [48].

Superoxide radical and H_2O_2 produced during the reaction do not promote changes in the ferricyt c heme coordination sphere (Figure 7A–D). The reaction of cytochrome c with peroxides reportedly leads to the conversion of heme iron to the ferryl high-spin form with rhombic symmetry, accompanied by bleaching of the Soret band [56]. However, in the present study, the heme group was preserved from oxidative damage in spite of the generation of H_2O_2 and free radicals. These data could be explained by the fact that an excess of AA keeps the heme in the reduced state, which prevents the conversion of heme iron to very reactive high valence states, ultimately leading to radical generation at the heme crevice and subsequent bleaching [53]. As previously described [52], when incorporated into PC/CL vesicles, ferricyt c alone promotes a discrete increase (approx. two-fold) in the MDA concentration, which is indicative of polyunsaturated fatty acid peroxidation, as compared to Fe(II)EDTA (sixty-fold). The addition of AA results in a concentration-dependent inhibition of MDA formation from vesicles (not shown).

These data are consistent with the hypothesis that AA can reduce and maintain ferricyt c in the ferro form, hindering protein redox cycling and bleaching. Data obtained from CD, UV-Vis absorption and Raman studies indicated that AA does not alter the cytochrome secondary and tertiary structure (Figure 6AB) and does not promote oxidative damage to the amino acid residues, although putative Trp fluorescence changes has been observed. In turn, the EPR studies conducted at a low temperature confirmed the total reduction of ferricyt c , with no structural changes that might impair the spectral properties of the Fe^{2+} -heme (Figure 7AB). Further investigation is needed to determine whether cytochrome is modified in the course of this reaction to an as yet non-described form, with a gain or loss of a new function.

Biological Implications

AA [14], similar to dihydroxyacetone phosphate [57], ALA [45], DAB [22] and glucosamines [58], undergoes superoxide-propagated oxidation to an α -oxoaldehyde and H_2O_2 , both of which are known to be reactive species implicated in normal and adverse biological events. Methylglyoxal, the oxidation product of AA, was found to be approximately 7 fold and 6 fold higher in the plasma of type 1 and type 2 diabetes patients, respectively, than in normal individuals (96.3 ± 9.5 nM) [59] and was identified as an apoptotic inductor [60]. Although detected in biological samples at sub-micromolar concentrations, MG is currently recognized as a strong electrophile that can form advanced glycation end products (AGEs) when reacting with various proteins and enzymes, and ethane adducts with nucleobases [11]. Chemical modifications of glycolytic enzymes such as aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [61] have been credited to MG. It has also been found to depress reduced glutathione in cultures of rat hepatocytes [62], possibly via inhibition of glutathione reductase [63] and glutathione peroxidase [64], and to induce cellular

swelling and apoptosis of pancreatic β -cells [65,66]. Furthermore, MG reportedly produces free radicals during the glycation of amino acids, including alanine [67], and superoxide radicals from its reaction with guanidine compounds [68].

On the other hand, H_2O_2 was related to the development of diabetes [69] and to the impairment of glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic islets in female albino rats [70]. In addition, elevated iron and copper ion concentrations were reported to occur in the plasma of type II diabetics [1], probably released by metal storage proteins such as ferritin and ceruloplasmin, respectively.

Considering that (i) threonine and glycine catabolism have been evoked as a source of AA [71] and $\sim 10\%$ of methylglyoxal production [29,72], (ii) rat liver threonine dehydrogenase appears to be involved in 87% of the degradation of hepatic threonine [29], (iii) mitochondrial threonine dehydrogenase appears to be linked to aminoacetone synthetase [73], (iv) the enol form predominates over the keto form in tautomeric equilibrium of carbonyl compounds in aprotic media [21], and (v) AA is reportedly synthesized in the mitochondrial matrix [14], it is conceivable that enolAA diffuses across the lipid phase of the inner mitochondrial membrane and reaches cytochrome c at the outer side, leading to the heme protein oxidative injury.

Conclusions

AA, a putative threonine and glycine catabolite reportedly overproduced in diabetes, is shown here to reduce ferricyt c directly to the ferro form *in vitro* in both anaerobic and aerobic conditions. Two one-electron transfer steps from AA to ferricyt c afford methylglyoxal imine (iminoAA), for which hydrolysis yields MG and NH_4^+ ions. In the presence of molecular oxygen, the conversion of AA to MG is propagated by $\text{O}_2^{\cdot-}$ and enolAA $^{\cdot}$ radicals, leading to the formation of H_2O_2 as well. Although they are known as highly reactive catabolites, MG and H_2O_2 do not cause cytochrome c heme destruction and do not significantly affect the protein's secondary and tertiary structure. If it were to occur in diabetics, the direct reduction of cytochrome c by excess AA might contribute to the impairment of mitochondrial functions by inhibiting key enzymes, interfering in ATP synthesis, and participating in apoptotic death.

Acknowledgments

We thank Prof. Márcia L.A. Temperini and Dr. Celly M. S. Izumi for running the Raman experiments, and Prof. Henrique E. Toma and Dr. Paulo Martins for the cyclic voltammetry analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS ILN ORN EJHB CMM. Performed the experiments: AS ORN CMM MCM JM RT FHD. Analyzed the data: AS EJHB ORN ILN. Contributed reagents/materials/analysis tools: EJHB ORN. Wrote the paper: AS EJHB ILN.

References

- Brewer GJ (2010) Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Chem Res Toxicol* 15: 319–326.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, et al. (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 13: 361–366.
- Toledo JC Jr, Augusto O (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 25: 975–989.
- Ellis EM (2007) Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 115: 13–24.
- Duran-Jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, et al. (2009) Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes* 58: 2893–2903.
- Banach MS, Dong Q, O'Brien PJ (2009) Hepatocyte cytotoxicity induced by hydroperoxide (oxidative stress model) or glyoxal (carbonylation model): prevention by bioactive nut extracts or catechins. *Chem Biol Interact* 178: 324–331.
- Singh M, Murthy V, Ramassamy C (2010) Modulation of hydrogen peroxide and acrolein-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunctions and redox regulated pathways by the *Bacopa monniera* extract: potential implication in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 21: 229–247.

