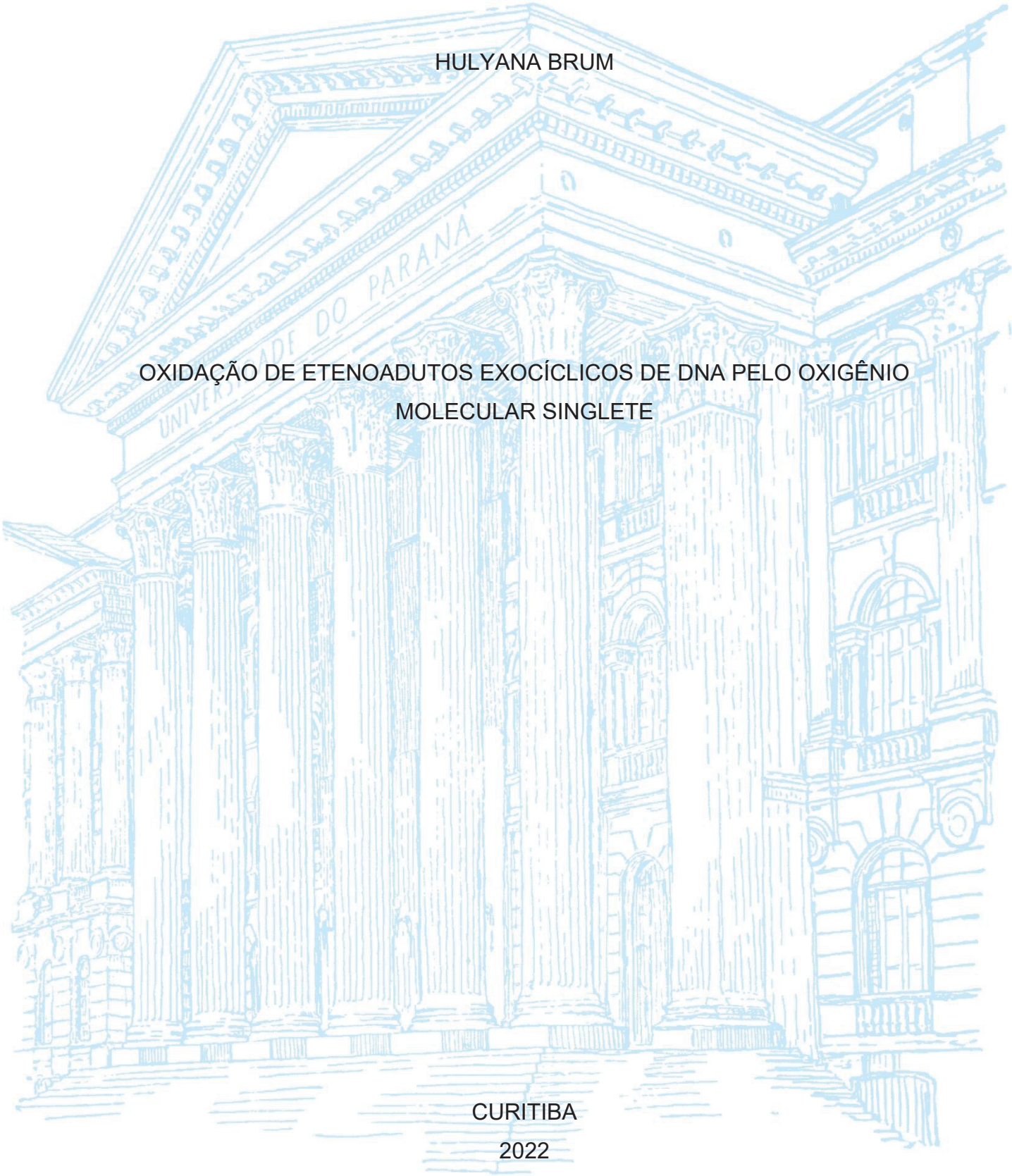
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HULYANA BRUM



OXIDAÇÃO DE ETENOADUTOS EXOCÍCLICOS DE DNA PELO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

CURITIBA

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HULYANA BRUM

OXIDAÇÃO DE ETENOADUTOS EXOCÍCLICOS DE DNA PELO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Brum, Hulyana
Oxidação de etenoadutos exocíclicos de DNA pelo oxigênio molecular singlete / Hulyana Brum. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).
Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez.

1. Oxigênio singlete. 2. Dano ao DNA. 3. Carcinógenos. I. Martinez, Glaucia Regina. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

ATA Nº509

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)

No dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil e vinte e dois às 09:00 horas, na sala Defesa Huly, Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **HULYANA BRUM**, intitulada**: OXIDAÇÃO DE ETENOADUTOS EXOCÍCLICOS DE DNA PELO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE**, sob orientação da Profa. Dra. GLAUCIA REGINA MARTINEZ. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: GLAUCIA REGINA MARTINEZ (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SAYURI MIYAMOTO (INSTITUTO DE QUÍMICA DA USP). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, GLAUCIA REGINA MARTINEZ, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica
05/04/2022 08:55:14.0
GLAUCIA REGINA MARTINEZ
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
04/04/2022 13:38:52.0
SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
12/04/2022 16:31:49.0
SAYURI MIYAMOTO
Avaliador Externo (INSTITUTO DE QUÍMICA DA USP)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 171530
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 171530

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **HULYANA BRUM** intitulada: **OXIDAÇÃO DE ETENOADUTOS EXOCÍCLICOS DE DNA PELO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE**, sob orientação da Profa. Dra. GLAUCIA REGINA MARTINEZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Fevereiro de 2022.

Assinatura Eletrônica
05/04/2022 08:55:14.0
GLAUCIA REGINA MARTINEZ
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
04/04/2022 13:38:52.0
SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
12/04/2022 16:31:49.0
SAYURI MIYAMOTO
Avaliador Externo (INSTITUTO DE QUÍMICA DA USP)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 171530
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 171530

“Na vida, não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido”

- Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lizane e Benjamim, meu irmão, Neto, que sempre estiveram ao meu lado, agradeço por todo o apoio, amor e carinho. Amo vocês!

Aos meus amigos queridos amigos Guilherme Turezo e Maria Julia, pela amizade, apoio, ajuda e incentivo.

Ao meu namorado, Renato, pelo carinho, paciência e por sempre me apoiar e incentivar.

À minha orientadora, professora Dra. Glaucia Regina Martinez, pela oportunidade, orientação, apoio, dedicação, confiança para a realização deste trabalho.

Aos professores Paolo Di Mascio e Marisa Helena Gennari de Medeiros (IQ-USP), por toda ajuda com o projeto.

À técnica Fernanda Prado (IQ-USP) pela ajuda com os experimentos LC-MS/MS e contribuições no trabalho.

À professora Dra. Silvia Cadena pela correção dos relatórios e sugestões para o meu trabalho.

Ao professor Dr. Guilherme Lanzi Sassaki pelas análises de RMN e contribuição no trabalho.

À técnica Flavia Degaut, pela ajuda com equipamentos e análises.

Ao professor Dr. Thales Cipriani, pelo uso do liofilizador.

Às professoras do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo apoio e contribuição.

Aos meus amigos laboratório, Ester, Day, Ju Kulik, Ju Carvalho e Luiz pela amizade, apoio e ajuda na execução dos experimentos.

A todos os amigos do laboratório, que contribuíram para que esses anos fossem mais divertidos e a rotina mais fácil pela companhia de todos. Agradeço muito pela amizade, apoio.

À pós-graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES, CNPq e PRPPG-UFPR pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os etenoadutos exocíclicos de DNA são modificações das bases nitrogenadas induzidas por carcinógenos ocupacionais e ambientais, que têm sido muito estudados nos últimos anos devido seu papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese. A peroxidação lipídica também é considerada uma das principais fontes de formação dos etenoadutos de DNA. Estes danos, se não reparados, podem desencadear mutações contribuindo para o desenvolvimento do câncer. Recentemente, alguns estudos sugeriram que espécies reativas de oxigênio (ROS) podem reverter estas lesões de DNA. Dentre as ROS, foi mostrado que o oxigênio molecular singlete ($^1O_2$) reage com a 1,*N*²-eteno-2'-desoxiguanosina (1,*N*²-εdGuo) por meio da cicloadição [2+2], resultando na 2'-desoxiguanosina (dGuo) como produto final, ou seja, o $^1O_2$ restaurou o nucleosídeo normal. Além disso, nessa reação foi detectado um produto intermediário inédito do $^1O_2$ contendo um grupamento diol (glicol) em sua estrutura. O presente trabalho teve como objetivo contribuir na elucidação de mecanismos químicos envolvidos nas reações oxidação de etenoadutos pelo estudo da oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1, N^6-εdAdo) e do 3, N^4-eteno-citosina (3, N^4-εCit) pelo $^1O_2$ por meio de análises e caracterização de produtos gerados. Para geração de $^1O_2$ foi realizada a fotossensibilização tipo II e a termodecomposição de endoperóxidos sem e com oxigênio-18 (DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$). Para identificar e caracterizar os produtos foram utilizadas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas. Também foi avaliada a estabilidade dos produtos. A oxidação do 1, N^6-εdAdo resultou na formação dos produtos *N*-formil-dAdo e dAdo. O produto *N*-formil-dAdo degrada a 37°C, resultando na formação de dAdo como produto final. A oxidação do 3, N^4-εCit resultou na formação de citosina-glicol, *N*-formil-citosina e a citosina. Os produtos citosina-glicol e *N*-formil citosina se decompõem a 37°C formando a citosina como produto final da reação. Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a reação do $^1O_2$ com 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit resultou na formação de 2'-desoxiadenosina e a citosina como produto final, respectivamente, por meio da cicloadição [2+2]. Portanto, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o $^1O_2$ restaurou as nucleobases de origem.

Palavras-chave: Oxigênio Singlete; Etenoadutos; danos no DNA; HPLC.

ABSTRACT

Exocyclic DNA adducts are induced by occupational and environmental carcinogens that have been studied in over the years due to major role in mutagenesis and carcinogenesis processes. Lipid peroxidation is also considered one of the main sources of DNA adduct formation. These lesions, if not repaired, can trigger mutations contributing to the development of cancer. Recently, some studies have suggested that reactive oxygen species (ROS) may be undoing these DNA damage. Among the ROS, it was highlighted that singlet oxygen ($^1O_2$) can react with the lesion 1, *N*²-etheno-2'-deoxyguanosine (1, *N*²- εdGuo) through cycloaddition [2 + 2] to end in 2'-deoxyguanosine (dGuo) as a final product, that is, $^1O_2$ restored the normal nucleoside. Furthermore, in this reaction, an unpublished $^1O_2$ intermediate product containing a diol group in its structure was detected. Therefore, the present work aims to contribute to the elucidation of chemical mechanisms involved in the oxidation reactions of ethenoadducts 1, *N*⁶-etheno-2'-deoxyadenosine (1, *N*⁶-εdAdo) and 3, *N*⁴-ethenocytosine (3, *N*⁴ - εCit) by $^1O_2$ through analysis and characterization of generated products. Type II photosensitization and endoperoxide thermodecomposition (DHPN$^{16}O_2$ and DHPN$^{18}O_2$) were used to generate $^1O_2$. The identification and characterization of the products was carried out using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and mass spectrometry techniques. The stability of the products was also evaluated. The oxidation of 1,*N*⁶-εdAdo resulted in the formation of *N*-formyl-dAdo and dAdo products. The N-formyl-dAdo decompose at 37°C, resulting in the formation of dAdo as a final product. Oxidation of 3, *N*⁴-εCit resulted in the formation of cytosine-glycol, N-formyl-cytosine and cytosine. The cytosine-glycol and N-formyl cytosine decompose at 37°C, forming cytosine as a final product. The data obtained in this work suggest that the reaction of $^1O_2$ with 1, *N*⁶-εdAdo and 3, *N*⁴-εCit resulted in the formation of dAdo and a cytosine as final product, respectively, through cycloaddition [2+2]. Therefore, from these results, we reinforce the possible role of $^1O_2$ in the cleanup of etheno adducts by regenerating the normal nucleobase.

Keywords: Singlet oxygen; Ethenoadducts; DNA damage; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Geração de $^1O_2$ em sistemas biológicos 21
Figura 2 – Representação geral das reações de fotossensibilização dos tipos I e II 22
Figura 3 - Esquema de liberação do $^1O_2$ pela termodecomposição de endoperóxido 23
Figura 4 - Estrutura química dos principais etenoadutos de DNA 27
Figura 5 - Via proposta para formação do 3, N^4-εdCit a partir do haleto de vinila 28
Figura 6 - Via proposta para formação de etenoadutos a partir de aldeídos ∝,$\boldsymbol{\beta}$-insaturados.....29
Figura 7 - Representação geral das fases da peroxidação lipídica 32
Figura 8 - Rota proposta de formação para os produtos de oxidação do 1, N^2-εdGuo pelo $^1O_2$ 34
Figura 9 - Caixa de irradiação usada para geração de $^1O_2$ 40
Figura 10- Padronização da detecção do 1, N^6-εdAdo por HPLC-PDA 43
Figura 11 – Reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em D_2O 44
Figura 12 - Espectro de absorção dos produtos da oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ 45
Figura 13 - Comparação do perfil da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em D_2O e H_2O.....46
Figura 14 - Cromatograma de *spiking* com dAdo 47
Figura 15 - Espectro de massa dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo purificados por HPLC-PDA.....49
Figura 16 - Espectro ^1H e HSQC do P1 do 1, N^6-εdAdo 50
Figura 17 - Análise da estabilidade dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo .52
Figura 18 - Cromatograma UV e espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo 53
Figura 19 - Espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo 54
Figura 20 – Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em $H2^{18}O$ 55
Figura 21 - Cromatograma e espectros de massa da análise de LC-MS/MS do *N*-formil-dAdo, produto da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em $H_2{}^{18}O$ 56
Figura 22 – Possíveis produtos da reação adição de H_2O em aldeídos.....57

Figura 23 – Cromatogramas dos produtos de oxidação do 1, N^6-εdAdo gerados na incubação com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS.....59
Figura 24 – Cromatogramas dos produtos da cinética de incubação durante a reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{16}O_2$ por LC-MS/MS 60
Figura 25 - Cromatogramas dos produtos da cinética de incubação durante a reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS 61
Figura 26 - Cromatograma e espectro de massa do produto *N*-formil-dAdo gerado oxidação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS.....62
Figura 27 - Padronização da detecção do 3, N^4-εCit.....63
Figura 28 - Reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit em D_2O.....64
Figura 29- Espectro de absorção dos produtos da oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ .65
Figura 30 – Comparação do perfil da reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit em D_2O e H_2O.....66
Figura 31 - Cromatograma de *spiking* com citosina 67
Figura 32 - Espectro de massa dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit purificados por HPLC-PDA 69
Figura 33 - Esquema de fragmentação do produto citosina-glicol.....70
Figura 34 - Espectro ^1H do P2 do 3, N^4-εCit.....71
Figura 35 – Análise da estabilidade dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit 73
Figura 36 - Cromatograma do monitoramento análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit.....75
Figura 37 - Espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit.....76
Figura 38 - Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação 3, N^4-εCit em $H_2{}^{18}O$.....78
Figura 39 - Cromatograma e espectro de massas do *N*-formil-citosina em $H_2{}^{18}O$ 79
Figura 40 - Possíveis produtos da reação adição de H_2O em aldeídos em *N*-formil-citosina 80
Figura 41 - Cromatograma e espectro de massas do citosina-glicol em $H_2{}^{18}O$.....81
Figura 42 - Cromatograma dos produtos da reação de 3, N^4-εCit com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ 83
Figura 43 – Análise cinética da oxidação do 3, N^4-εCit com DHPN $^{16}O_2$ 84
Figura 44 - Análise cinética da oxidação do 3, N^4-εCit DHPN$^{18}O_2$.....85