8. LoPachin RM, Gavin T, Petersen DR, Barber DS (2009) Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chem Res Toxicol* 22: 1499–1508.
9. Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, et al. (2008) Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 28: 871–878.
10. Kalapos MP (2008) Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. *Drug Metabol Drug Interact* 23: 69–91.
11. Kalapos MP (1999) Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 110: 145–175.
12. Ahmed N, Thornalley PJ (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab* 9: 233–245.
13. Krautwald M, Münch G (2010) Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Exp Gerontol* 45: 744–751.
14. Dutra F, Knudsen FS, Curi D, Bechara EJH (2001) Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem Res Toxicol* 14: 1323–1329.
15. O'Sullivan J, Unzeta M, Healy J, O'Sullivan MI, Davey G, et al. (2004) Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *Neurotoxicology* 25: 303–315.
16. Göktürk C, Garpenstrand H, Nilsson J, Nordquist J, Örelund L, et al. (2003) Studies on semicarbazide-sensitive amine oxidase in patients with diabetes mellitus and in transgenic mice. *Biochim Biophys Acta* 1647: 88–91.
17. Dutra F, Araki D, Bechara EJH (2003) Aminoacetone induces loss of ferritin ferroxidase and iron uptake activities. *Free Rad Res* 37: 1113–1121.
18. Dutra F, Ciriolo MR, Calabrese L, Bechara EJH (2005) Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. *Chem Res Toxicol* 18: 755–605.
19. Dutra F, Bechara EJ (2004) Aminoacetone induces iron-mediated oxidative damage to isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 430: 284–289.
20. Sartori A, Garay-Malpartida HM, Forni MF, Schumacher RI, Dutra F, et al. (2008) Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5F cells. *Chem Res Toxicol* 21: 1841–50.
21. Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, Sartori A, Olympio KP, et al. (2007) The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp. Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146: 88–110.
22. Soares CO, Alves MJM, Bechara EJH (2011) 1,4-Diamino-2-butanone, a wide-spectrum microbicide, yields reactive species by metal-catalyzed oxidation. *Free Radic Biol Med* 50: 1760–1770.
23. Soares CO, Colli W, Bechara EJH, Alves MJM (2012) 1,4-Diamino-2-butanone, a putrescine analogue, promotes redox imbalance in *Trypanosoma cruzi* and mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 528: 103–110.
24. Bertini I, Cavallaro G, Rosato A (2006) Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem Rev* 106: 90–115.
25. Davison AJ, Gee P (1984) Redox state of cytochrome c in the presence of the 6-hydroxydopamine/oxygen couple: oscillations dependent on the presence of hydrogen peroxide or superoxide. *Arch Biochem Biophys* 233: 761–771.
26. Cilento G, Adam W (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radic Biol Med* 19: 103–114.
27. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049–6055.
28. Garcia-Roves PM (2011) Mitochondrial pathophysiology and type 2 diabetes mellitus. *Arch Physiol Biochem* 117: 177–187.
29. Bird MI, Nunn PB, Lord LA (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 802: 229–236.
30. Kalapos MP (2012) Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res Clin Pract* Nov. 30. doi: S0168-8227(12)00426-3. 10.1016 [Epub ahead of print].
31. Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 30: 535–543.
32. Hepworth JD (1976) Aminoacetone semicarbazone hydrochloride. *Org Synth* 45: 1–2.
33. Stoll S, Schweiger A (2007) EasySpin: Simulating cw ESR spectra. *Biol Magn Reson* 27: 299–321.
34. Deng Y, Yu PH (1999) Assessment of the deamination of aminoacetone, an endogenous substrate for semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Anal Biochem* 270: 97–102.
35. Monteiro HP, Abdalla DS, Augusto O, Bechara EJ (1989) Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autooxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys* 271: 206–216.
36. Buettner GR (1987) Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic Biol Med* 3: 259–303.
37. Britigan BE, Roeder TL, Buettner GR (1991) Spin traps inhibit formation of hydrogen peroxide via the dismutation of superoxide: implication for spin trapping of hydroxyl radical. *Biochim Biophys Acta* 1075: 213–222.
38. Shang Y, Chen C, Li Y, Zhao J, Zhu T (2012) Hydroxyl radical generation mechanism during the redox cycling process of 1,4-naphthoquinone. *Environ Sci Technol* 46: 2935–2942.
39. Hanna PM, Kadiiska MB, Mason RP (1992) Oxygen-derived free-radical and active oxygen complex-formation from cobalt (II) chelates in vitro. *Chem Res Toxicol* 5: 109–115.
40. Liotti FS, Menghini AR, Guerrieri P, Bianchi R (1989) Effects of dimethylsulfoxide on Friend erythroleukemic cell proliferation and on the activity of enzymes involved in this process. *Int J Cancer* 43: 1145–1148.
41. Giulivi C, Boveris A, Cadenas E (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 316: 909–916.
42. Burkitt MJ, Mason RP (1991) Direct evidence for in vivo hydroxyl-radical generation in experimental iron overload: an ESR spin-trapping investigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8440–8444.
43. Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO (1998) Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem* 273: 25272–25278.
44. Yamazaki I (1993) Hydroxyl radical formation in biological systems. *Quim Nova* 16: 365–369.
45. Baader WJ, Bohne C, Cilento G, Dunford HB (1985) Peroxidase-catalyzed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. *J Biol Chem* 260: 10217–10225.
46. Wood PM (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem J* 253: 287–289.
47. Rocha ME, Ferreira AM, Bechara EJ (2000) Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radic Biol Med* 2: 1272–1279.
48. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CA, Thornalley PJ (2002) Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N-epsilon-carboxymethyl-lysine- and N-epsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J* 364: 1–14.
49. Kapralov AA, Kumikov IV, Vlasova II, Belikova NA, Tyurin VA, et al. (2007) The hierarchy of structural transitions induced in cytochrome c by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells. *Biochemistry* 46: 14232–14244.
50. Wallace JW, Houtchens RA, Maxwell JC, Caughy WS (1982) Mechanism of autoxidation for hemoglobins and myoglobins. *J Biol Chem* 257: 4966–4977.
51. Rinaldi TA, Tersariol IL, Dyszy FH, Prado FM, Nascimento OR, et al. (2004) Protonation of two adjacent tyrosine residues influences the reduction of cytochrome c by diphenylacetaldehyde: a possible mechanism to select the reducer agent of heme iron. *Free Radic Biol Med* 36: 802–810.
52. Esteve ML, Nascimento OR, Baptista MS, Di Mascio P, Prado FM, et al. (2004) Changes in the spin state and reactivity of cytochrome C induced by photochemically generated singlet oxygen and free radicals. *J Biol Chem* 279: 39214–39222.
53. Mugnol KC, Ando RA, Nagayasu RY, Faljoni-Alario A, Brochstein S, et al. (2008) Spectroscopic, structural, and functional characterization of the alternative low-spin state of horse heart cytochrome C. *Biophys J* 94: 4066–4077.
54. Rodrigues T, de França LP, Kawai C, de Faria PA, Mugnol KC, et al. (2007) Protective role of mitochondrial unsaturated lipids on the preservation of the apoptotic ability of cytochrome C exposed to singlet oxygen. *J Biol Chem* 282: 25577–25587.
55. Castro CE, Jamin M, Yokoyama W, Wade R (1986) Ligation and reduction of iron (III) porphyrins by amines. A model for cytochrome c P-450 monoamine oxidase. *J Am Chem Soc* 108: 4179–4187.
56. Nantes IL, Faljoni-Alario A, Nascimento OR, Bandy B, Gatti R, et al. (2000) Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome c by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radic Biol Med* 28: 786–796.
57. Mashino T, Fridovich I (1987) Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Arch Biochem Biophys* 254: 547–551.
58. Hiraku Y, Kawanishi S (1999) Involvement of oxidative DNA damage and apoptosis in antitumor actions of aminosugars. *Free Radic Res* 31: 389–403.
59. Fleming T, Cuny J, Nawroth G, Djuric Z, Humpert PM, et al. (2012) Is diabetes an acquired disorder of reactive glucose metabolites and their intermediates? *Diabetologia* 55: 1151–1155.
60. Chan WH, Wu HJ (2008) Methylglyoxal and high glucose co-treatment induces apoptosis or necrosis in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biochem* 103: 1144–1157.
61. Leoncini G, Maresca M, Bonsignore A (1980) The effect of methylglyoxal on the glycolytic enzymes. *FEBS Lett* 117: 17–18.
62. Kalapos MP, Garzó T, Antoni F, Mandl J (1991) Effect of methylglyoxal on glucose formation, drug oxidation and glutathione content in isolated murine hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1092: 284–290.
63. Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Vander Jagt TJ, Gomez MS, Gonzales DM, et al. (1997) Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem Pharmacol* 53: 1133–1140.
64. Park YS, Koh YH, Takahashi M, Miyamoto Y, Suzuki K, et al. (2003) Identification of the binding site of methylglyoxal on glutathione peroxidase: methylglyoxal inhibits glutathione peroxidase activity via binding to glutathione binding sites Arg 184 and 185. *Free Radic Res* 37: 205–211.
65. Best L, Miley HE, Brown PD, Cook LJ (1999) Methylglyoxal causes swelling and activation of a volume-sensitive anion conductance in rat pancreatic beta-cells. *J Membr Biol* 167: 65–71.