Figura 45 - Cromatograma do produto citosina-glicol marcada isotopicamente a partir do DHPN$^{18}O_2$ 87
Figura 46 - Cromatograma do produto *N*-formil-citosina marcada isotopicamente a partir do DHPN$^{18}O_2$ 88
Figura 47 - Rota de formação para os produtos de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ 92
Figura 48 - Possível rota de formação para os produtos de oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$.....95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Constantes de desativação total do $^1O_2$ (k_t) 34
TABELA 2 - Deslocamentos químicos no espectro ^{1}H RMN do P1 do 1, N^6-εdAdo..51
TABELA 3 - Deslocamentos químicos no espectro ^{1}H RMN do P2 do 3, N^4-εCit 72

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

$^1O_2$	Oxigênio molecular singlete
$^{18}[^1O_2]$	Oxigênio molecular singlete isotopicamente marcado com ^{18}O
1, N^2-εdGuo	1, N^2- eteno- 2'-desoxiguanosina
1, N^6-εdAdo	1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina
3, N^4-εCit	3, N^4-eteno-citosina
3, N^4-εdCit	3, N^4-eteno-desoxicitidina
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
BER	Reparo por Excisão de Bases
Cit	Citosina
D_2O	água deuterada
dAdo	2'-desoxiadenosina
dGuo	2'-desoxiguanosina
DDE	*trans, trans*-2,4-decadienal
DHPN	*N, N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
$DHPNO_2$	Endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida
$DHPN^{18}O_2$	Endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida isotopicamente marcado com ^{18}O
dIz	diastereoisômeros de 2-amino-5-[(2-deoxi-ß-D- eritropentofuranosil) amino]-4-(4H)-imidazolona
dOz	Diastereoisômeros de 2,2-diamino-4-[2-deoxi-b-D-eritropentofuranosil amino]-5-(2H)-oxazolona
dSp	Diastereoisômeros espiroiminodihidantoína desoxirribose
EIC	Cromatograma de extração do íon (*Extraction Ion Chromatogram*)
Gh	Guanidinohidantoína
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography)*
HSQC	*Heternuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*
k_t	Constante de desativação total
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao espectrômetro de massa em *tandem*
MetOH	Metanol
m/z	Relação massa/carga
PDA	Detector fotodiodos (P*hotodiode Array Detector*)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
Oxa	Ácido oxalúrico
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Justificativa 18

1.2 Objetivos 18

1.2.1 Objetivo geral 18
1.2.2 Objetivos específicos 18
1.3 Estratégia experimental 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 Oxigênio molecular singlete 20

2.1.1 Fontes de $^1O_2$ 21
2.1.2 Tempo de vida e desativação do $^1O_2$ 23
2.1.3 Principais mecanismos do $^1O_2$ 24
2.1.4 Alvos biológicos do $^1O_2$ 26
2.2 Danos no DNA 26

2.2.1 Etenoadutos exocíclicos de DNA 27
2.2.2 Peroxidação Lipídica 31
2.2.3 Oxidação de adutos de DNA 32
2.3 Reações de oxidação no DNA 35

2.3.1 Oxidação da guanina 35
2.3.2 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxodGuo) 35
3 MATERIAIS E MÉTODOS 37

3.1 Materiais e equipamentos 37

3.2 Síntese dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit 37

3.2.1 Pré-purificação por extração em fase sólida (SPE) 38
3.1.1 Padronização da detecção por HPLC-PDA 38

3.1.1.1 1, N^6-εdAdo e seus produtos de oxidação 38
3.1.1.2 3, N^4-εCit e seus produtos de oxidação 39
3.2 Foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit 39

3.2.1 Caracterização dos produtos de foto-oxidação por infusão direta (ION TRAP) 40

3.2.2 Estabilidade dos produtos de foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit 41

3.2.3 Caracterização por LC-MS/MS 41

3.3 Foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit em $H_2{}^{18}O$ 42

3.4 Reação dos etenoadutos com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ 42

3.5 Caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN) 42

4 RESULTADOS 43

4.1 Oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina pelo oxigênio singlete 43

4.1.1 Detecção do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina por HPLC-PDA 43

4.1.2 Análise e caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina 44

4.1.3 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina por infusão direta (Ion-Trap) 48

4.1.4 Caracterização do produto P1 de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina por RMN 50

4.1.5 Análise da estabilidade dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina por HPLC-PDA 51

4.1.6 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina por LC-MS/MS 52

4.1.7 Análise dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina em $H_2{}^{18}O$por LC-MS/MS 55

4.1.8 Análise dos produtos de oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina gerados na incubação com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS 58

4.2 Oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina pelo oxigênio singlete 63

4.2.1 Detecção do 3, *N*^{4}-etenocitosina por HPLC-PDA 63

4.2.2 Análise e caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina 63

4.2.3 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina por infusão direta (Ion-Trap) 68

4.2.4 Caracterização do P2 da reação de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina por RMN 71

4.2.5 Análise da estabilidade dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina por HPLC-PDA 72

4.2.6 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina por LC-MS/MS 73

4.2.7 Análise dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina em $H_2{}^{18}O$ por LC-MS/MS 77

4.2.8 Análise dos produtos de oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina gerados na incubação com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS 82

5 DISCUSSÃO 89

5.1 Oxidação do 1, *N*^{6}-eteno-2'-desoxiadenosina pelo $^1O_2$ 90

5.2 Oxidação do 3, *N*^{4}-etenocitosina pelo $^1O_2$ 93

6 CONCLUSÃO 97

7 REFERÊNCIAS.....98

1 INTRODUÇÃO

Os etenoadutos exocíclicos de DNA são lesões ou modificações induzidas nas bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucleico (DNA) consideradas uma das mais prejudiciais com relação ao DNA e estão envolvidas em processos mutagênicos e carcinogênicos. Alguns aldeídos presentes no ambiente podem reagir diretamente com o DNA resultando na formação destas lesões. Estes compostos podem ser encontrados como contaminantes em alimentos e bebidas ou podem ser gerados a partir da queima de combustíveis e cigarros. Um exemplo é o cloroacetaldeído, composto bastante explorado na literatura por ser comprovadamente mutagênico e carcinogênico (LOUREIRO et al. 2000; BARBIN 2000; TUDEK et al. 2016).

A formação dessas lesões também pode ocorrer endogenamente por meio da ação dos produtos da lipoperoxidação, como aldeídos e epóxidos (EL GHISSASSI et al. 1995). Um dos produtos formados por esse processo é *o trans,trans*-2,4-decadienal (DDE), que apresenta elevada citotoxicidade (KANEKO et al. 1987; LOUREIRO et al. 2000). A reação entre os epóxidos de DDE e o nucleosídeo 2'-desoxiadenosina (dAdo) ou a 2'-desoxiguanosina (dGuo) formam dois etenoadutos potencialmente mutagênicos em células: 1, N^2-εdGuo e 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina (1,N^6-εdAdo), respectivamente (Carvalho et al. 1998; Loureiro, et al. 2000).

As propriedades mutagênicas dos etenoadutos exocíclicos de DNA já são bem estabelecidas na literatura. Sabe-se que essas lesões podem resultar em transversões e translocações. Estudos mostraram que o 1,N^2-εdGuo é capaz de induzir a transversão G→A e G→T *in vitro,* em *E. coli* e em células de mamíferos LANGOUET et al. 1998; AKASAKA E GUENGERICH, 1999). O 1, N^6-εdAdo induz a troca de A→G, A→T e em menor proporção A→C *in vitro.* Em células de mamíferos este etenoaduto induz somente A→G e A→T (PANDYA; MORIYA 1996; LITINSKI et al. 1997; LEVINE et al. 2000).

Nas células existe um sistema de reparo, constituído principalmente por enzimas, que pode restaurar essas lesões de DNA por meio da excisão de bases (BER) (TUDEK et al. 2016). No entanto, recentemente foi visto que pode existir uma via alternativa de reparo dessas lesões envolvendo espécies reativas de oxigênio (ROS).

De acordo com Martinez et al. (2018) o oxigênio molecular singlete ($^1O_2$) reage oxidando a lesão 1, N^2-εdGuo, resultando na formação da dGuo como produto final, ou seja, sugere-se que esta ROS pode desfazer a lesão mutagênica e restaurar o nucleosídeo de origem (dGuo).

O $^1O_2$ é uma ROS do tipo não-radicalar com caráter eletrofílico resultante da configuração dos pares de elétrons com spins opostos no orbital de maior energia, conferindo-o uma alta reatividade frente a moléculas orgânicas ricas em elétrons, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (RONSEIN et al. 2006; MANO et al. 2014).

Martinez et al. (2018) propuseram a rota para reação de oxidação do 1, N^2-εdGuo pelo $^1O_2$ por meio da cicloadição [2+2] no grupo amino exocíclico da lesão porque foi detectado na reação um produto formilado, clássico da decomposição de um dioxetano. Entretanto, foi detectado outro produto inédito do $^1O_2$ contendo um grupo diol. Estes dois produtos são pouco estáveis e se decompõem dando origem ao nucleosídeo normal (dGuo). Dessa forma, como ocorreu a formação de um produto que não é clássico da decomposição do dioxetano, surgiu o interesse de avaliar o que favorece a formação desse tipo de produto contendo o grupo diol na reação com o $^1O_2$.

Existem poucas informações sobre a oxidação de etenoadutos de DNA na literatura. Alguns estudos abordam a oxidação das lesões de DNA utilizando outros mecanismos, por exemplo, oxidação por um elétron, pelo radical hidroxila (BARBATI et al. 2010) e enzimas como as oxigenases (DELANEY et al. 2005; ZDZALIK et al. 2014). Além disso, o comportamento de outras lesões, como 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit, frente ao $^1O_2$ ainda é desconhecido.

Diante do exposto, é importante estudar com mais detalhes a reatividade destas lesões de DNA, os etenoadutos, frente ao $^1O_2$. A caracterização dos produtos e elucidação dos mecanismos envolvidos nesse processo podem contribuir na melhor compreensão dos processos de carcinogênese e mutagênese.

1.1 Justificativa

A avaliação da reatividade dos etenoadutos de DNA frente ao $^1O_2$ foi investigada somente para o etenoaduto 1, N^2-εdGuo, portanto, ainda não se conhece o comportamento dos outros etenoadutos (1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit) na presença do $^1O_2$. Além disso, na oxidação do 1, N^2-εdGuo pelo $^1O_2$ ocorre a formação de um produto inédito cujo mecanismo da reação pelo $^1O_2$ não está estabelecido na literatura, dessa forma, o estudo da oxidação de outros etenoadutos podem contribuir na elucidação do mecanismo e o favorecimento da formação deste produto.

1.2 Objetivos

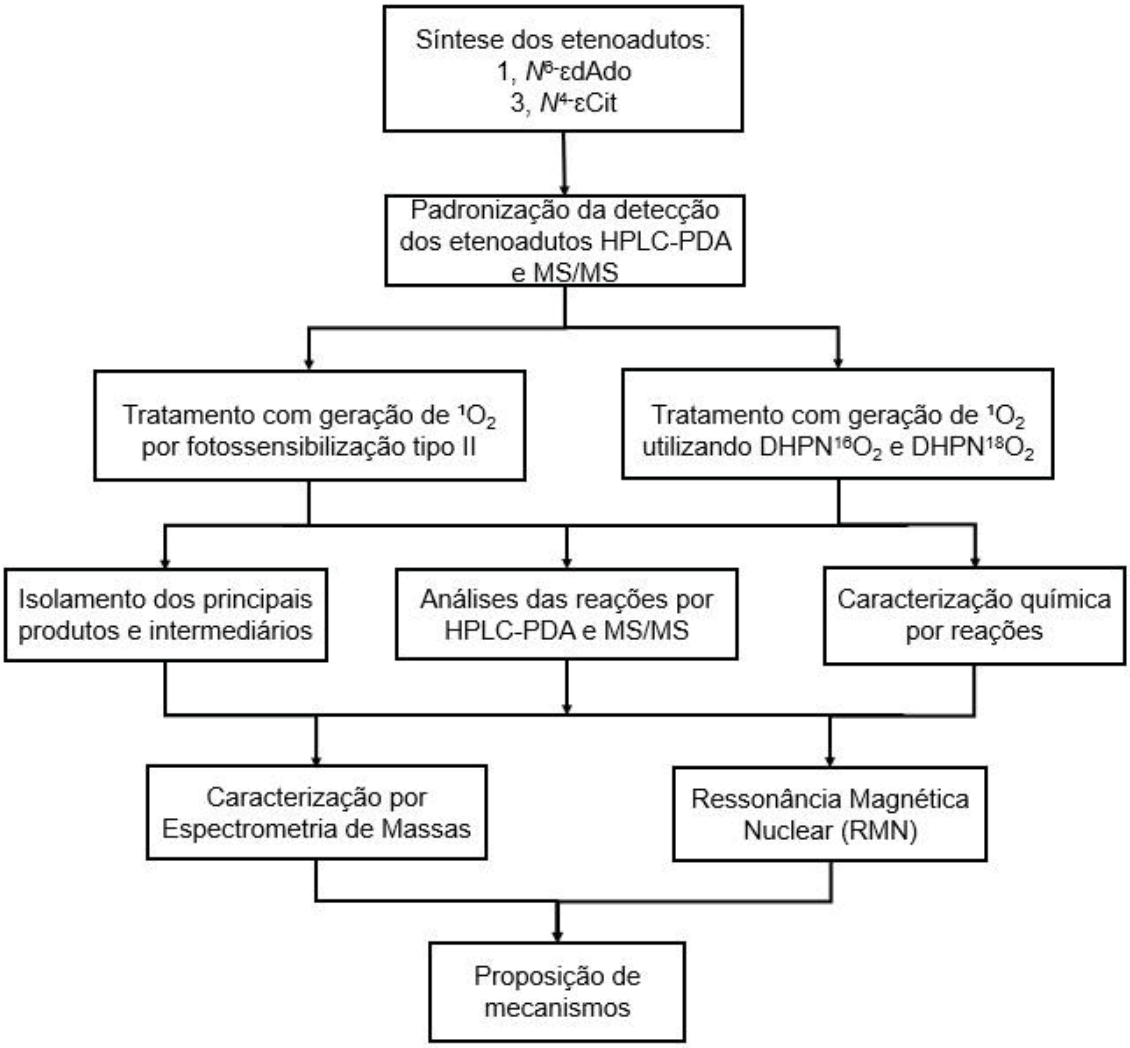
1.2.1 Objetivo geral

Contribuir na elucidação de mecanismos químicos envolvidos nas reações oxidação de etenoadutos exocíclicos de DNA pelo $^1O_2$ por meio de análises e caracterização de produtos gerados.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar, purificar e identificar por HPLC-PDA os etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit;
- ✓ Padronizar a detecção dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit por HPLC-PDA e MS/MS;
- ✓ Identificar, purificar e caracterizar os produtos formados pela oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit pelo $^1O_2$;
- ✓ Avaliar a estabilidade dos produtos gerados pela oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit pelo $^1O_2$
- ✓ Gerar os produtos de oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ isotopicamente marcados com [$^{18}O_2$] para estudos mecanísticos.