66. Sheader EA, Benson RS, Best L (2001) Cytotoxic action of methylglyoxal on insulin-secreting cell. *Biochem Pharmacol* 61: 1331–1336.
67. Yim HS, Kang SO, Hah YC, Chock PB, Yim MB (1995) Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein-cross-linked free radicals. *J Biol Chem* 270: 28228–28233.
68. Nohara Y, Usui T, Kinoshita T, Watanabe M (2002) Generation of superoxide anions during the reaction of guanidino compounds with methylglyoxal. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 50: 179–184.
69. Chen L, Na R, Gu M, Salmon AB, Liu Y, et al. (2008) Reduction of mitochondrial H₂O₂ by overexpressing peroxiredoxin 3 improves glucose tolerance in mice. *Aging Cell* 7: 866–78.
70. Rebelato E, Abdulkader F, Curi R, Carpinelli AR (2010) Low doses of hydrogen peroxide impair glucose-stimulated insulin secretion via inhibition of glucose metabolism and intracellular calcium oscillations. *Metabolism* 59: 409–13.
71. Guerranti R, Pagani R, Neri S, Errico SV, Leoncini R, et al. (2001) Inhibition and regulation of rat liver L-threonine dehydrogenase by different fatty acids and their derivatives. *Biochim Biophys Acta* 1568: 45–52.
72. Kalapos MP (1992) Mechanisms leading to complications in diabetes mellitus: Pathological role of α -oxoaldehydes. *Biochem Educ* 20: 27–29.
73. House JD, Hall BN, Brosnan JT (2001) Threonine metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1300–E1307.

ANEXO E. PARTICIPAÇÃO NO ARTIGO: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins

<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20130248>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 24, No. 12, 1983-1990, 2013.
Printed in Brazil - ©2013 Sociedade Brasileira de Química
0103 - 5053 \$6.00+0.00

Article

Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins

*Atecla N. L. Alves,^a Leticia D. L. Jedlicka,^b Júlio Massari,^c Maria A. Juliano,^d
Etelvino J. H. Bechara^{a,c} and Nilson A. Assunção^{*a,b}*

^a*Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 09972-270 Diadema-SP, Brazil*

^b*Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 04023-062 São Paulo-SP, Brazil*

^c*Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-890 São Paulo-SP, Brazil*

^d*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo-SP, Brazil*

Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins

Atecla N. L. Alves,^a Leticia D. L. Jedlicka,^b Júlio Massari,^c Maria A. Juliano,^d
Etelvino J. H. Bechara^{a,c} and Nilson A. Assunção^{*a,b}

^aInstituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, 09972-270 Diadema-SP, Brazil

^bEscola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 04023-062 São Paulo-SP, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-890 São Paulo-SP, Brazil

^dDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo-SP, Brazil

Recentemente nosso grupo demonstrou experimentalmente que a hipótese de produção de radical acetil em meio tamponado no sistema diacetil/peroxinitrito era possível. Diacetil é um flavorizante em alimentos, cigarros e bebidas. O peroxinitrito é encontrado na mitocôndria, e em certas condições como um processo de infecção em humanos, a concentração aumenta significativamente. Em sistemas biológicos, radicais podem facilmente modificar a estrutura e atividade de ácidos nucleicos, proteínas e outras biomoléculas, causando significativo estresse oxidativo. Baseado em dados de ressonância magnética e espectrometria de massas, este artigo apresenta os produtos que provam a produção do radical acetil e a formação de compostos estáveis devido à ligação covalente entre o acetil e os aminoácidos (produtos acetilados), e os adutos de peptídeos e proteínas. Estes materiais foram separados por eletroforese capilar e identificados por espectrometria de massas. O meio reacional consistiu da mistura de diacetil e peroxinitrito em uma relação de 1:2 e em 20 mmol L⁻¹ de fosfato de sódio, no valor de pH 7,2. Estes experimentos também revelam a dupla acetilação da lisina, demonstrando a alta reatividade do composto com biomoléculas contendo grupos de nitrogênio, abundantemente encontradas em sistemas biológicos. A mudança estrutural de uma molécula acetilada é uma fonte de modificações pós-tradução com inúmeras consequências biológicas.

Recently, our group proposed a process that generated acetyl radicals in a reaction medium buffered with a diacetyl/peroxynitrite system. Diacetyl is a flavoring agent in food, cigarettes and drinks. Peroxynitrite is found in mitochondria, and in certain conditions, such as an infection in humans, its concentration is augmented significantly. In biological systems, radical compounds can easily modify the structure and activity of nucleic acids, proteins and other biomolecules, causing significant oxidative stress. Based on paramagnetic resonance and mass spectrometry data, this work discusses products that prove acetyl radicals are produced and are able to form stable covalent bonds with amino acid (acetylated products), peptide and protein adducts. These materials were separated and detected by capillary electrophoresis coupled with tandem mass spectrometry or offline mass spectrometry. The reaction medium contained a 1:2 mixture of diacetyl and peroxynitrite dissolved in 200 mmol L⁻¹ of pH 7.2 sodium phosphate buffer. These experiments also reveal the double acetylation of lysine, demonstrating the high reactivity of these compounds when in contact with nitrogen-containing biomolecules readily found in biological systems. These structural changes might be an epigenetic source of post-translational protein modification.

Keywords: acetylation of biomolecules, acetyl radical, peroxynitrite, diacetyl, mass spectrometry, CE/ESI-MS/MS

*e-mail: nilson.assuncao@unifesp.br

Introduction

Mass spectrometry (MS) is an important technique in the post genomic era because it can rapidly and reliably investigate the relationship between the genome and phenotype of cells and organisms.¹ Understanding the gene expression and protein states in living systems requires quantitative *in vitro* and *in vivo* studies of substrates, intermediates and products.² The modification of proteins by chemical reactions involving compounds released through distinct metabolic pathways may lead to deleterious results.³ Therefore, post-translational modification (PTM),⁴ which is undoubtedly the most widely studied enzyme-catalyzed modification event in proteins, and other non-enzymatic processes can be investigated using capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (CE-ESI-MS).^{5,6}

ESI-MS is a powerful tool for analyzing the plethora of intermediate and final products in biological samples.⁷ Generally, CE-MS is successful platform for revealing the physiological and pathological biomarkers in various body fluids. In addition to defining biomarker analytical data, such as migration time and molecular mass, CE-MS is an indispensable tool for gaining deeper insight into the molecular mechanisms underlying the manifestation of several acquired and inborn errors in metabolism. While CE provides high resolution and fast separation during analysis, MS offers selectivity and sensitivity, making the combined CE-ESI-MS a very effective analytical tool.^{8,9} Furthermore, capillary electrophoresis belongs to a category of analytical separation techniques that produces minimal residue.

Lysine acetylation is a reversible post-translational modification involved in various biochemical processes in an organism; an acetyl group is transferred to an internal lysine residue ϵ -amino group in a protein. The acetylation process in histones has been known for almost 30 years. Enzymes that regulate these acetylation processes in non-histone proteins have recently been discovered to play a crucial role in biological events.¹⁰⁻¹² These enzymes contain flexible and highly basic tails that are targeted by several types of post-translational modification reactions, including methylation, citrullination, phosphorylation,¹³ sumoylation, ubiquitination, ADP-ribosylation,^{14,15} acetylation and glycation.¹⁶

The significance of lysine acetylation has been exhaustively studied in the context of nuclear histone modifications. However, the implications of the changes transcend gene regulation.¹⁷ The molecular changes caused by lysine acetylation in an organism may alter the activity of metabolic enzymes and force the cell to adapt to metabolic changes. These alterations may

cause unanticipated changes that may alter an individual metabolic profile.^{18,19} Recently, Zhang *et al.*²⁰ demonstrated epigenetic chromatin process for remodeling of histone proteins by acetylation. This process was diagnostic for late-onset cognitive impairment. Histone acetylation affects the regulation of gene transcription. The loss of learning induced by deacetylation in specific histone sites may provide biomarkers for memory loss and Alzheimer's disease.

Nearly a decade ago, Oya *et al.*²¹ reported the modification of bovine serum albumin (BSA) by methylglyoxal, resulting in arginine/methylglyoxal adducts and structural changes in BSA. This compound is a well-known α -dicarbonyl catabolite derived from triose phosphates, acetone and aminoacetone that has cyto and genotoxic effects. Diacetyl produces acetyl radicals after treatment with peroxynitrite, which is a powerful nucleophile and oxidant formed by the diffusion-controlled reaction between superoxide radical anions and nitric oxide in biological systems.²² Diacetyl is a flavoring agent used in food (milk, coffee, tea, beef, butter, yogurt and alcoholic drinks) at concentrations ranging from 0.5 to 28 nmol L⁻¹.²³⁻²⁶ Diacetyl is a volatile product of citrate metabolism produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. In the USA, diacetyl-based ingredients are generally considered safe, although their use in food products is limited by good manufacturing practices. Diacetyl has recently been implicated as a causative agent for certain lung diseases among plant workers. However, little information has been published regarding the volatile composition of this ingredient and the levels of diacetyl or other flavoring agents in finished dairy products. A detailed review of the literature on this topic reveals few studies regarding biological samples and their biochemical implications.²⁷

Otsuka *et al.*²⁸ developed a method to determine the diacetyl concentration using gas chromatography with electron capture detection. Using this method, diacetyl was detected in different rat tissues (liver, heart, kidney, muscle, brain and liver).²⁹ The most important finding was that diacetyl influences several aspects of amyloid- β (A β) peptide aggregation. The process is one of the two primary pathologies associated with Alzheimer's disease.²³

In biological systems, nitric oxide reacts with the superoxide anion, producing peroxynitrite (OONO^-) extremely rapidly (k_2 ca. $7\text{--}20 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ at 25–37 °C).^{30,31} This rate constant is almost one order of magnitude higher than that of the superoxide dismutase-catalyzed decomposition of the superoxide radical ion. In living organisms, the simultaneous formation of nitric oxide and superoxide radicals is often observed in the

presence of high peroxynitrite concentrations, particularly in endothelial cells and near inflammatory sites.³² Therefore, the evaluation of peroxynitrite reactivity toward various biomolecules is highly relevant. Peroxynitrous acid (HOONO) has a pK_a of 6.8, meaning that 80% of it is deprotonated in the biological environment.³³ The combined presence of peroxynitrite and exogenous diacetyl or endogenous methylglyoxal in a slightly alkaline physiological cellular medium creates the perfect conditions for producing acetyl radicals that may chemically alter biomolecules.^{10,11}

We report a method that uses capillary electrophoresis-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (CE-ESI-MS/MS) or only ESI-MS coupled to an ion trap mass analyzer to separate and identify 20 acetylated amino acids, peptides and proteins digested by acetylation generated from a diacetyl/peroxynitrite system. Consequently, concomitantly with the transacetylase-catalyzed reaction, the diacetyl/peroxynitrite system may acetylate proteins (*N*-terminal and chain lysine residues) and nucleobases. We propose that similar analytical conditions might be employed to identify acetylated free amino acids or proteins exposed to diacetyl and peroxynitrate *in vitro*.

Experimental

Reagents and solvents

The chemicals used were analytical grade. Diacetyl, formic acid, phosphoric acid, ammonium formate, sodium tetraborate, sodium nitrite, Chelex-100, 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP), amino acids (L-Gly, L-Ala, L-Val, L-Leu, L-Ile, L-Met, L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Ser, L-Pro, L-Thr, L-Cys, L-Asn, L-Gln, L-Lys, L-His, L-arg, L-Asp and L-Glu) and proteins were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol, ammonium hydroxide, acetic acid, hydrochloric acid, sodium carbonate, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate decahydrate and sodium phosphate monobasic monohydrate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The peptides and peroxynitrite were synthesized in our laboratory.

Synthesis of peroxynitrite

Peroxynitrite was synthesized from NaNO_2 (0.6 mol L^{-1}) and H_2O_2 (0.7 mol L^{-1}) in HCl (0.6 mol L^{-1}) and NaOH (1.5 mol L^{-1}) in a quench-flow reactor.³⁴ Excess H_2O_2 in the alkali peroxynitrite solution was eliminated with MnO_2 . The H_2O_2 and peroxynitrite concentrations were quantified spectrophotometrically at 240 nm

($\epsilon = 42 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively. The peroxynitrite concentrations obtained using this method ranged from 250 to 350 mmol L^{-1} . The stock solutions of peroxynitrite were stored on ice in the dark. Aliquots were stored at -80°C . Diacetyl was distilled before use at 88 to 90 $^\circ\text{C}$ and 40 rpm. All the solutions were prepared in distilled water prepared in a Millipore Milli-Q system (MA, USA), and the phosphate buffer (200 mmol L^{-1} , pH 7.2) was pretreated with Chelex-100 to eliminate any metal contaminants. Excess hydrogen peroxide in the peroxynitrite-containing alkaline solution ($1.0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$) was eliminated with MnO_2 . Amino acid stock solutions were prepared in deionized water obtained from a Millipore Milli-Q system (MA, USA), and the buffers were pretreated with Chelex 100 to eliminate any free metals in solution. A diacetyl (50 mmol L^{-1}) stock solution was prepared in a 200 mmol L^{-1} phosphate buffer. The radical acetylation reactions involved mixing peroxynitrite (2.0 mmol L^{-1}), diacetyl (2.0 mmol L^{-1}) and amino acid (1.0 mmol L^{-1}) in a phosphate buffer solution (200 mmol L^{-1} , pH 7.4) under constant Vortex agitation for 1 min to maintain the dissolved oxygen concentration at a saturated and non-limiting level. Reaction mixtures with pH values ranging from 7.1 to 7.5 were analyzed.