1.3 Estratégia experimental



Os padrões dos etenoadutos de DNA 1, N^6-εdAdo e 3, N^4- εCit foram sintetizados e purificados. Posteriormente, foi realizada a padronização da detecção destes etenoadutos por HPLC- PDA e LC-MS/MS. Depois foi realizado o tratamento com o $^1O_2$ a partir do mecanismo da fotossensibilização tipo II e DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ com cada etenoaduto, separadamente. Em seguida, utilizando os respectivos métodos de detecção foram identificados os principais produtos da reação e intermediários por HPLC-PDA e LC-MS/MS. Estes produtos foram isolados por HPLC. A caracterização dos produtos foi feita por meio de reações químicas com auxílio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e espectrometria de massas. A partir dessas informações foi possível propor os mecanismos de formação dos produtos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oxigênio molecular singlete

Em 1938, Kaustsky relatou a formação de um estado “ativado” do oxigênio molecular através do processo de transferência de energia por meio da ação *quench* de vários corantes fluorescentes (KAUTSKY, 1938). Posteriormente, na década de 60, Foote e Wexler confirmaram a formação desse estado excitado do oxigênio molecular realizando ensaios com fotossensibilizadores (FOOTE & WEXLER, 1964; FOOTE, 1968).

O oxigênio molecular, em seu estado fundamental, apresenta-se no estado triplete ($^3\sum_g^-$) e possui dois orbitais degenerados π* de mesma energia com spins paralelos. Portanto, de acordo com a regra de conservação do spin, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida. No entanto, através do acréscimo de energia, pode-se gerar uma forma mais reativa de oxigênio, denominada oxigênio molecular singlete ($^1O_2$), que possui dois estados excitados: $^1\Delta_g$ e $^1\sum_g^+$. O primeiro contém dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, com uma energia de 22,5 kcal/mol acima do estado fundamental e meia vida em solvente aquoso de 10^{-6} s. O segundo possui um elétron em cada orbital π degenerado com spins opostos e uma energia de 37,5 kcal/mol. O tempo de meia vida em solvente aquoso corresponde a 10^{-11} s neste estado excitado do oxigênio. Em sistemas biológicos, apenas o estado $^1\Delta_g$ possui relevância, em consequência do estado $^1\sum_g^+$ ter o tempo de meia vida muito curto e decair rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Este, por sua vez, é denotado por $^1O_2$ (FOOTE & WEXLER, 1964; FOOTE, C. S., 1968; RONSEIN et al., 2006).

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

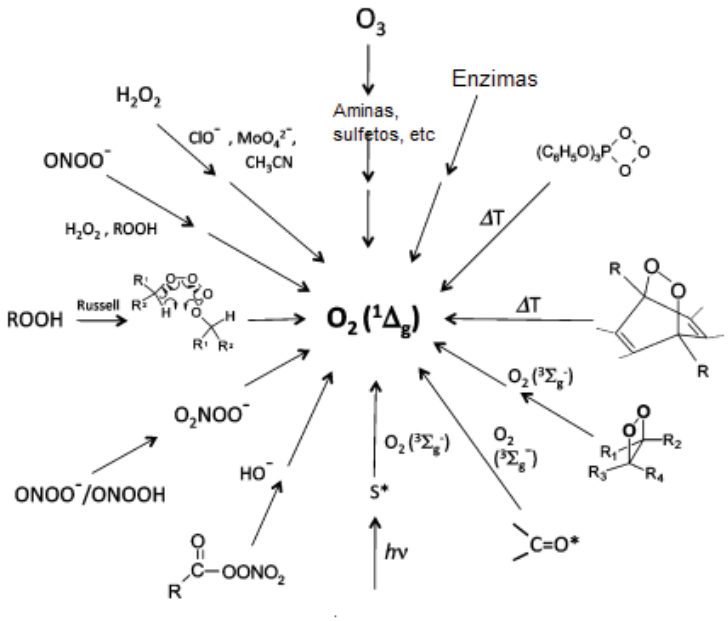
Estado	Orbitais π*	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\Sigma_g^+$	↑ ↓	37,5	10^{-11}
$^1\Delta_g$	↑↓	22,5	10^{-6}
$^3\Sigma_g^-$	↑ ↑		

Fonte: RONSEIN et al. (2006)), sob licença CC BY-NC 4.0.

2.1.1 Fontes de $^1O_2$

Nos sistemas biológicos, o $^1O_2$ pode ser formado por meio de processos dependente e independente de luz (reações no escuro) (ADAM et al., 2005). Alguns tipos de reações no escuro consistem de: reações catalisadas por enzimas como peroxidases (KLEBANOFF, 2005) e oxigenases (KANOFSKY; AXELROD, 1986); reações entre o ozônio e algumas biomoléculas (KANOFSKY; SIMA, 1991; MUÑOZ et al., 2001); reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o hipoclorito ou peroxinitrito (DI MASCIO et al., 1994; MARTINEZ et al., 2000; MIYAMOTO et al., 2009). Também foi relatado que formação de $^1O_2$ pode ocorrer a partir de radicais peroxilas provenientes das biomoléculas pelo mecanismo de Russel (RUSSELL, 1957; DI MASCIO et al., 2016). Além disso, o $^1O_2$ pode ser gerado nas células por um processo luz-dependente denominado fotossensibilização do tipo II (FOOTE, 1968; FOOTE, 1991; BAPTISTA et al., 2017). A figura 1, resume as principais fontes biológicas de $^1O_2$.

Figura 1 - Geração de $^1O_2$ em sistemas biológicos

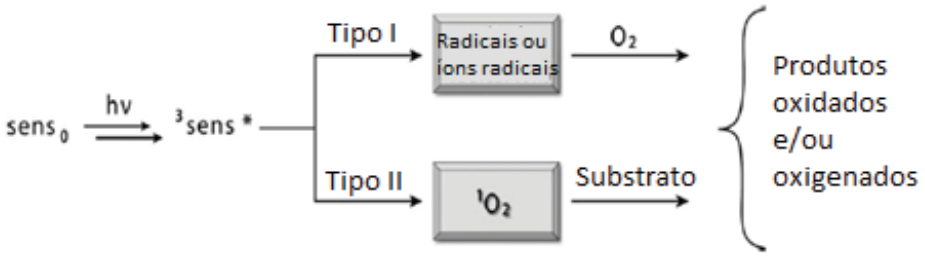


Fonte: DI MASCIO et al. (2019) , com permissão Copyright © 2019, American Chemical Society

No laboratório, o $^1O_2$ pode ser gerado pela fotossensibilização do tipo II, utilizando corantes (fotossensibilizadores), tais como azul de metileno ou rosa bengala, que formam o $^1O_2$ por transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular. Para este processo ocorrer e ser eficiente é

necessário O_2 disponível no meio (FOOTE, 1968; SCHMIDT, 2007). Na reação do tipo I, o fotossensibilizador excitado não transfere energia para o oxigênio e sim age por transferência de elétrons para o oxigênio ou outro substrato. Logo, não há formação de $^1O_2$ (BAPTISTA et al., 2017). Na membrana da célula, a ocorrência da reação tipo I ou tipo II depende da lipofilicidade, concentração de O_2 no meio e o substrato lipídio no qual o fotossensibilizador excitado (^{3}sens*) vai transferir sua energia (figura 2) (GIROTTI, 1990; BACELLAR et al., 2018).

Figura 2 – Representação geral das reações de fotossensibilização dos tipos I e II



Fonte: Adaptado de BAPTISTA et al.. (2017) , com permissão número 600085549, Copyright 2017 ©, *American Society for Photobiology*

Nota: No mecanismo de tipo I, a emissão de luz (*hv*) no fotossensibilizador ($Sens_0$) produz o fotossensibilizador excitado (^{3}Sens*) que pode reagir diretamente com o substrato por doação ou aceitação de elétrons resultando na formação de radicais ou íons radicais. Estes, podem sofrer reações secundárias com biomoléculas, gerando produtos de oxidação. No mecanismo de tipo II, o fotossensibilizador excitado (^{3}Sens*) reage diretamente doando energia ao oxigênio triplete, gerando o oxigênio singlete que pode reagir com substratos e também formar produtos oxidados.

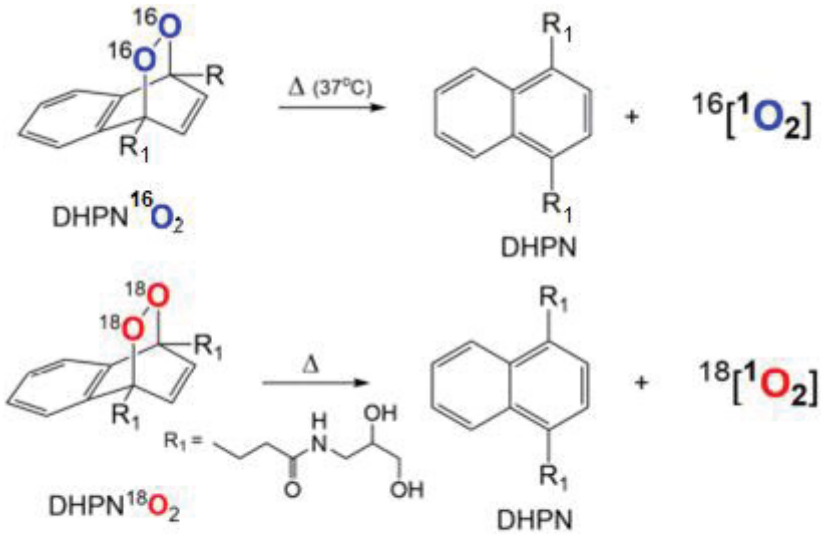
Outra forma de gerar o $^1O_2$ é por meio da termodecomposição de endoperóxidos derivados do naftaleno (PIERLOT et al., 2000). Essa metodologia é considerada uma ótima ferramenta em razão de ser considerada uma fonte química limpa e inerte de $^1O_2$. (MASCIO; SIES, 1989). Além disso, é possível sintetizar o endoperóxido derivado de naftaleno contendo o oxigênio marcado isotopicamente com a finalidade de realizar estudos mecanísticos em solução aquosa e células (FIGURA 3) (PIERLOT et al., 2000; DUARTE et al., 2000).

De forma geral a termólise dos endoperóxidos pode ocorrer por dois mecanismos: mecanismo diradicalar e o concertado. No primeiro ocorre a quebra homolítica de uma única ligação C-O, seguida da perda de um O_2 – que pode estar no estado singlete ou triplete-. No segundo mecanismo, ocorre por meio da quebra

das duas ligações C-O gerando diretamente o $^1O_2$. (TURRO et al., 1981; DI MASCIO et al. 2019).

O endoperóxido *N,N′*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)-dipropanamida ($DHPNO_2$), amplamente utilizado, é decomposto a $^1O_2$ e a seu precursor *N,N′*-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)-dipropanamida (DHPN), com rendimento de 60% após incubação a 37°C por 2,5 horas (PIERLOT et al., 2000).

Figura 3 - Esquema de liberação do $^1O_2$ pela termodecomposição de endoperóxido



Fonte: Adaptada de DI MASCIO et al. (2019), com permissão Copyright © 2019, *American Chemical Society*

Nota: Após reação de termodecomposição completa, o $DHPN^{16}O_2$ libera $^1O_2$ e seu precursor DHPN e o $DHPN^{18}O_2$ libera $^{18}[^1O_2]$ e seu precursor DHPN.

2.1.2 Tempo de vida e desativação do $^1O_2$

Em 1973, Kajiwara e Kearns observaram pela primeira vez que o tempo de vida do $^1O_2$ é maior em solventes deuterados do que em água (KAJIWARA; KEARNS 1973). Em soluções aquosas, o tempo de vida do $^1O_2$ corresponde a 3,8μs – tempo de vida muito curto –, isso ocorre porque o grupamento hidroxila da água possui uma alta energia de vibração, responsável pelo decaimento do $^1O_2$ ao estado fundamental (estado triplete). Quando gerado em água deuterada (D_2O), o tempo de vida do $^1O_2$ passa a ser bem maior, aproximadamente 62 μs. A substituição do ^1H pelo isótopo

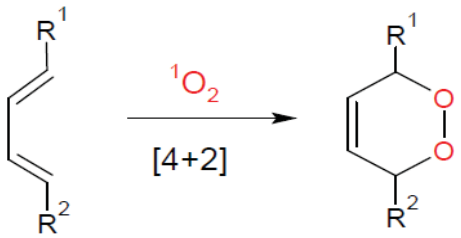
^2H reduz a energia vibracional das moléculas retardando o decaimento do $^1O_2$ para o estado fundamental. Essa propriedade do $^1O_2$ pode ser utilizada como estratégia em reações químicas para melhorar o rendimento de formação do $^1O_2$ e, consequentemente, aumentar a formação de produtos. (SCHMIDT; AFSHARI, 1992; FOOTE et al., 1995).

Além da influência do solvente, a interação com algumas moléculas pode auxiliar na desativação do $^1O_2$ por meio supressão física ou por reações químicas. Na via física, o $^1O_2$ transfere toda sua energia de excitação e retorna para o estado fundamental ou o $^1O_2$ pode realizar transferência de carga. Alguns exemplos de supressores físicos são: carotenóides (FOOTE et al., 1995) e azida (LI et al., 2001). A constante de velocidade bimolecular de desativação do $^1O_2$ é denominada K_q.

Pelo mecanismo químico, ocorre consumo do $^1O_2$ e formação de produto. Geralmente nessas reações o $^1O_2$ se comporta como um agente eletrofílico e resulta na formação de endoperóxidos, dioxetanos ou hidroperóxidos alílicos pelos mecanismos que vão ser descritos no item 2.1.3 a seguir. (FOOTE E CLENNAN, 1995). A constante de velocidade de reação do $^1O_2$ com relação a um substrato qualquer é denominada K_r. O valor da constante de desativação total do $^1O_2$ (k_t) pode ser obtido pelo somatório das constantes física e química ($k_t = k_q + k_r$).

2.1.3 Principais mecanismos do $^1O_2$ com alcenos

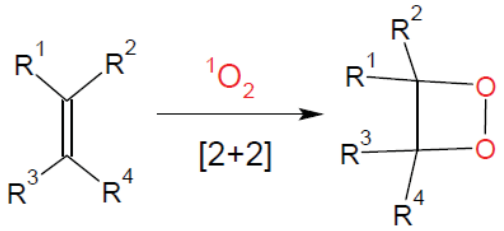
Na literatura, são descritos três principais mecanismos que podem ocorrer na reação de oxidação entre o $^1O_2$ e alcenos: a primeira reação é a cicloadição [4+2] onde é gerado como produto um endoperóxido (BLOODWORTH E EGGELTE, 1985). Nesse caso, o $^1O_2$ atua como dienófilo, analogamente à reação de Diels-Alder.