The reaction between peroxynitrite and α -dicarbonyl substrates, such as diacetyl ($k_2 = 1.4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.2, 25°C), proceeded faster than reactions with monocarbonyl substrates (e.g., $k_2 < 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for acetaldehyde, propionaldehyde, and pyruvate).³⁵ Uppu *et al.*³⁶ reported that low yields of carboxylic acids were formed when aldehydes were exposed to peroxynitrite (ca. 0.2 mol acetate *per mol* peroxynitrite), while Yang *et al.*³⁵ demonstrated that carboxylic fragments formed in reactions between various ketones and peroxynitrite.

Synthesis and purification of synthetic peptides

A peptide was synthesized with the following sequence: Ac-A-E-F-K-F-A-L- NH_2 . This peptide was constructed to contain a lysine residue. The peptide was synthesized according to the following protocol. The peptide was obtained using solid phase synthesis, as described by Hirata *et al.*³⁷ and reviewed by Korkmaz *et al.*³⁸ Specifically, Fmoc chemistry (9-fluorenylmethoxycarbonyl) was used to protect the α -amino group, while NovaSyn TGR[®] resin and HBTU / HOBt were the solid support and coupling reagents, respectively. The Fmoc group was removed using *N*-methyl-20% piperidine in dimethylformamide, and the peptide was cleaved from the resin using trifluoroacetic acid: anisole:ethanedithiol:water (TFA:ANS:EDT: H_2O /85:5:3:7).

The synthesized peptides were characterized and assayed for purity using fast high performance liquid chromatography (fast HPLC) coupled to mass spectrometry (EVL/MS-2020 - Prominence; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan or /MS EV-2020 - Prominence; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan), equipped with a LC-10AD pump for the fast mobile phase, a Fast XR-ODS column (5 μ m, 4.6 $\times$ 75 mm), SPD-10AV UV-Vis detector operating at wavelength of 220 nm, as well as by electrospray ionization mass spectrometry or matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in a Bruker Daltonics MALDI-TOF mass spectrometer. The matrix used during all the analyses was α -cyano-4-hydroxycinnamic acid.

Preparation of samples

The reaction mixture consisted of BSA (68.4 μ mol L⁻¹), diacetyl (5.0 mmol L⁻¹) and peroxyxynitrite (1.3 mmol L⁻¹) in 200 mmol L⁻¹ pH 7.2 phosphate buffer at room temperature. MALDI studies of the RNase and lysozyme were carried out with the protein alone and protein treated with either peroxyxynitrite, diacetyl, or both reagents without trypsinization. The reaction mixture was ultrafiltered (Vivaspin MWCO 3000, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) and lyophilized; subsequently, the product was rehydrated with 50 μ L of 0.1% TFA.

Digestion of samples

The protocol for lysozyme digestion was the classical procedure used for proteomic studies.³⁹ After the reaction and desalinization via ultra-filtration, the volume of the lysozyme and acetylated lysozyme 0.04 mg mL⁻¹ solutions was halved. 100 μ L corresponded to 80 μ g and was diluted in 100 μ L methanol *per* 50 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ solution at pH 8.0, (60/40 v/v) in a 1.5 ml screw cap tube for 5 min at 95 °C in an Eppendorf Thermomixer (Germany) at 600 rpm. This step broke down the protein 3D structure, facilitating the enzymatic action. The mixture was cooled to room temperature before 100 μ L of 10 mmol L⁻¹ DTT were added and incubated for 30 min at 37 °C. This reagent reduced the protein disulfide bonds. Afterward, 100 μ L of 20 mmol L⁻¹ iodoacetic acid were added, and the mixture was incubated at room temperature in the dark to promote the alkylation of the cysteine residues. Trypsin was dissolved in 50 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ at pH 8.0 to reach 5 μ g mL⁻¹, and 100 μ L of this solution were added to the reaction tube; the reaction tube was placed in the thermomixer and vortexed for 20 h at 37 °C in the dark. To end the enzymatic reaction, 56 μ L of 0.1% TFA were added.

Purification of acetylated peptide

A homemade zip-tip C18 purification column was assembled in a 200 μ L micropipette tip with a small amount of glass fiber inserted into the tip to hold 50 μ L 100 mg mL⁻¹ C18 reversed-phase resin in isopropyl alcohol.⁴⁰ The resin was flushed with 100 μ L methanol to activate the solid support and 100 μ L 0.05% of TFA for equilibration. A 100 μ L sample was added, and 100 μ L of 0.05% TFA were eluted. Finally, 100 μ L of 80% ACN solution with 0.05% TFA were passed through the column to elute the peptides. The samples were lyophilized and rehydrated using 50 μ L of 0.1% TFA.

Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping spectra with 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP) were recorded at room temperature, using a Bruker EMX spectrometer (Bruker AXS Inc., Madison, USA). All spectra were recorded after incubating the reagents for 4 min in 500 mmol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.2). At the end of the experiment, the pH was measured to detect any changes caused by adding the alkaline peroxyxynitrite stock solutions to the buffered reaction mixtures. The following instrumental conditions were utilized: microwave power of 19.91 mW, modulation amplitude of 0.1 mT, time constant of 163,840 ms and receiver gain of 2.5×10^3 .

The separation and detection of amino acids in all completed reaction mixtures were performed with a Beckman Coulter MDQTM capillary system (California, USA) and a Thermo Finnigan model LCQ Ion Max Advanced mass spectrometer equipped with an ESI source and an ion trap analyzer (MA, USA). Electrophoresis was carried out in fused silica capillaries from Polymicro Technologies (AZ, USA) with 50 μ m i.d. $\times$ 70 cm total length. The electrolyte used during the CE/ESI-MS analyses was 1.0 mol L⁻¹ formic acid. Before injection, the capillary was preconditioned by flushing with 1.0 mol L⁻¹ ammonium hydroxide for 3 min, followed by water for 2 min, and finally, the electrolyte for 5 min. The samples were injected under 2.0 psi for 10 s. The effective applied electric field was 280 V cm⁻¹, the capillary temperature was maintained at 25 °C, and the sheath flow interface was used. The 50.0:49.5:0.5 water/methanol/acetic acid solution was delivered at 10 μ L min⁻¹ by a Gilson Model 402 Pump (MI, USA). The MS and MS/MS experiments were performed in positive ion mode at 4.5 kV. This voltage was previously evaluated; although this value may seem high, this was the best value to analyze amino acids because the CE-MS system potential combines that of the ESI and CE systems. The experimental conditions were as follows: number of microscans = 3, microscan time = 200 ms, capillary temperature at 275 °C, spray voltage of 27 V and tube lens

offset of -8 V. The mass spectrometer was calibrated using $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ L-Lysine directly infused into the CE under 10 psi. The data acquisition was performed in full scan and MS/MS scan modes by examining the most intense peaks; the normalized collision energy and the isolation width were set to 30–35% and $1.0 m/z$, respectively for these peaks in the MS/MS. The minimum signal intensity threshold was 1×10^3 while the MS/MS data were collected. Nitrogen was used as both the nebulizer and sweep gas and was delivered at flow rates of 15 and 5 L min^{-1} , respectively.

The micro-HPLC-MS/MS (AmaZon Ion Trap (Bruker-Franzen Analytic GmbH) analysis of protein digests was carried out with a Shimadzu micro liquid chromatograph (Kyoto, Japan), and the data were processed using the Mascot 2.3 program peptide sequences. Chromatography was performed using a Shim-pack XR-ODS II column at 0.2 mL min^{-1} with a 5 min gradient time, 70% of solvent A (20/79.9/0.1 acetonitrile/water/acetic acid v/v) and 30% of solvent B (79.9/20/0.1 acetonitrile/water/ acetic acid v/v), 30–50% B in 20 min and 90% of B in 80 min, for a total analysis time of 100 min. The mass spectrometer was optimized for 70–3000 m/z , with a 4.5 kV positive polarity, a 300–2800 m/z trap scan speed, a 4500 V capillary voltage, 8.0 psi nebulizer gas, 5.0 L min^{-1} dry gas, a 220°C heater interface temperature, and MS/MS with a 5.0 eV quadrupole ion energy. Smart Defrag was used to obtain satisfactory MS/MS data from the different compounds with varying stabilities. This technique ramps up the fragmentation amplitude from 20% at the start amplitude by 30 to reach 300% of the specified value. A $-\text{CH}_3\text{CO}^+$ adduct was obtained for a MNP solution containing peroxynitrite (2.0 mmol L^{-1}) and diacetyl (2.0 mmol L^{-1}) in phosphate buffer (200 mmol L^{-1} , pH 7.4) (Figure 1).

Results and Discussion

The hypothesis that the acetyl radical produced by adding peroxynitrite to diacetyl is consumed by amino acids was first investigated using EPR spin-trapping studies with MNP (20 mmol L^{-1}) and L-histidine (0.50 and 1.0 mmol L^{-1}).^{10,11} A three-line EPR spectrum with $a_{\text{H}} = a_{\text{N}} = 0.83 \text{ mT}$ characteristic of the MNP was collected.

The radical adduct signal decreased as the concentrations of L-histidine increased, indicating that the acetyl radical was consumed by the L-histidine. Figures 2a, 2b and 2c depict the CE-ESI-MS traces obtained after adding free L-lysine to the diacetyl/peroxynitrite solutions that produced the acetylated amino acid. Peak 1 was assigned to the free L-lysine (peak 1, $147 m/z$), while the other two peaks (2 and 3) were the *N*- α - and *N*- ϵ -acetyl-L-lysine isomers ($189 m/z$), demonstrating that both lysine nitrogen

Figure 1. Effect of histidine on the amplitude of the EPR signal for the putative $\text{MNP-CH}_3\text{CO}^+$ adduct. The peroxynitrite/diacetyl reaction was performed at room temperature in 200 mmol L^{-1} aerated phosphate buffer (pH 7.2) after a 4 min incubation. The reaction mixture contained diacetyl (5.0 mmol L^{-1}), peroxynitrite (2.0 mmol L^{-1}), MNP (2.0 mmol L^{-1}) and varying concentrations of histidine: (a) 0.0 mmol L^{-1} , (b) 0.5 mmol L^{-1} and (c) 1.0 mmol L^{-1} .

atoms underwent acetylation. These data, as well as those obtained with other polar and nonpolar amino acids, confirmed that the chemical yield of acetylation was less than 30% of the peroxynitrite concentration. This value was a rough estimation based on the ratio of the CE peak areas for the acetylated and free amino acids (2.0 mmol L^{-1}) in the consumed reaction mixture. This calculation also accounts for the fact that 70% of added peroxynitrite (2.0 mmol L^{-1}) isomerizes, forming the nitrate ion.⁴¹ Figures 2b and 3c reveal the two different radical fragmentation pathways for the molecular ions of both isomers generated from the acetylation of lysine. These data support our hypothesis that dual acetylation is a competitive process, while partial acetylation occurs at each lysine nitrogen atom. Full scan mass spectra of the ion precursor ($189 m/z$) were obtained during the experiments.

Figure 3 depicts the CE-ESI-MS traces for eight representative acetylated amino acids, 1: acetyl-L-Ser ($148 m/z$); 2: acetyl-L-Tyr ($224 m/z$); 3: acetyl-L-Phe ($208 m/z$); 4: acetyl-L-His ($198 m/z$); 5: acetyl-L-Lys ($189 m/z$); 6: acetyl-L-Met ($192 m/z$); 7: acetyl-L-Arg ($217 m/z$); and 8: acetyl-L-Thr ($162 m/z$). All twenty amino acids were acetylated.

The synthetic peptide was dissolved in acetic acid/ H_2O /methanol (50/49/1 v/v) to produce the spectra without acetylation, as illustrated in Figure 4a. When this peptide was subjected to the same reaction conditions as the amino acid acetylation, lysine was also acetylated in these chain peptides, as displayed in Figure 4b. However, the spectral data presented in Figure 4c validates our hypothesis because a protein in a physiological buffer

Figure 2. (a) CE-MS base peak electropherogram of radical acetylation detected by CE-ESI-MS/MS, 1: L-lysine (147 m/z), 2: N - α -acetyl-L-lysine and 3: N - ϵ -acetyl-L-lysine (both at 189 m/z); (b) and (c) MS/MS of 189 m/z ions. The CE-MS conditions for the free and acetylated amino acid mixtures were as follows: 1 mol L⁻¹ acid formic electrolytes with 20% methanol (pH 2.0); uncoated fused silica capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 75 cm; injection under 2 psi of pressure for 10 s; applied voltage 20 kV; temperature of 25 °C. ESI conditions: positive ion mode; spray voltage of 4.5 kV; sheath liquid methanol/water/acetic acid (50/49.5/0.5 v/v) at 5.0 μ L min⁻¹; drying gas flow (N₂) of 3 L min⁻¹; and drying temperature of 275 °C.

Figure 3. Eight independent traces representative of the CE-ESI-MS acetylation experiments, 1: Acetyl-L-Ser (148 m/z), 2: acetyl-L-Tyr (224 m/z), 3: acetyl-L-Phe (208 m/z), 4: acetyl-L-His (198 m/z), 5: acetyl-L-Lys (189 m/z), 6: acetyl-L-Met (192 m/z), 7: acetyl-L-Arg (217 m/z) and 8: acetyl-L-Thr (162 m/z). CE-MS conditions for the free and acetylated amino acids mixture containing 1 mmol L⁻¹ L-lysine. BGE of 1,0 mol L⁻¹ formic acid electrolyte (pH 1.8); uncoated fused silica capillary 50 μ m i.d. $\times$ 70 cm; 10 s injection under 2 psi of pressure; applied voltage 25 kV; and capillary temperature of 25 °C. ESI conditions: positive ion mode; spray voltage 4.5 kV; sheath liquid methanol/water/acetic acid (50/49.5/0.5 v/v) at 5.0 μ L min⁻¹; drying gas flow (N₂) of 3 L min⁻¹; and drying temperature of 275 °C.