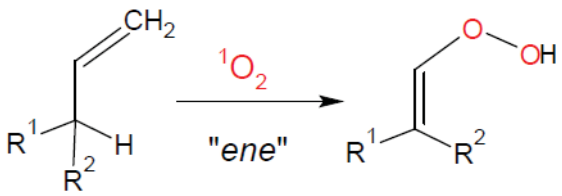
A segunda reação representa uma cicloadição [2+2] formando como produto final o 1,2-dioxetano, um peróxido cíclico formado por quaro membros, que pode

sofrer uma clivagem originam duas carbonilas, podendo uma delas se encontrar em um estado eletronicamente excitado. Geralmente esse tipo de reação ocorre preferencialmente em alcenos que possuem muitos elétrons ou alcenos estericamente impedidos (MAZUR et al. 1970).

Já foram descritos três mecanismos para explicar a decomposição unimolecular de 1,2-dioxetanos em carbonilas: concertado, concertado não sincronizado e birradicalar. O mecanismo concertado foi proposto envolvendo a clivagem simultânea de ambas as ligações, C-C e O-O do dioxetano e o produto eletronicamente excitado é produzido no complexo ativado (MCCAPRA, 1968; KEARNS, 1969). No mecanismo concertado não sincronizado, o rompimento da ligação O-O ocorre de forma mais avançada comparada a ligação C-C (TURRO E CHOW, 1981; ADAM E BAADER, 1985). O mecanismo birradicalar envolve a clivagem em etapas na qual a primeira ocorre o estiramento da ligação O-O para um birradical singlete, este, por sua vez, pode sofrer um rearranjo em sua estrutura e romper a ligação C-C produzindo uma carbonila excitada (RICHARDSON et al., 1974). O mecanismo mais adequado e compatível com estudos experimentais é o mecanismo concertado não sincronizado.



A terceira reação foi descrita inicialmente por Schenck (1953), denominada reação do tipo “ene”. Esse mecanismo gera como produto final hidroperóxidos alílicos, por meio da reação entre alcenos que possuem um hidrogênio alílico no qual a dupla ligação é deslocada ao carbono adjacente. Dessa forma, o $^1O_2$ ataca a dupla ligação.



2.1.4 Alvos biológicos do $^1O_2$

O $^1O_2$ é um potente dienófilo capaz de reagir com várias moléculas orgânicas ricas em elétrons por meio dos mecanismos descritos anteriormente. Muitas biomoléculas presentes nos organismos possuem insaturações em sua estrutura e, por esse motivo, tornam-se bons alvos para o $^1O_2$. Esta espécie reativa pode reagir com vários grupos funcionais como fenóis, aminas e sulfetos, estruturas presentes em várias moléculas biológicas. Dessa forma, o $^1O_2$ pode reagir com essas biomoléculas, danificando-as.

A reação do $^1O_2$ com lipídios pode ocorrer principalmente por meio do ataque as insaturações de ácidos graxos, fosfolipídios (TERAO et al. 1981) e o colesterol (KULIG E SMITH, 1973), produzindo hidroperóxidos (Di MASCIO et al. 2019).

Além dos lipídios, o $^1O_2$ apresenta elevada reatividade com proteínas, produzindo danos em aminoácidos como o triptofano, histidina, tirosina, metionina e cisteína. Os produtos formados na reação são principalmente endoperóxidos instáveis, que resultam em hidroperóxidos após a abertura do anel. Estes produtos foram mostrados em células, proteínas isoladas e peptídeos. Como resultado, pode ocorrer a formação de ligações-cruzadas, agregação de proteínas e inativação de enzimas. (DAVIES et al, 2004)

No DNA, o $^1O_2$ reage exclusivamente com a base guanina (RAVANAT et al., 2000). O produto principal da reação desta ROS com o DNA isolado é a 8-oxodGuo. (FLOYD et al., 1988, RAVANAT et al., 2000). Os detalhes da reação estão discutidos no item 2.3.

2.2 Danos no DNA

Dentre as biomoléculas, o DNA merece uma atenção especial devido sua importância na hereditariedade e metabolismo celular. A formação de danos no DNA contribui para processos mutagênicos e carcinogênicos. Alguns agentes físicos, como a radiação ionizante, bem como os agentes genotóxicos presentes em alimentos, bebidas, ar ou fumaça de cigarro, podem induzir modificações no DNA em consequência do ataque em bases nitrogenadas, resíduos de 2'-desoxiribose e ligações fosfodiéster (GATES, 2009). Além disso, as ROS também podem induzir

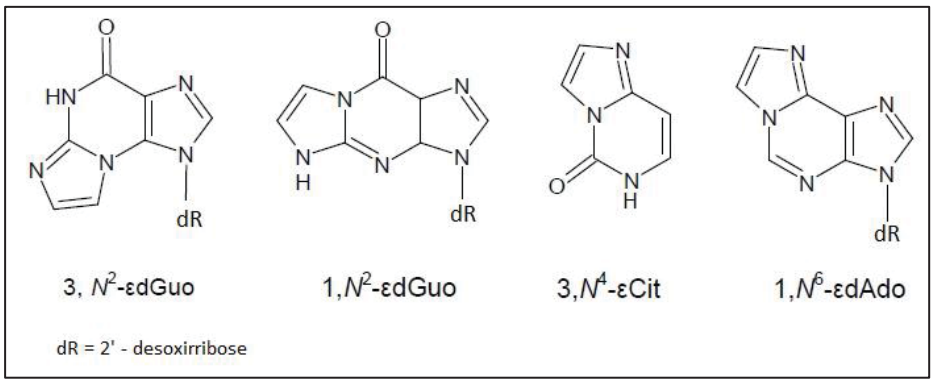
lesões oxidativas de DNA. Estima-se que o DNA de uma célula pode sofrer até um milhão de mudanças por dia. (GATES, 2009)

2.2.1 Etenoadutos exocíclicos de DNA

Os adutos exocíclicos de DNA tem sido um grupo muito estudado devido sua relação com aldeídos reativos presentes na poluição, fumaça de cigarro, contaminantes de alimentos e metabólitos gerados por alguns compostos químicos comprovadamente carcinogênicos como cloreto de vinila e o uretano (carbamato de etila) (GUENGERICH et al. 1991; BARBIN 2000; TUDEK et al. 2016). Os aldeídos apresentam propriedades eletrofílicas, por este motivo, podem reagir com as bases do DNA formando adutos de DNA que podem apresentar propriedades mutagênicas contribuindo nos processos de carcinogênese. A guanina é a base mais susceptível ao ataque eletrofílico, devido seu baixo potencial de redução, no entanto, já foram relatados a formação de adutos com todas as bases (LOUREIRO et al. 2002).

Os etenoadutos de DNA são caracterizados por um anel exocíclico de cinco membros entre átomos de nitrogênio ligados a uma base púrica ou pirimídica, contendo um grupamento amino exocíclico à base, conforme mostrado na figura 4.

Figura 4 - Estrutura química dos principais etenoadutos de DNA



Fonte: o autor (2022).

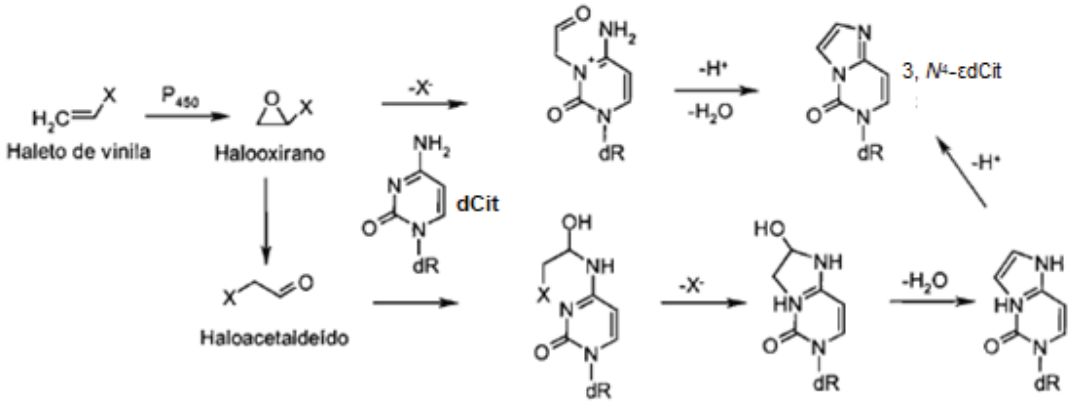
Os primeiros etenoadutos foram sintetizados por Kochetkov et al. (1971) a partir da reação do cloroacetaldeido e N-9-metiladenina e *N*-1-metilcitosina resultando na formação de 1, N^6-ε-*N*-9-metiladenina e 3, N^4-ε-*N*-1-metil-citosina, respectivamente. Posteriormente, SATTSANGI et al. (1977) descreveram a reação entre o cloroacetaldeído e a dGuo formando o etenoaduto 1, N^2-εdGuo, em meio

aquoso e pH fisiológico. Este aldeído também pode reagir diretamente com a guanina resultando na formação do 1, N^2-etenoguanina 3, N^2-etenoguanina.

As propriedades mutagênicas dos etenoadutos já estão bem estabelecidas na literatura. Foi mostrado que o 1, N^2-εdGuo é capaz de induzir a troca de G→A e G→T *in vitro,* em *E. coli* e em células de mamíferos (LANGOUET,1997; LANGOUET ,1998; AKASAKA, 1999). O 1, N^6-εdAdo induz a troca de A→G, A→T e em menor proporção A→C *in vitro.* Em células de mamíferos este aduto induz somente A→G e A→T (PANDRYA, 1996; LITINSKI, 1997; LEVINE, 2000). O 3, N^4-εdCit pode induzir a troca de C→A, C→T e C→G (in vitro) e C→A e C→T em *E. coli.* (SHIBUTANI et al. 1996)

Com relação ao mecanismo de formação dos etenoadutos, alguns aldeídos ∝-halogenados podem reagir diretamente com as bases *in vitro.* Entretanto, os aldeídos ∝,β-insaturados e os haletos de vinila precisam ser convertidos a intermediários mais reativos. Os haletos de vinila podem ser convertidos pelas enzimas do grupo citocromo P450 ao metabólito haloxirano que pode sofrer rearranjo gerando o haloacetaldeído. Os dois metabólitos produzidos são reativos e podem reagir com os nucleosídeos (figura 5).

Figura 5 - Via proposta para formação do 3, N^4-εdCit a partir do haleto de vinila



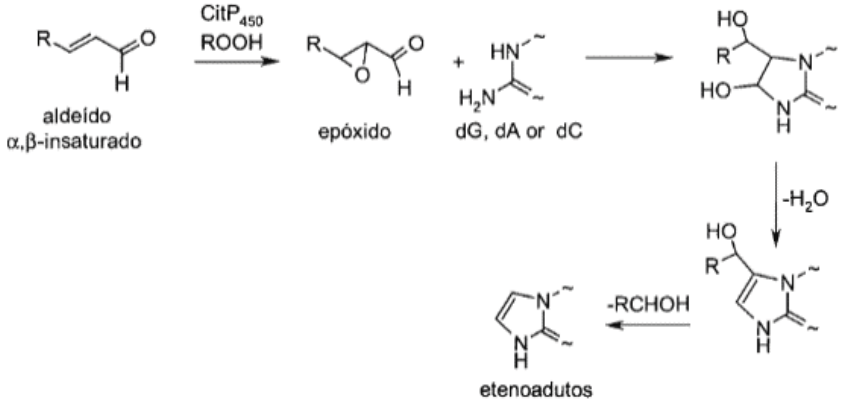
Fonte: LOUREIRO (2000). sob licença CC BY-NC 4.0

Nota: O haleto de vinila é convertido ao metabólito haloxirano pelo citocromo P450 que pode sofrer rearranjo gerando o haloacetaldeído. O haloxirano e o haloacetaldeído podem reagir diretamente com o nucleosídeo resultando na formação do etenoaduto 3, N^4-εdCit (exemplo).

Os aldeídos e ∝,β-insaturados podem ser metabolizados a epóxidos correspondentes capazes de reagir com o nucleosídeo resultando na formação de

lesões. Nair e Offerman, (1985) propuseram o mecanismo para a reação entre os epoxialdeídos e a guanina envolvendo uma adição nucleofílica no grupo amino exocíclico da base ao carbono do grupo aldeído do epóxido, em seguida o fechamento do anel, produzindo um intermediário que sofre desidratação formando o etenoaduto (figura 6).

Figura 6 - Via proposta para formação de etenoadutos a partir de aldeídos ∝,β-insaturados



Fonte: LOUREIRO (2000). sob licença CC BY-NC 4.0

Nota: Os aldeídos ∝,β-insaturados são metabolizados pelo citocromo P450 produzindo o epoxialdeído reativo; a reação entre os epoxialdeídos e a guanina envolve uma adição nucleofílica no grupo amino exocíclico da base ao carbono do grupo aldeído do epóxido, em seguida o fechamento do anel, produzindo um intermediário que sofre desidratação formando o etenoaduto.

Em 1988, Sodum e Chung, (1989) mostraram pela primeira vez que um composto formado endogenamente pode contribuir na formação dessas lesões: o *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um produto da peroxidação lipídica, após oxidação química por peróxidos ao epóxido correspondente (2,3-epoxi-4- hidroxinonenal) pode formar etenoadutos, *in vitro,* por meio da reação com os nucleosídeos dGuo e com a dAdo. Dessa forma, foi sugerido que produtos do metabolismo celular podem produzir estas lesões. Adicionalmente, El Ghissassi et al. (1995) mostraram a formação de dois etenoadutos de DNA, 1-N^6-etenoadenina e 3, N^4-etenocitosina, a partir da reação entre os produtos de lipoperoxidação e nucleobases a partir da incubação de microssomas e fígado de rato contendo indutores da lipoperoxidação.

Com o desenvolvimento de metodologias analíticas ultrassensíveis para detecção de etenoadutos de DNA utilizando técnicas de LC-MS/MS, GC-MS, HPLC/radioimunoensaio, imunoensaios, *^{32}P-postlabeling* foi possível detectar níveis

basais de etenoadutos de DNA em animais e humanos não expostos a carcinógenos. (BARTSCH et al. 1994; LOUREIRO et al. 2002; MEDEIROS, 2009). A partir disso, muito estudos buscaram encontrar produtos do metabolismo que pudessem resultar na formação dessas lesões.

O *trans, trans*-2,4-decadienal (DDE) é considerado um dos produtos mais tóxicos formado durante a peroxidação lipídica. A reação entre os epóxidos do DDE e 2'-desoxiadenosina (dAdo) ou a dGuo formam dois adutos potencialmente mutagênicos em células: 1, N^2-εdGuo e 1, N^6-εdAdo, respectivamente (LOUREIRO, 2000; LOUREIRO et al. 2002).

O monitoramento dos etenoadutos de DNA mostrou que em diversos processos inflamatórios, de infecções crônicas e estresse oxidativo ocorre o aumento dos níveis dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εdCit (LOUREIRO et al. 2002; MEDEIROS, 2009). Também foram relatados altos níveis de etenoadutos de DNA em pacientes com hemocromatose, doença de Wilson e pacientes com pancreatite crônica (NAIR et al. 1998; LOUREIRO et al. 2002). Dessa forma, busca-se cada vez mais desenvolver metodologias analíticas para detecção destes etenoadutos para estudos clínicos devido seu potencial como biomarcadores (MEDEIROS, 2009).