Figure 4. (a) and (b) were radically acetylated peptides and control (c): Tryptic digest of the radically acetylated BSA were obtained in the micro-HPLC-MS/MS coupled with a micro-LC; the acquired data were processed using peptide sequences from the Mascot 2.3 database.

solution (the same condition as that of the amino acids) exhibited an acetylation spectrum for the inner portion of the protein (BSA); this fragment was revealed by a tryptic digest after radical acetylation. The intensity of this fragment (acetylated peptide) was visualized using the MS/MS BioTools data (Bruker Daltonics, USA). This phenomenon was not observed for protein digested without undergoing acetylation beforehand in a reaction medium containing peroxyntirite or/and diacetyl.

Conclusion

Our results support the hypothesis that, unlike inflammatory sites, post-translational protein modification by radical acetylation did not only occur at the protein *N*-terminus of cells under nitrosative and carbonyl stress. In fact, double acetylation may also occur at the *N*-terminus of lysine residues.

Furthermore, CE-MS/MS is an alternative tool for investigating and quantifying the radical acetylation events in regulatory proteins, such as PTM, and small molecules. There is an urgent need for tools that can identify the type and location of protein modifications, as well as determine the extent of structural changes that might be related to a gain or loss of biological function. In this work we demonstrate that the radical acetylation of proteins might contribute to enzymatic acetylation.⁴² In addition, acetylated amino acid residues in proteins might be new biomarkers for cell damage.

CE-MS was a demonstrably powerful tool for analyzing small organic molecules (< 500 Da), such as amino acids, their derivatives, and many other catabolites. This technique features highly efficient separation and resolution, as well as relatively easy method development, small sample volume, rapid analysis and low solvent consumption. Recently, a dramatic increase in the number of publications describing and quantifying the type and location of chemical lesions in proteins, DNA and other biomolecules has occurred. We demonstrated that using mass spectrometry in combination with capillary electrophoresis enabled us to examine enzymatic and radical acetylation reactions of protein amino acid residues. CE-ESI-MS also simplifies the process for distinguishing between the *N*-terminal and inner acetylation of L-lysine residues implicated during post-translational cellular events.

Supplementary Information

The supplementary data contain the extracted ion electropherogram (BPE) for the free amino acids and acetylate products are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file. The amino acids and acetylated products were as follows: A = L-arginine and L-acetyl-arginine; B = L-phenylalanine and L-acetyl-phenylalanine; C = L-methionine and L-acetyl-methionine; D = L-acetyl-tyrosine and L-acetyl-tyrosine; E = L-serine and L-acetyl-serine; F = L-histidine and L-acetyl-histidine; G = L-threonine and L-acetyl-threonine.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Brazilian research funding agencies including FAPESP (São Paulo Research Foundation, Grants: 2006/60245-3 and 2012/02514-9), INCT Redoxoma (National Institute of Science and Technology of Redox Processes in Biomedicine) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) for their financial support.

References

1. Gygi, S. P.; Han, D. K. M.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N.; Aebersold, R.; *Electrophoresis* **1999**, *20*, 310.
2. Blackwood, E. M.; Kadonaga, J. T.; *Science* **1998**, *281*, 60.
3. Niki, E.; *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 469.
4. Zhang, K.; Tian, S.; Fan, E.; *Analyst* **2013**, *138*, 1628.
5. Weissinger, E. M.; Hertenstein, B.; Mischak, H.; Ganser, A.; *Expert Rev. Proteomics* **2005**, *2*, 639.
6. Li, F.; Allahverdi, A.; Yang, R.; Lua, G. B. J.; Zhang, X.; Cao, Y.; Korolev, N.; Nordenskiöld, L.; Liu, C. F.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 9611.
7. Hernández-Borges, J.; Neusüß, C.; Cifuentes, A.; Pelzing, M.; *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2257.
8. Zürlbig, P.; Renfrow, M. B.; Schiffer, E.; Novak, J.; Walden, M.; Wittke, S.; Just, I.; Pelzing, M.; Neusüß, C.; Theodorescu, D.; Root, K. E.; Ross, M. M.; Mischak, H.; *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2111.
9. Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H.; Simionato, A. V. C.; Tavares, M. F. M.; Carrilho, E.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2124.
10. Massari, J.; Fujii, D. E.; Dutra, F.; Vaz, S. M.; Costa, A. C. O.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; Tokikawa, R.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 879.
11. Massari, J.; Tokikawa, R.; Zanolli, L.; Tavares, M. F. M.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H.; *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1762.
12. Massari, J.; Tokikawa, R.; Medinas, D. B.; Angeli, J. P. F.; Di Mascio, P.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20761.
13. Melo-Braga, M. N.; Verano-Braga, T.; León, I. R.; Antonacci, D.; Nogueira, F. C. S.; Thelen, J. J.; Larsen, M. R.; Palmisano, G.; *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, 945.
14. Verdone, L.; Agricola, E.; Caserta, M.; Di Mauro, E.; *Proteomic* **2006**, *5*, 209.
15. Marton, O.; Koltai, E.; Nyakas, C.; Bakonyi, T.; Zenteno-Savin, T.; Kumagai, S.; Goto, S.; Radak, Z.; *Biogerontology* **2010**, *11*, 679.
16. Svensson, J.; Bergman, A. C.; Adamson, U.; Blombäck, M.; Wallén, H.; Jörneskog, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *421*, 335.