A detecção e quantificação do 1, N^2-εdGuo pode ser realizada em amostras *in vitro* e *in vivo* usando LC-MS/MS. Esse método permite determinar níveis basais de 1, N^2-εdGuo em DNA de timo de bezerro. Além disso, também foi desenvolvido um método para detecção simultânea de quatro adutos de DNA (8-oxodGuo, M1dGuo, 1, N^6-εdAdo, e 3, N^4-εdCit usando técnicas de cromatografia de imunoafinidade acoplado LC/ESI/MS-MS). A detecção da 8-oxo-dGuo, um dos biomarcadores de estresse oxidativo mais clássicos, juntamente com outros adutos, permite obter um maior espectro dos danos no DNA. (MEDEIROS, 2009)

Os mecanismos de defesa celular que atuam reparando essas lesões mutagênicas geralmente envolvem enzimas como as glicosilases. A enzima de reparo alquilpurina-DNA-*N*-glicosilase, presente em células de mamíferos, é capaz de reparar a lesão 1, N^6-εdAdo e 3-metiladenina. A enzima timina-DNA glicosilase que repara T no pareamento errado G:T pode reparar a lesão 3, N^4-εdCit (BARTSCH, 1999; TUDEK, 2016). Estudos mostraram que a inibição dessas enzimas de reparo certos tipos de células podem levar a um acúmulo ou persistência dos etenoadutos em seu DNA resultando em mutações. Os etenoadutos também podem ser reparados por meio do mecanismo de excisão de nucleotídeos (TUDEK et al. 2016). Outro estudo

mostrou que a proteína Alk B, uma dioxigenase, pode atuar no reparo dos etenoadutos 1, N^6-εAdo e 3, N^4-εCit em oligonucleotídeo a partir de análises de CG-MS (DENALEY et al. 2005). Além do sistema enzimático, também foi sugerido o reparo dessas lesões por meio de ROS como radical •OH (BARBATI et al. 2010) e o $^1O_2$ (MARTINEZ et al. 2018).

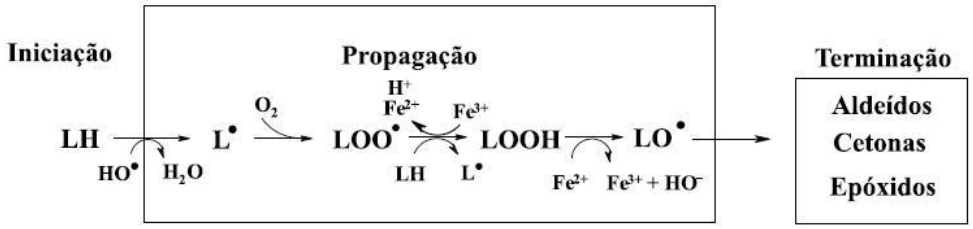
2.2.2 Peroxidação Lipídica

As membranas das células são constituídas por ácidos graxos poliinsaturados tornando-as muito susceptíveis a oxidação pelas ROS em função da presença de grupos metilênicos entre as duplas ligações. Os produtos formados por essa cascata autocatalítica, tais como aldeídos, epóxidos e cetonas, geralmente são do tipo não radicalares e, por esse motivo, são mais estáveis em relação os radicais que iniciaram o evento. Portanto, podem atingir locais mais distantes da onde se formaram e reagir com biomoléculas como o DNA favorecendo a formações de danos. (LOUREIRO et al. 2002; WEST; MARNETT, 2006)

O processo se inicia a partir da abstração do átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinsaturado na bicamada lipídica por um agente oxidante, gerando radicais lipídicos que são estabilizados por rearranjo molecular, resultando na estrutura de um dieno conjugado. Sabe-se que espécies como •OH, $HO_2^{\bullet}$, $^{\bullet}NO_2$ e $RO^{\bullet}_2$ podem desencadear esse evento. A adição de uma molécula de oxigênio ao radical formado pode levar a formação do radical peroxila que, por sua vez, pode formar hidroperóxidos através da abstração do átomo de hidrogênio de outro ácido graxo. Outros produtos também podem ser formados a partir do radical peroxila, tais como peróxidos cíclicos e endoperóxidos. Esta cascata autocatalíca só é desativada quando dois radicais reagem entre si (FIGURA 7) (YIN et al. 2011)

Vários aldeídos reativos podem ser formados como produtos secundários da peroxidação lipídica. Os mais estudados são o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (HNE) HNE e 2,4-decadienal (DDE) (LOUREIRO, 2000). Muitos estudos mostram que estes aldeídos são capazes de interagir diretamente com o DNA promovendo a formação de danos (BASU et al., 1993). Além disso os aldeídos podem ser metabolizados em epóxidos, agentes alquilantes que apresentam elevado potencial mutagênico (BASU et al. 1993).

Figura 7 - Representação geral das fases da peroxidação lipídica



Fonte: LOUREIRO (2002). sob licença CC BY-NC 4.0

Nota: Na etapa de iniciação, ocorre a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (LH) resultando na formação de um radical lipídico (L•) que é estabilizado por rearranjo molecular formando um dieno conjugado. A adição de uma molécula de O2 ao radical lipídico (L•) gera o radical peroxil (LOO•) (fase propagação). Este, se combina com um átomo de hidrogênio abstraído e resulta na formação do hidroperóxido (LOOH) que são instáveis na presença de metais e formam o radical alcoxil (LO•) ou peroxil(LOO•).

2.2.3 Oxidação de adutos de DNA

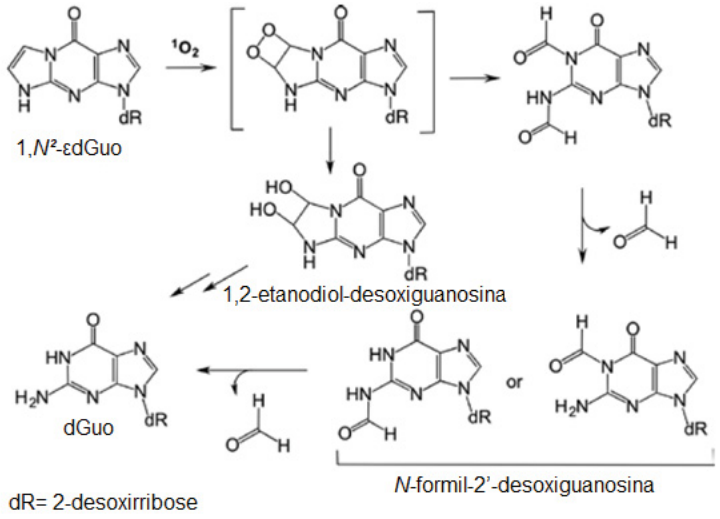
Os processos de oxidação contribuem para aumento da formação de lesões e bases oxidadas. Entretanto, alguns estudos mostram que a oxidação pode também ser um mecanismo para reverter esses danos. Os etenoadutos de DNA apresentam propriedades eletrofílicas, portanto, são muito susceptíveis a reações de oxidação, inclusive pelo $^1O_2$.

Um estudo realizado em 2005 mostrou que algumas enzimas como as oxigenases podem atuar reparando etenoadutos derivados das bases no DNA, contribuindo para uma resposta adaptativa resistente a indução de mutações geradas pelo cloreto de vinila e o cloroacetaldeído em *E. Coli*. Nesse estudo, Delaney et al. (2005) demostraram que a proteína Alk B de reparo de DNA, uma alfa-cetoglutarato dioxigenase, é capaz de converter as lesões 3,N^4-εCit e 1,N^6-εAdo nas bases citosina e adenosina, respectivamente, em oligonucleotídeos. A rota proposta para essa conversão envolve a oxidação da lesão formando um intermediário epóxido, em seguida ocorre uma hidratação pela molécula de H_2O formando o adenina-glicol. Esta última molécula é instável e se decompõe na base normal (dAdo) e glioxal, conforme mostrado na figura 8. Essa rota foi proposta por a partir da detecção dos produtos finais por *ESI* TOF-MS e CG-MS.

Além disso, outro estudo realizado por Barbati et al. (2010) investigaram e compararam a estabilidade química de dois adutos de DNA (1, N^2-propano-2'-deoxiguanosina (pdGHNE) e 1, N^2-εdGuo frente a reações de hidrólise e oxidação com o objetivo de analisar as condições que geram perda destes adutos durante os processos de extração, isolamento e digestão do DNA. Nesse trabalho foi avaliada a reação do 1, N^2-εdGuo por oxidação por um elétron utilizando o ânion radical sulfato ($SO^{4-\bullet}$) e também pelo radical hidroxila ($^{\bullet}OH$). Dessa forma, para os dois métodos de oxidação utilizados, foi possível observar o ataque a ligação dupla no anel exocíclico do etenoaduto, formando a dGuo como produto final.

Em 2018, foi publicado um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa que demonstra que o 1, N^2-εdGuo é susceptível a oxidação por $^1O_2$ resultando em três produtos principais: forma-se a própria base dGuo e um intermediário *N*-formil-2'-dGuo - produto de clivagem do dioxetano, resultante da cicloadição [2+2] do $^1O_2$ na ligação do 1, N^2-εdGuo. Também foi detectado outro produto denominado aduto 1,2-etanodiol-2'-dGuo cujo mecanismo ainda não é conhecido. Além disso, foi visto que a degradação dos produtos aduto 1,2-etanodiol-desoxiguanosina (1,2-etanodiol-dGuo) e o *N*-formil-2'-dGuo resultam na formação da dGuo, sugerindo que o $^1O_2$ pode estar atuando na restauração da dGuo, como esquematizado na figura 9 abaixo. Vale ressaltar que o mecanismo de formação do produto 1,2-etanodiol-dGuo pelo $^1O_2$ ainda não é claro, portanto, ainda são necessários mais estudos para esclarecer esse mecanismo. (MARTINEZ et al., 2018).

Figura 8 - Rota proposta de formação para os produtos de oxidação do 1, N^2-εdGuo pelo $^1O_2$



Fonte: Martinez et al. (2018)

Nota: Inicialmente o 1, N^2-εdGuo é oxidado pelo $^1O_2$ por meio da cicloadição [2+2] e resulta na formação de um intermediário dioxetano. Este, por sua vez, pode sofrer uma clivagem na ligação (O-O) e resultar na formação de duas carbonilas nas extremidades. Em seguida ocorre a perda do grupo formil, pela ação da água originando o produto *N*-formil-2'-desoxiguanosina que também pode perder o outro grupo formil resultando na formação de dGuo. O mecanismo de formação do 1,2-etanodiol-desoxiguanosina ainda não está claro.

Além disso, neste mesmo trabalho, também foram determinadas as constantes de desativação total (k_t) do $^1O_2$ com a finalidade de demostrar a significância biológica da reação dos etenoadutos com o $^1O_2$. A k_t da dGuo em D_2O é de 5,39 x10^6 $M^{-1}s^{-1}$, muito próximo ao valor da k_t da lesão do 1, N^2-εdGuo 2.35 x10^6 $M^{-1}s^{-1}$. Esses valores próximos indicam que o $^1O_2$ não vai ter uma preferência significativa para reagir entre a base normal ou a lesão.

TABELA 1 - Constantes de desativação total do $^1O_2$ (k_t)

Composto	k_t (x10^6 $M^{-1}s^{-1}$)
dGuo	5.39
1, N^2-εdGuo	2.35
1, N^6-εdAdo	4.38
3, N^4-εCit	2.66

Fonte: Adaptado de MARTINEZ et al. (2018)

2.3 Reações de oxidação no DNA

2.3.1 Oxidação da guanina

No DNA, o $^1O_2$ é capaz de reagir com a base guanina devido seu o menor potencial de redução resultando na formação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'desoxiguanosina (8-oxoGuo) como produto principal, um importante biomarcador de estresse oxidativo no DNA. Sugere-se que essa reação ocorre devido ao ataque do $^1O_2$ no anel imidazol da guanina por meio da cicloadição [4+2] (SHEU e FOOTE, 1993; RAVANAT e CADET, 1995). Além disso, é importante ressaltar que essa base oxidada pode ser também produzida em outros processos oxidativos e espécies reativas, incluindo oxidação por um elétron, radical hidroxila e peroxinitrito (CADET et al., 1997). Uma das consequências envolvidas com a presença da 8-oxodGuo é a mutagênese relacionada a capacidade de realizar a transversão G:C para T:A, ou seja, a incorporação desta lesão no DNA resulta no pareamento com a adenina ao invés da citosina (BOITEUX et al., 1992).

Foram realizados estudos sobre a oxidação do DNA pelo $^1O_2$ a partir da marcação com o isótopo ^{18}O presente no endoperóxido de naftaleno – gerador de $^{18}[^1O_2]$. Foi mostrado, utilizando técnicas de espectrometria de massas, que a 8-oxodGuo é um produto exclusivo obtido no DNA isolado. Além disso esse produto também pode ser formado pela reação da guanina com $^1O_2$ no meio celular (MARTINEZ et al. 2000, MARTINEZ 2003; RAVANAT et al. 2001; RANAVAT et al. 2012).

2.3.2 Oxidação da 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxodGuo)

Na literatura existem informações mostrando que os produtos de oxidação de nucleosídeos livre ou inseridos no DNA, dependem diretamente das condições de reação empregadas: a oxidação por um elétron da 8-oxodGuo inserida no oligonucleosídeo na presença de $IrCl_6^{2-}$ resultou na formação da guanidinohidantoína (Gh) como produto final quando a reação foi submetida a 4ºC (LEIPOLD et al, 2000). Além disso, foi observado que nas condições do nucleosídeo livre existe uma forte dependência do pH: no pH <7, o principal produto é a Gh. Em contrapartida em pH < 7, o Sp forma-se predominantemente. (LUO, 2001). No contexto do DNA, a oxidação

pelo $^1O_2$ da 8-oxodGuo resulta como produto de decomposição final o ácido oxalúrico, enquanto, em solução aquosa, a oxidação do nucleosídeo livre 8-oxodGuo resulta em uma mistura de vários produtos (DUARTE et al., 2000).

Para obter mais informações sobre os mecanismos envolvidos na oxidação da 8-oxodGuo pelo $^1O_2$, Martinez et al. (2005) identificaram os principais produtos de oxidação do 8-metoxi-2'-desoxiguanosina (MeOdGuo) pelo $^1O_2$. O aduto MeOdGuo foi usado como modelo químico representando a forma enólica da 8-oxodGuo- que está em equilíbrio com a forma ceto-, com a finalidade de comparar a distribuição dos produtos dos dois nucleosídeos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a oxidação do MeOdGuo pelo $^1O_2$ resultam na formação de derivados do nucleosídeo como 2,2,4-triamino-5-(2H) -oxazolona, 2,5-diamino-4H-imidazol-4-ona. Além disso, também derivados substituídos do Sp, iminoalantoína e uréia oxidadas. Por outro lado, foi visto que a oxidação do MeOdGuo inserido no oligonucleosídeo gera como produto de decomposição final a imidazolona, predominantemente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

Para a síntese dos etenoadutos foi utilizada 2'-desoxiadenosina, citosina e cloroacetaldeído 37% (v/v) da Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA); Fosfato de sódio monobásico da Synth (Diadema, SP, Brasil) para aquecimento e agitação foi usado o Thermo Finemixer – SH2000-DX - FINEPCR. Para as análises de HPLC foi usado o HPLC (*Shimadzu*, LC-20AD) com detector PDA (SPD-M20A) e o espectrômetro de massas Ion Trap (*Amazon Speed, Bruker*). Foram utilizados os solventes metanol grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha) e os padrões comerciais de 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit da Sigma- Aldrich; A água ultrapura foi obtida por um sistema da GEHAKA (São Paulo, Brasil). Para as análises de estabilidade foi usada a estufa adquirida da Panasonic Healthcare Co (USA). Para eliminação de solventes e água foi usado o liofilizador da *Edwards Super Modulyo*. A síntese do $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$ foi realizada pela Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez na Universidade de São Paulo (USP). A pureza e a concentração das soluções foram obtidas medindo a diferença da absorbância antes após a termólise do endoperóxido por 2,5h à 37°C, utilizando o coeficiente de absortividade molar do DHPN (ε_{288}= 7780 $cm^{-1}.mol^{-1}.L$) (PIERLOT et al. 2000). Para caracterização das moléculas também foi usado o espectrômetro Bruker® Ascendde 600 MHz.

3.2 Síntese dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit

Para realizar a síntese de cada um dos etenoadutos, foram pesados aproximadamente 1 mg do nucleosídeo ou base normal (dAdo ou citosina) em um microtubo e solubilizados em 2 mL solução tampão fosfato 50mM com pH ajustado para 6,5. Em seguida, foi adicionado 20µL de cloroacetaldeído 37% (v/v). Essa solução foi submetida à agitação a 37ºC por 24 horas. (SATTSANGI et al., 1977; LI et al., 2002). Em seguida, a solução de síntese foi liofilizada e resusspendida em 500 µL de água ultrapura para a pré-purificação descrita a seguir.

3.2.1 Pré-purificação por extração em fase sólida (SPE)

Com o objetivo de facilitar a purificação dos adutos por HPLC, as amostras da síntese foram pré-purificadas por extração em fase sólida (SPE) em colunas C18 Bond Elut 1g, com 6 mL de capacidade (*Agilent Technologies*), conforme descrito por Loureiro, (2000). Para SPE, as colunas foram equilibradas com 6 mL de metanol (MetOH) 100 % e 6 mL de água ultrapura. Em seguida foi adicionado 250 µL da reação de síntese e foi feita a seguinte sequência de solventes para eluição dos produtos: 1 mL de água, 3 mL MetOH 2%, 3 mL MetOH 5%, 6 mL MetOH 10%, 6 mL MetOH 20%, 6 mL MetOH 80% e 6 mL MetOH 100%. Apenas as frações de 10 e 20% foram coletadas e liofilizadas para posterior purificação por HPLC-PDA utilizando os métodos que estão descritos no próximo item. A concentração de cada etenoaduto foi calculada a partir do coeficiente de absortividade molar (ε). Para o 3, N^4-εCit ε_{272}= 12000 $cm^{-1}.mol^{-1}.L$ (LI et al. 2015). Para o 1, N^6-εAdo ε_{260}= 10300 $cm^{-1}.mol^{-1}.L$ (CARVALHO, 2000).

3.1.1 Padronização da detecção por HPLC-PDA

Para a padronização dos métodos, foram utilizados padrões comerciais dos etenoadutos (1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit). Em seguida, foi realizada a purificação das reações de síntese por HPLC-PDA com as metodologias descritas a seguir (item 3.1.1.1 e 3.1.1.2).

3.1.1.1 1, N^6-εdAdo e seus produtos de oxidação

A análise foi conduzida no (HPLC (*Shimadzu*, LC-20AD) com detector PDA (SPD-M20A). Para a eluição do etenoaduto e seus produtos de oxidação foi realizada uma adaptação da metodologia descrita por Carvalho et al. (2000). Foi realizada uma cromatografia em fase reversa utilizando uma coluna Luna C18 (*Phenomenex* Luna 250 x 10 mm, tamanho de partícula de 5 µm) com fluxo de 1,5 mL/min. O detector foi programado para faixa de 200nm até 750nm. A eluição do 1, N^6-εdAdo foi feita utilizando um gradiente de água ultrapura (A) e MetOH (B), iniciando em 0-5min, 15%B; 5-40min, 30%B; 45min,15%B; 60min, 15%B. Esse método foi utilizado para análise e para purificação do etenoaduto 1, N^6-εdAdo.

3.1.1.2 3, N^4-εCit e seus produtos de oxidação

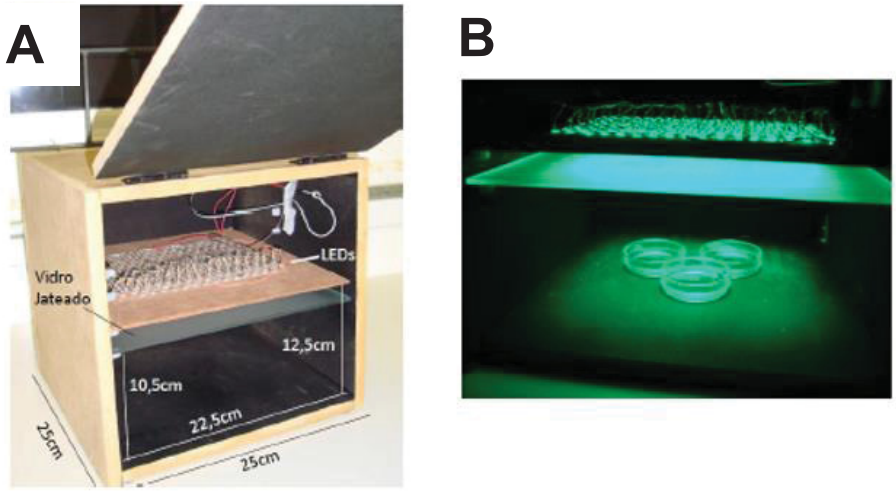
A análise foi conduzida no (HPLC – *Shimadzu,* LC-20AD) a partir da adaptação do método de Sun et al. (2006). Para a eluição do etenoaduto foi realizada uma cromatografia em fase reversa utilizando uma coluna analítica C18 (Agilent Technologies - 250 x 4.6 mm, tamanho de partícula de 5 µm). A eluição do etenoaduto foi realizada em condição isocrática de 5% MetOH em água ultrapura com fluxo 0,8 mL/min, com detecção programada faixa de 200 a 750nm no detector PDA.

Para purificação do etenoaduto 3, N^4-εCit, o método foi adaptado para uma coluna semipreparativa utilizando a mesma condição cromatográfica (isocrático 5% MetOH em água ultrapura) com a coluna Luna C18 (*Phenomenex* 250 x 10 mm, tamanho de partícula de 5 µm) com fluxo de 2,7 mL/min.

3.2 Foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit

Para a oxidação dos etenoadutos de DNA foi utilizada a metodologia semelhante à descrita por MARTINEZ et al. (2018). A geração de $^1O_2$ foi por meio da fotossensibilização tipo II em água deuterada (D_2O) ou em água ultrapura (H_2O). Sendo assim, foram incubadas soluções aquosas de 1 mmol/L de cada etenoaduto separadamente contendo rosa bengala 40 µmol/L. Em seguida, todas as soluções foram submetidas a irradiação por 115 min em uma câmera de LEDs verdes com pico de emissão em 526 ± 20 nm, construída pela Doutora Andréia Akemi Suzukawa (Departamento de Bioquímica – UFPR) (figura 10), com superfície de irradiação de 13 x 10 cm, com intensidade média de 1,67 ± 0,13 mW/cm^2. Esse tempo é suficiente para gerar cerca de 3 mmol/L de $^1O_2$ (PERES, 2016). Após a irradiação, a reação foi imediatamente analisada por HPLC-PDA. Durante todo o experimento, tanto a reação de fotossensibilização quanto os controles foram cuidadosamente protegidos da luz. As condições para as análises no HPLC-PDA foram as descritas no item 3.1.1.

Figura 9 - Caixa de irradiação usada para geração de $^1O_2$



Fonte: SUZUKAWA, (2012)
Nota: (A) Esquema com as dimensões e disposição dos componentes utilizados no aparato usado para irradiação das amostras. (B) Presença do vidro texturizado entre a fonte luminosa e as amostras para melhorar a homogeneidade da luz.

3.2.1 Caracterização dos produtos de foto-oxidação por infusão direta (ION TRAP)

Os produtos identificados na reação foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit foram purificados e isolados por HPLC-PDA em escala semipreparativa utilizando as respectivas metodologias de detecção descritas no item 3.1.1. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e congeladas a -80°C. Para análise de caracterização no espectrômetro de massas Ion Trap (*Amazon Speed, Bruker*). Para esta análise, as amostras foram ressuspendidas em uma solução de ácido fórmico 0,25% e metanol 1:1 com o objetivo de melhorar a ionização das moléculas. As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (*ESI*+, $[M+H]^+$), utilizando os seguintes parâmetros otimizados: gás de interface (CUR), 15 psi; gás de nebulização (GS1), 45 psi; gás na fonte de íons (GS2), 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão (CAD), LOW; temperatura da fonte do ESI (TEM), 650 ºC; potencial de entrada (EP), 10 V; tensão do spray de íons (IS), 5500 V (MARTINEZ et al. 2018).

3.2.2 Estabilidade dos produtos de foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit

Para avaliar a estabilidade dos produtos gerados pela foto-oxidação, cada reação foi incubada em uma estufa a 37°C. Para o 1, N^6-εdAdo foram retiradas alíquotas nos tempos de 6 e 24 horas e para o 3, N^4-εCit a estabilidade foi avaliada em 24 e 48 horas de incubação. Em seguida, foram injetadas 20µL de cada amostra no HPLC-PDA, analisadas com suas respectivas metodologias padronizadas descritas anteriormente (item 3.1.1).

3.2.3 Caracterização por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS foram conduzidas utilizando o sistema HPLC-ESI-MS/MS (HPLC, *Shimadzu* LC-20AD; espectrômetro de massas Ion-Trap - *Amazon Speed Brucker*). Foi realizada uma cromatografia em fase reversa utilizando uma coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 3,0 µm, 100A; Phenomenex) com pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA). A eluição dos produtos foi feita utilizando formiato de amônio 25mM (solução A) e metanol (solução B), a 35ºC, com fluxo de 0,45mL/min.

- **1, N^6-εdAdo:** 0-15min, 5%B;10-15min, 5-60%B; 15-20min,60%B; 23-30min, 5%B).
- **3, N^4-εCit:** 0-15min, 5-60%B; 15-20min, 60%B; 20-23min,60-5%B; 23-30min, 5%B).

Para investigar se formaram outros produtos na reação foi utilizado para análise o modo *Product Íon Scan* que permite fragmentar até 10 íons precursores durante a corrida cromatográfica. O *range* utilizado para o 1, N^6-εAdo foi de 50-350 *m/z* e para o 3, N^4-εCit foi de 50-250. Com os dados obtidos na análise, por meio do software *DataAnalysis*, é possível extrair os íons encontrados na amostra para gerar um cromatograma de acordo com a *m/z* no modo Cromatograma de Extração do Íon (EIC). As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo (*ESI*+, $[M+H]^+$), utilizando os seguintes parâmetros otimizados: gás de interface (CUR), 15 psi; gás de nebulização (GS1), 45 psi; gás na fonte de íons (GS2), 50 psi;

gás de dissociação induzida por colisão (CAD), LOW; temperatura da fonte do ESI (TEM), 650 ºC; potencial de entrada (EP), 10 V; tensão do spray de íons (IS), 5500 V (MARTINEZ et al. 2018).

3.3 Foto-oxidação dos etenoadutos 1, N^6-εdAdo e 3, N^4-εCit em $H_2{}^{18}O$

Foram incubadas soluções aquosas de 1 mmol/L de cada etenoaduto previamente liofilizadas, separadamente. Em seguida, foi adicionada a $H_2{}^{18}O$ e rosa bengala 40 µmol/L. As soluções foram borbulhadas com O_2 e submetidas a irradiação por 115 min em uma câmera de LEDs verdes com pico de emissão em 526 ± 20 nm. Após a irradiação, 40µL das soluções foram injetadas no HPLC-MS/MS. Durante todo o experimento, tanto a reação de fotossensibilização quanto os controles foram cuidadosamente protegidos da luz. Cada etenoaduto foi analisado no HPLC-MS/MS com suas respectivas metodologias padronizadas descritas anteriormente.

3.4 Reação dos etenoadutos com $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$

Foram preparadas soluções de 10 mmol/L de $DHPN^{16}O_2$ ou $DHPN^{18}O_2$ em D_2O e incubadas com 1 mmol/L de 3, N^4-εCit ou 1, N^6-εAdo**.** As soluções foram borbulhadas utilizando gás N_2. Em seguida, as amostras foram submetidas a termodecomposição à 37°C por 120min em um agitador térmico. Foram retiradas alíquotas da reação nos tempos de 15, 30 ,60 ,90 e 120min para injeção LC-MS/MS para análise cinética. Na reação com o $DHPN^{16}O_2$ foram injetados 40µL de amostra e na reação com o $DHPN^{18}O_2$ foram injetadas 95µL.

3.5 Caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise estrutural das amostras purificadas por RMN ^1H e HSQC foi realizada no laboratório LabRMN-DQUI, do Centro de RMN do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, com a colaboração do professor Dr. Guilherme Lanzi Sassaki, utilizando um espectrômetro Bruker® Ascendde 600 MHz**.** Para a análise, as amostras foram solubilizadas em água deuterada Merck®.

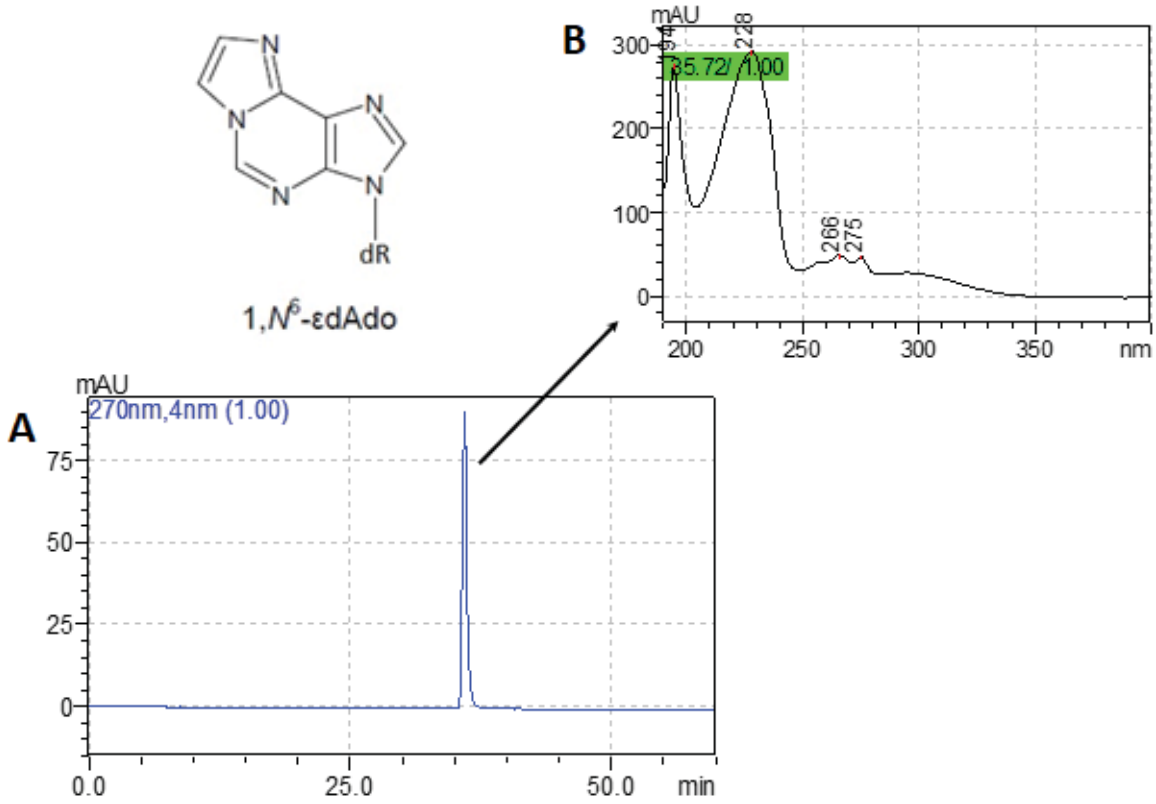
4 RESULTADOS

4.1 Oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina pelo oxigênio singlete

4.1.1 Detecção do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina por HPLC-PDA

Aplicando as condições cromatográficas descritas em materiais e métodos (3.1.1), foi obtido como resultado o cromatograma da detecção do 1, N^6-εdAdo previamente purificado por HPLC-PDA apresentado na figura 11 abaixo. O cromatograma mostra um único pico referente ao etenoaduto 1, N^6-εdAdo eluindo no tempo de retenção de 36 min, com o espectro de absorção característico dessa molécula de acordo com o espectro mostrado no trabalho de Carvalho et al. (1998), contendo um pico maior de absorção em 228nm.