17. Permyakov, S. E.; Vologzhannikova, A. A.; Emelyanenko, V. I.; Knyazeva, E. L.; Kazakov, A. S.; Lapteva, Y. S.; Permyakova, M. E.; Zhadan, A. P.; Permyakov, E. A.; *Cell Calcium* **2012**, 52, 366.
18. Lundby, A.; Lage, K.; Weinert, B. T.; Bekker-Jensen, D. B.; Secher, A.; Skovgaard, T.; Kelstrup, C. D.; Dmytriiev, A.; Choudhary, C.; Lundby, C.; Olsen, J. V.; *Cell Rep.* **2012**, 2, 419.
19. Yang, L.; Vaitheesvaran, B.; Hartil, K.; Robinson, A. J.; Hoopmann, M. R.; Eng, J. K.; Kurland, I. J.; Bruce, J. E.; *J. Proteome Res.* **2011**, 10, 4134.
20. Zhang, K.; Schrag, M.; Crofton, A.; Trivedi, R.; Vinters, H.; Kirsch, W.; *Proteomics* **2012**, 12, 1261.
21. Oya, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y.; Miyata, S.; Maeda, S.; Osawa, T.; Uchida, K.; *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18492.
22. Koppenol, W. H.; Moreno, J. J.; Pryor, W. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S.; *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 25, 834.
23. More, S. S.; Vartak, A. P.; Vince, R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 2083.
24. Martyny, J. W.; Van Dyke, M. V.; Arbuckle, S.; Towle, M.; Rose, C. S.; *J. Occup. Environ. Hyg.* **2008**, 5, 679.
25. Rincon-Delgadillo, M. I.; Lopez-Hernandez, A.; Wijaya, I.; Rankin, S. A.; *J. Dairy Sci.* **2012**, 95, 1128.
26. More, S. S.; Raza, A.; Vince, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 3311.
27. Leksrisompong, P.; Barbano, D. M.; Foegeding, A. E.; Gerard, P.; Drake, M.; *J. Sens. Stud.* **2010**, 25, 347.
28. Otsuka, M.; Harada, N.; Itabashi, T.; Ohmori, S.; *Alcohol* **1999**, 17, 119.
29. Bechara, E. J.; Dutra, F.; Cardoso, V. E.; Sartori, A.; Olympio, K. P.; Penatti, C. A.; Adhikari, A.; Assunção, N. A.; *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* **2006**, 146, 88.
30. Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L.; *Physiol. Rev.* **2007**, 87, 315.
31. Vásquez-Vivar, J.; Denicola, A.; Radi, R.; Augusto, O.; *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 786.
32. Maeda, H.; Fang, J.; Inutsuka, T.; Kitamoto, Y.; *Immunopharmacol.* **2003**, 3, 319.
33. Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R.; *Nature* **2007**, 6, 662.
34. Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, 87, 1620.
35. Yang, D.; Tang, T.; Chen, J.; Wang, X.; Bartberger, M. D.; Houk, K. N.; Olson, L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11976.
36. Uppu, R. M.; Winston, G. W.; Pryor, W. A.; *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 1331.
37. Hirata, I. Y.; Sedenho Cezari, M. H.; Nakaie, C. R.; Boschcov, P.; Ito, A. S.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; *Lett. Pept. Sci.* **1995**, 1, 299.
38. Korkmaz, B.; Attucci, S.; Juliano, M. A.; Kalupov, T.; Jourdan, M. L.; Juliano, L.; Gauthier, F.; *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 991.
39. Zee, B. M.; Garcia, B. A.; *Methods Mol. Biol.* **2013**, 981, 1.
40. Assunção, N. A.; Deziderio, L. Ap. G.; Paulino, L. G.; Lupetti, K. O.; Carrilho, E.; *Electrophoresis* **2005**, 26, 3292.
41. Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C. X.; De Menezes, S. L.; *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 841.
42. Topper, M.; Luo, Y.; Zhadina, M.; Mohammed, K.; Smith, L.; Muesing, M. A.; *J. Virol.* **2007**, 81, 3012.

Submitted: July 22, 2013

Published online: October 9, 2013

FAPESP has sponsored the publication of this article.

ANEXO F. SÚMULA CURRICULAR

JÚLIO MASSARI FILHO

Nascido em Sorocaba, aos 14 de Agosto de 1985

lattes.cnpq.br/7945633680536076

FORMAÇÃO

Colégio Dom Aguirre: Ensino Médio (1999-2002) e Fundamental (1995-1998).

Escola Técnica Estadual Fernando Prestes (ETEC Fernando Prestes): Técnico em Informática (janeiro de 2001-julho de 2002).

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP): Bacharel em Química com atribuições tecnológicas (2003-2006) e biotecnológicas (2003-2008).

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e Faculdade de Educação da Universidade de São Paulo (FE-USP): Licenciado em Química (2003-2007).

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP): Aluno de pós-graduação, nível Doutorado Direto, na área de Química Orgânica (2008 até a presente data). (Bolsa do CNPq, Cota Institucional, processo 130874/2008-6 de 04/2008 à 03/2009).

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Instituto de Química da Universidade de São Paulo: Laboratório de Radicais Livres e Espécies Excitadas de Oxigênio: Iniciação Científica com desenvolvimento de projeto de pesquisa financiado por CNPq/PIBIC/USP sob orientação do Professor Titular Etelvino José Henriques Bechara (2005-2007).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) IQ-USP: Estágio supervisionado na disciplina QFL0341: Química Orgânica I para alunos do curso de Farmácia e Bioquímica Noturno, ministrada pelo Professor Doutor Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (1º Semestre de 2009).

OCUPAÇÃO AUTAL

Governo do Estado de São Paulo: Superintendência da Polícia Técnico-Científica: Instituto de Criminalística: Perito Criminal (março de 2009 até a presente data).

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

50th Anniversary Annual Meeting & ToxExpo™: Society of Toxicology. Apresentação de trabalho (pôster): “Generation of acetyl radical and singlet oxygen by reactive – oxoaldehydes linked to aging and diabetes”. Washington (DC), EUA, Março, 2011.

16th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM). Apresentação de trabalho (pôster): “Glyoxal Reacts With Peroxynitrite Yielding Singlet Molecular Oxygen”. San Francisco (CA), EUA, Novembro, 2009.

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Apresentação de trabalho (pôster).

15th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM). Apresentação Oral: “Methylglyoxal Reacts At High Rates With Peroxynitrite Yielding Acetyl Radical”. Indianapolis (IN), EUA, Novembro, 2008.

15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP). Apresentação de trabalho (pôster).

XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). Apresentação de trabalho (pôster).

XIV Congresso de Iniciação Científica da UFSCar. Apresentação de trabalho (pôster).

14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP (SIICUSP). Apresentação de trabalho (pôster).

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 1) Massari J, Fujii DE, Dutra F, Vaz SM, Costa AC, Micke GA, Tavares MFM, Tokikawa R, Assunção NA, Bechara EJ. Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21, 879-87.
- 2) Massari J, Tokikawa R, Zanolli L, Tavares MFM, Assunção NA, Bechara EJ. Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, 23, 1762-1770.
- 3) Massari J, Tokikawa R, Medinas, DB, Angeli, JPF, DiMascio, P, Assunção, NA, Bechara, EJH. Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal-Peroxynitrite System. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133, 20761-20768.
- 4) Sartori, A, Mano, CM, Mantovani, MC, Dyszy, FH, Massari, J, Tokikawa, R, Nascimento, OR, Nantes, IL, Bechara, EJH. Ferricytochrome c Directly Oxidizes

Aminoacetone to Methylglyoxal, a Catabolite Accumulated in Carbonyl Stress. *Plos One*, 2013, 8(3), e57790.

- 5) Alves, ANL, Jedlicka, LDL, Massari, J, Juliano, MA, Bechara, EJH, Assunção, NA. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Applied to Study the Radical Acetylation of Amino Acids, Peptides and Proteins. *Journal of the Brazillian Chemical Society*, 2013, 24, 1983-1990.

PRÊMIOS RECENTES

Prêmio CRQ-IV 2008, do Conselho Regional de Química da 4ª Região, na categoria Aluno de Química de Nível Superior, pelo trabalho de Iniciação Científica desenvolvido sob orientação do Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara e em conjunto com a aluna Débora Emy Fujiy, intitulado “Acetilação Radicalar de 2'-Desoxiguanosina e L-Histidina Acoplada à Reação de Biacetilo com Peroxinitrito em Meio Aerado”.

Prêmio Qualidade em Publicação 2011 da Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da USP pelo artigo Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal-Peroxynitrite System publicado no Journal of the American Chemical Society.