Figura 10- Padronização da detecção do 1, N^6-εdAdo por HPLC-PDA



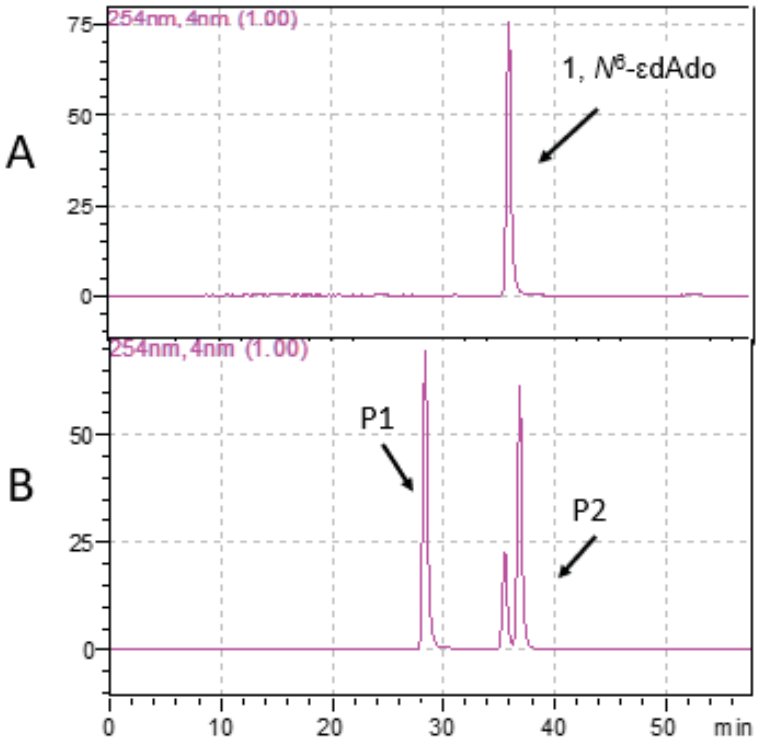
Fonte: O autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma da padronização da detecção do 1, N^6-εdAdo (B) Espectro de absorção do 1, N^6-εdAdo obtido em 270 nm.

4.1.2 Análise e caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina

Para foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo, o etenoaduto foi incubado com o rosa bengala em D_2O ou em H_2O e submetido a irradiação por 115 min para geração de $^1O_2$. A figura 12 (A) representa o controle da reação que corresponde ao etenoaduto (1, N^6-εdAdo) sem o rosa bengala, submetido a irradiação, isto é, sem a reação com o $^1O_2$. A figura 12 (B) abaixo corresponde a reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ em D_2O. Observa-se na reação a formação de dois produtos principais no tempo de 29 e 37 min, denominados P1 e P2, respectivamente. O pico eluído no tempo de 36 min corresponde ao 1, N^6-εdAdo que sobrou da reação. Os espectros de absorção foram extraídos conforme mostrado na figura 13, o P1 apresentou um pico absorção em 259 nm, e o P2 em 273nm.

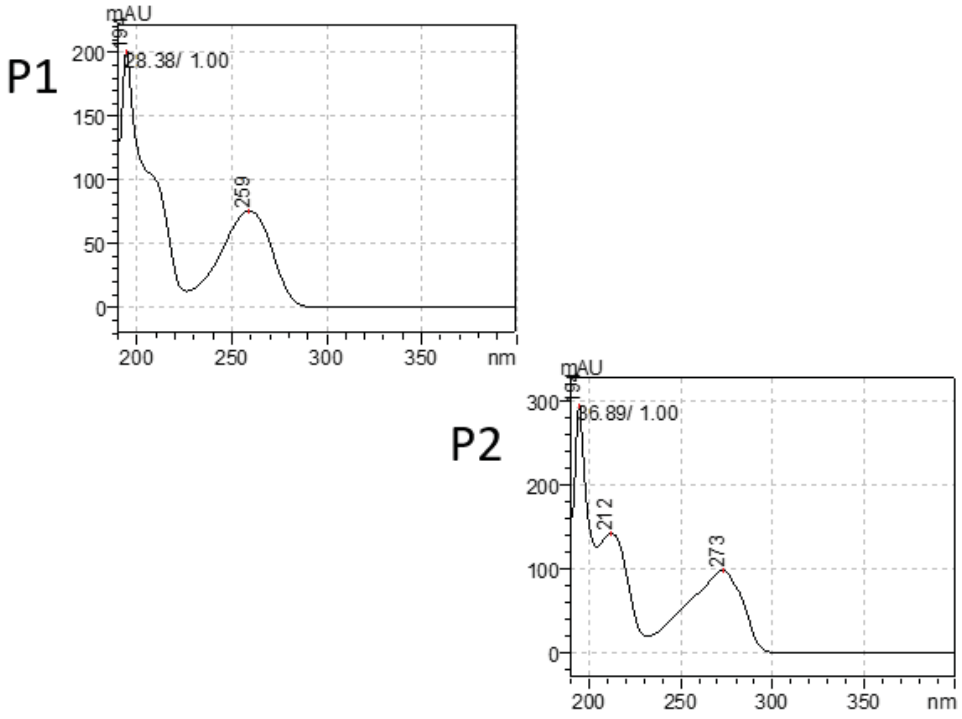
Figura 11 – Reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em D_2O



Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma correspondente ao controle da reação: solução 1 mmol/L de 1, N^6-εAdo em D_2O (sem a reação com o $^1O_2$.). (B) Cromatograma da reação de fotossensibilização do 1, N^6-εAdo com o $^1O_2$ obtido em 254nm.

Figura 12 - Espectro de absorção dos produtos da oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$

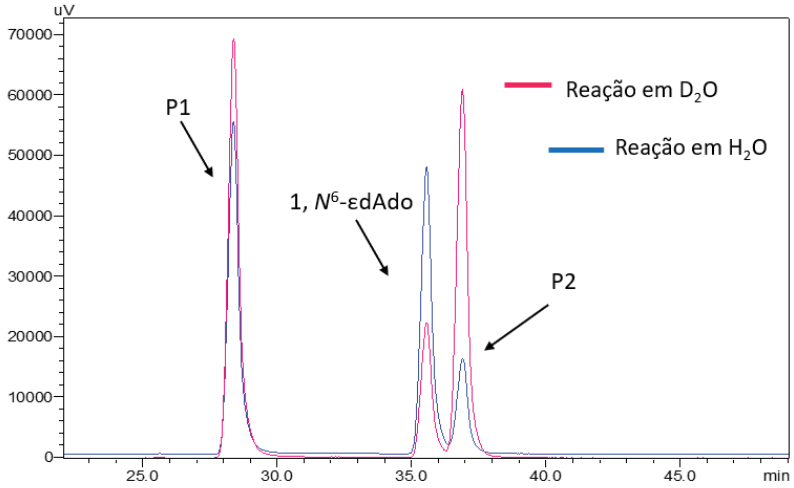


Fonte: O autor (2022).

Nota: Os espectros de absorção dos produtos P1 e P2 foram extraídos dos picos do cromatograma da figura 12 com tempos de retenção de 29 min e 37 min, respectivamente.

A mesma reação foi realizada em H_2O a fim de verificar se o resultado seria reproduzido. Os resultados estão mostrados na figura 14. De acordo com os dados, ocorreu a formação dos mesmos produtos, confirmados pelos espectros de absorção, entretanto, em menor quantidade comparado com a reação em D_2O, devido o menor rendimento de $^1O_2$ na reação.

Figura 13 - Comparação do perfil da reação de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo em D_2O e H_2O



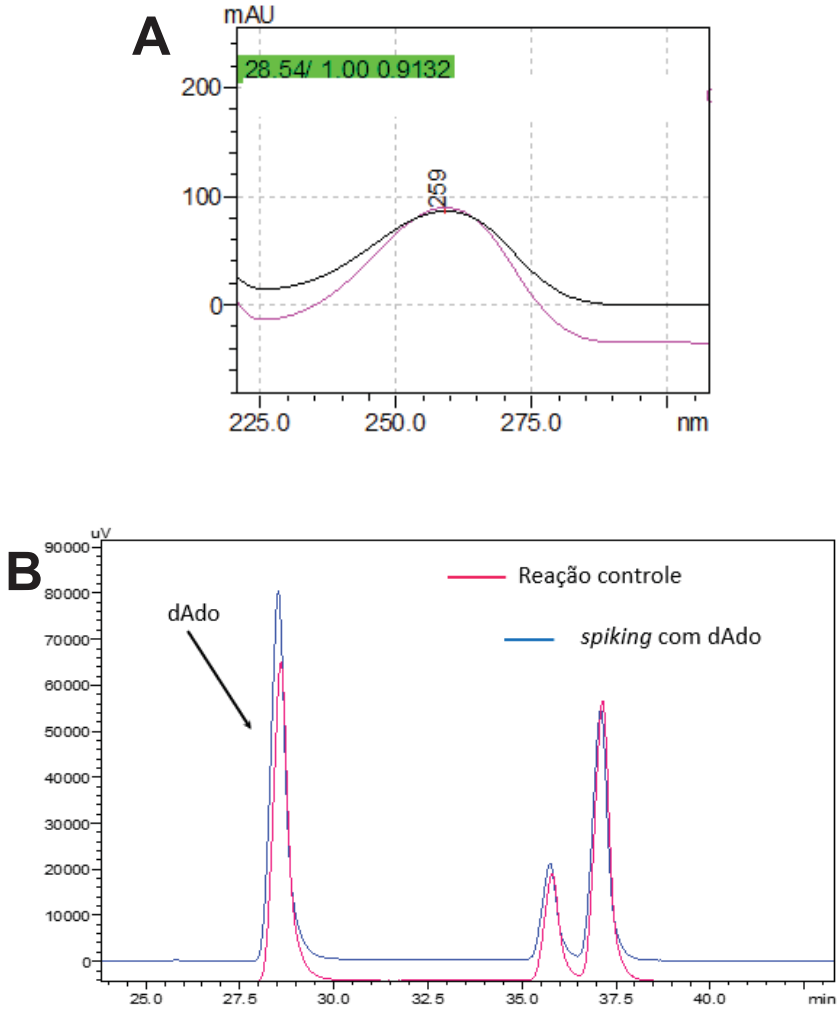
Fonte: O autor (2022).

Nota: Sobreposição de cromatogramas. A linha rosa corresponde a reação de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo pelo $^1O_2$ em D_2O e a linha azul corresponde a reação de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo pelo $^1O_2$ em H_2O

O produto P1 formado na reação de oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo pelo $^1O_2$, cuja eluição foi em aproximadamente 29 min, apresentou um pico com o tempo de retenção e espectro de absorção semelhante ao padrão nucleosídeo dAdo (figura 15 A), dessa forma foi realizado um *spiking* da reação com uma solução padrão de dAdo (0,5mM) para confirmação da presença do nucleosídeo formado na reação.

Como resultado, mostrado da figura 15 (B), podemos observar a sobreposição de dois cromatogramas: em rosa a reação controle (sem *o spiking*) e em azul a reação com o spiking de dAdo. De acordo com o cromatograma, no primeiro pico eluído, com tempo de retenção em 29 min, observa-se um aumento da área somente desse pico após o spiking, sugerindo que o pico corresponde a dAdo.

Figura 14 - Cromatograma de *spiking* com dAdo



Fonte: O autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição dos espectros de absorção do padrão comercial de dAdo (em rosa) e do P2 extraído do cromatograma da figura 12 em 28 min (B)Sobreposição de cromatogramas. Em rosa corresponde a reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ controle (sem spiking). Em azul corresponde a reação com o *spiking* de dAdo.

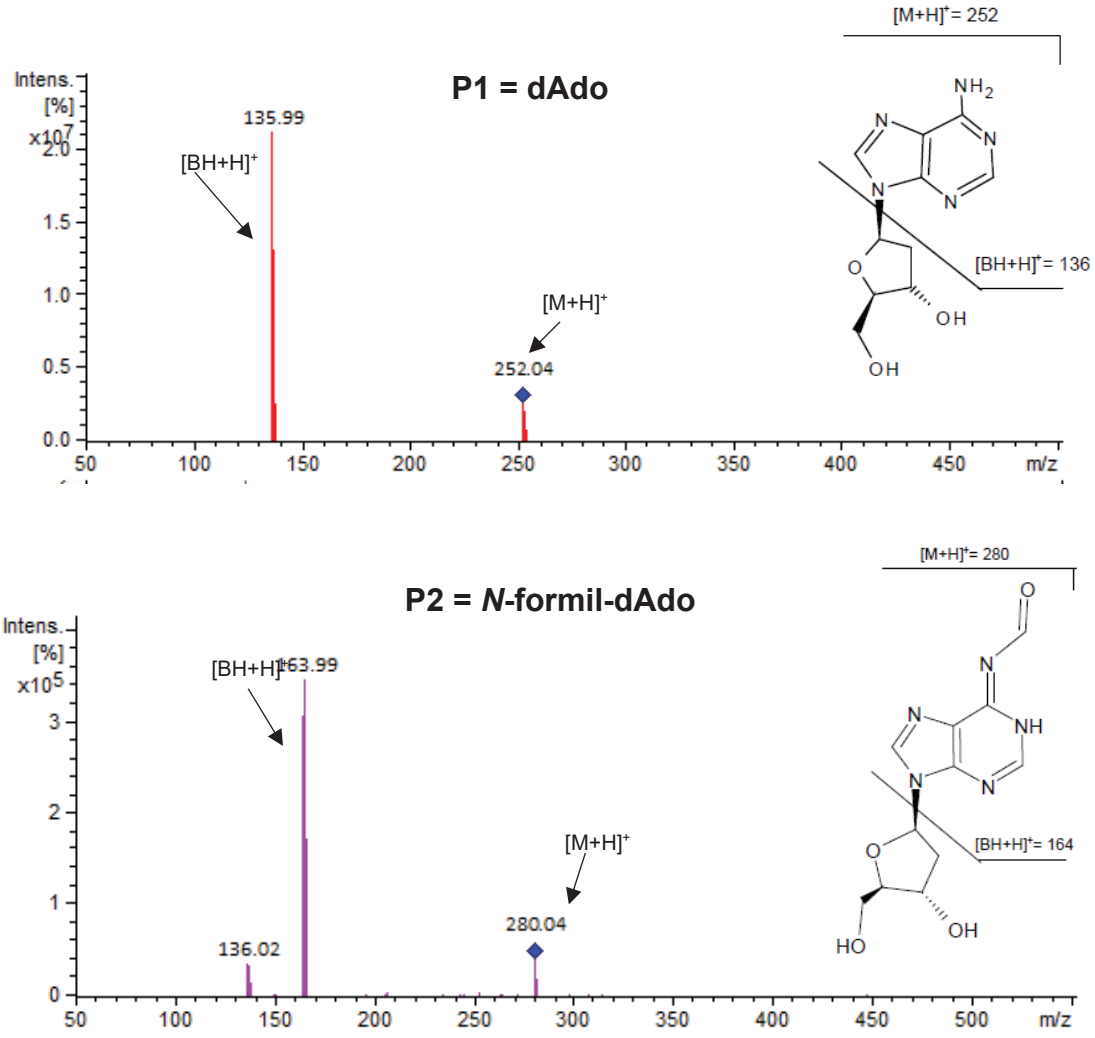
4.1.3 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina por infusão direta (Ion-Trap)

Para caracterizar o P1 e o P2 formados na reação, foi realizada a purificação por HPLC-PDA desses produtos em escala semipreparativa. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e enviadas para USP para análise de infusão direta no *ION TRAP (Amazon Speed Brucker*), modo *ESI+.*

O pico P1, com o tempo de retenção em 28 min, cujo espectro de absorção é semelhante ao nucleosídeo dAdo apresentou um íon *m/z* 252 que corresponde a massa da dAdo referente a molécula protonada $[M+H]^+$ com um fragmento resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose em *m/z* 136, referente a base protonada $[BH+H]^+$ (Figura 16).

O pico P2, com o tempo de retenção em 37 min, com espectro de absorção característico em 273 nm (Figura 13), apresentou um íon com *m/z* 280, referente a molécula protonada $[M+H]^+$, que corresponde a um incremento *m/z* 28 em relação a dAdo (*m/z* 252), ou seja, a presença de uma carbonila (C=O) na molécula dAdo. Além disso, a fragmentação do íon *m/z* 280 gerou em um fragmento *m/z* 164, referente a base protonada $[BH+H]^+$ correspondente a perda da 2'-desoxirribose (Figura 16). A partir destes resultados foi possível deduzir as estruturas para estes dois produtos.

Figura 15 - Espectro de massa dos produtos da foto-oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo purificados por HPLC-PDA



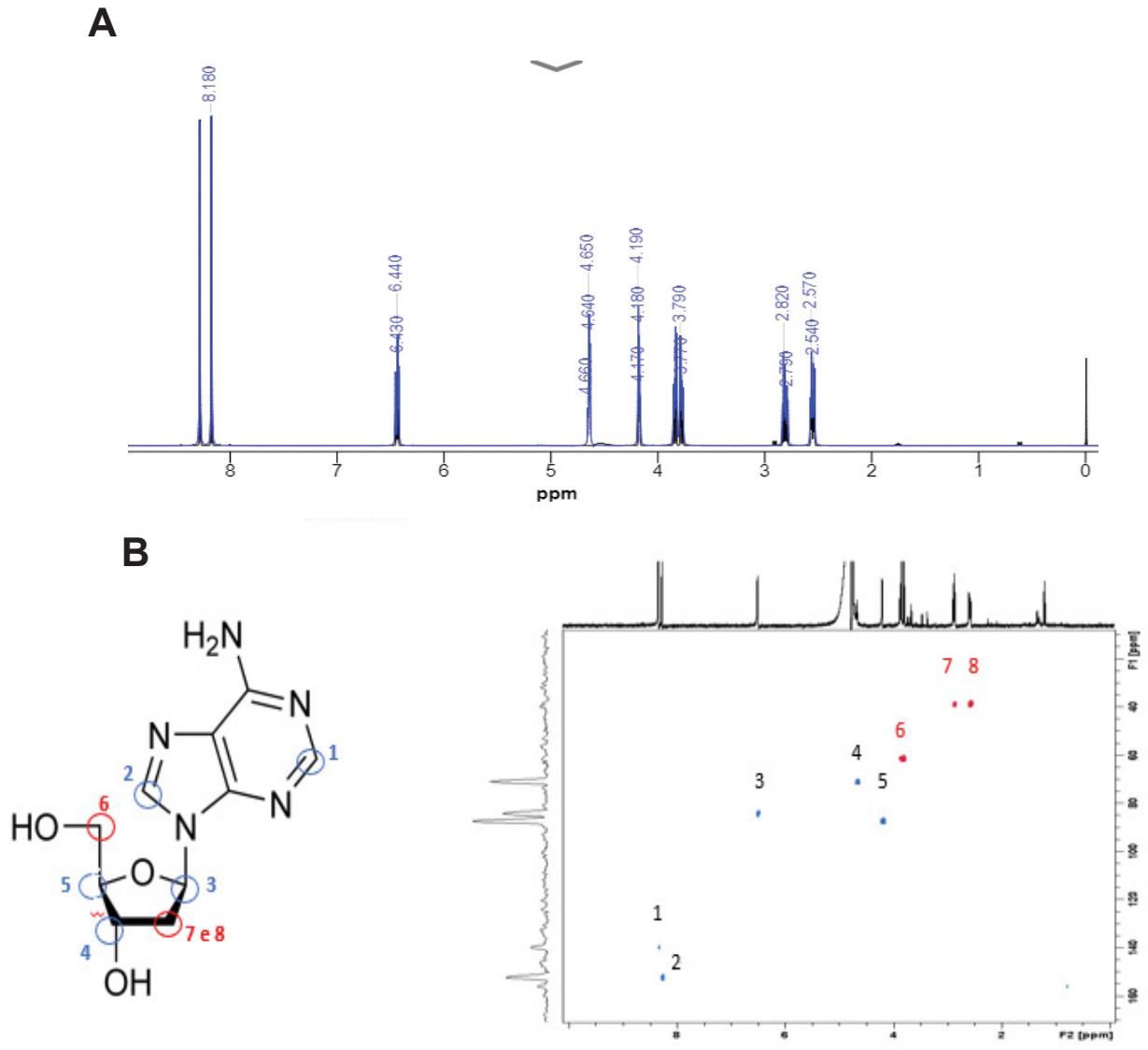
Fonte: o autor (2022).

Nota: Espectro de massas obtido pela análise de infusão direta modo *ESI* + dos produtos de foto-oxidação do 1, *N*^{6}-εdAdo (P1 e P2) purificados por HPLC-PDA. O P1 foi identificado como dAdo e o P2 como *N*-formil-dAdo.

4.1.4 Caracterização do produto P1 de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina por RMN

A confirmação da presença de dAdo como produto da reação também foi feita por RMN. Para isso, a reação foi realizada em maior escala e o P1 (com eluição em 29 min) foi purificado por HPLC-PDA utilizando uma coluna semipreparativa. Em seguida a amostra foi liofilizada e resusspendida em D_2O para análise de ^1H e HSQC no RMN 600Hz. Os espectros estão mostrados na figura 17.

Figura 16 - Espectro ^1H e HSQC do P1 do 1, N^6-εdAdo



Fonte: o autor (2022).
Nota: (A) Espectro 1H RMN do P1 do 1, N^6-εdAdo (B) HSQC do 1, N^6-εdAdo

Tabela 2 - Deslocamentos químicos no espectro ^{1}H RMN do P1 do 1, N^6-εdAdo em D_2O

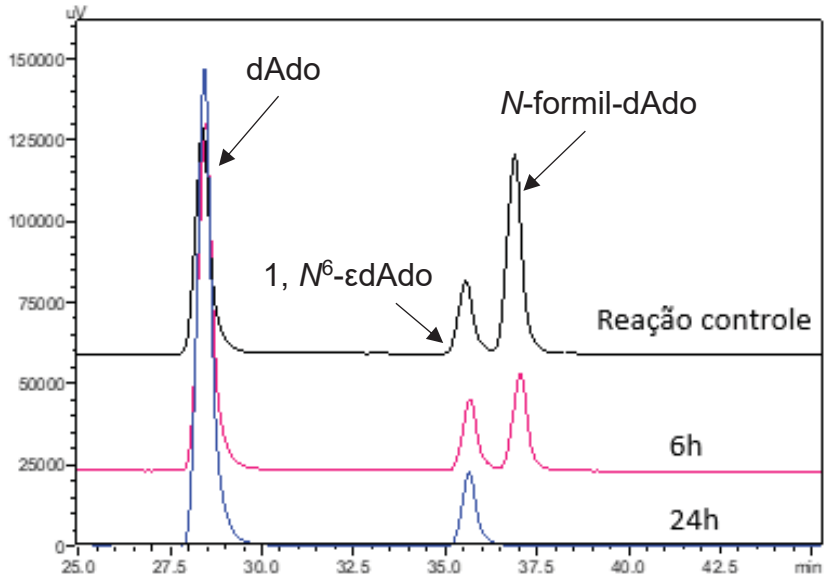
Identificação	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade
1	8.10	s
2	8.18	s
3	6.29	td
4	4.08	m
5	3.79	d
6	3.49	dt
7	2.82	m
8	2.57	m

*s=singleto; d= dupleto m=multipleto; t= tripleto; dt=duplo tripleto; td=triplo dupleto

4.1.5 Análise da estabilidade dos produtos de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina por HPLC-PDA

Para avaliar a estabilidade dos produtos formados após a foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ a reação foi incubada por 24h a 37°C. Também foi retirada uma alíquota em 6h de incubação. De acordo com os resultados mostrados na figura 18 abaixo, observa-se os cromatogramas da cinética de incubação. Os picos em 29 e 37 min correspondem aos produtos da reação: dAdo e *N*-formil-dAdo. O pico em 36 min corresponde ao 1, N^6-εdAdo que sobrou da reação. A partir deste resultado, foi mostrado que em 6h de incubação da reação a 37°C ocorre a redução da área do pico do *N*-formil-dAdo e, em 24 h, este produto não é mais detectado. Em contrapartida, conforme aumenta o tempo de incubação, ocorre o aumento da área do pico correspondente a dAdo, sugerindo que o *N*-formil-dAdo está se decompondo a 37°C formando a dAdo como produto final.

Figura 17 - Análise da estabilidade dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo



Fonte: o autor (2022).

Nota: Cromatogramas referentes a cinética de incubação da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo. A reação controle (linha preta) corresponde reação controle (sem a incubação). A linha rosa corresponde a reação com 6h de incubação e a linha em azul 24 horas de incubação a 37°C.

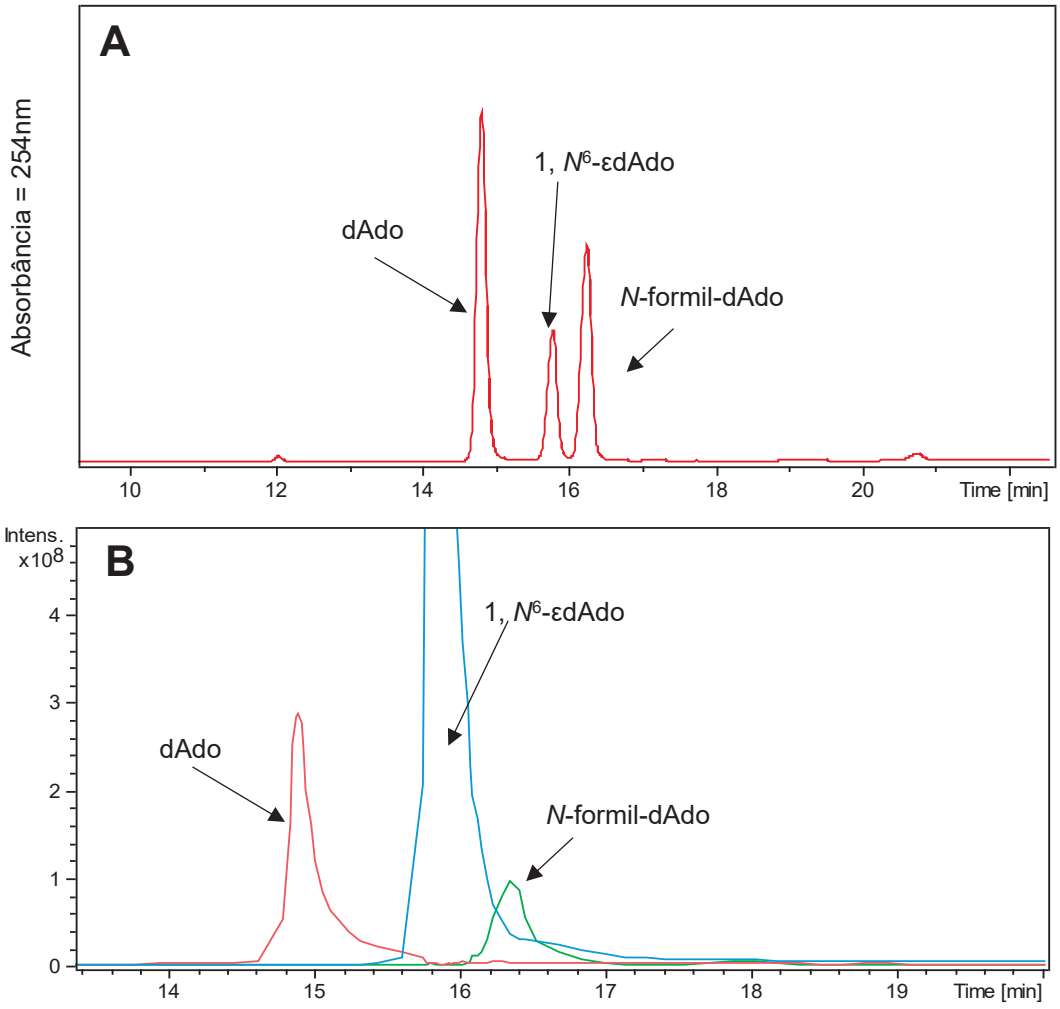
4.1.6 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina por LC-MS/MS

Para confirmação dos resultados anteriores e também buscar outros produtos que não podem ser detectados por HPLC-PDA, realizou-se a análise de LC-MS/MS da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo. Para isso, o etenoaduto foi incubado com o rosa bengala e submetido a irradiação por 115 min para geração de $^1O_2$. Além das análises de massas, também foi realizado em paralelo o monitoramento da reação utilizando o detector UV em 254nm.

De acordo com os dados obtidos, observa-se na reação a formação de dois produtos principais pelo $^1O_2$ no cromatograma gerado pelo detector UV 254nm nos tempos de retenção de 14.9 e 16.1 min (figura 19 A), resultado semelhante a análise feita com HPLC-PDA. Vale ressaltar que ocorreram algumas mudanças com relação ao tempo de retenção dos produtos decorrente da alteração das condições cromatográficas, tais como equipamento, fase móvel e da coluna utilizada. Entretanto, a ordem de eluição permanece a mesma.

Também foram extraídos os cromatogramas com base no *m/z* de cada um destes produtos, que correspondem aos mesmos produtos detectados no HPLC-PDA (dAdo e o *N*-formil-dAdo) (figura 19 B).

Figura 18 - Cromatograma UV e espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo



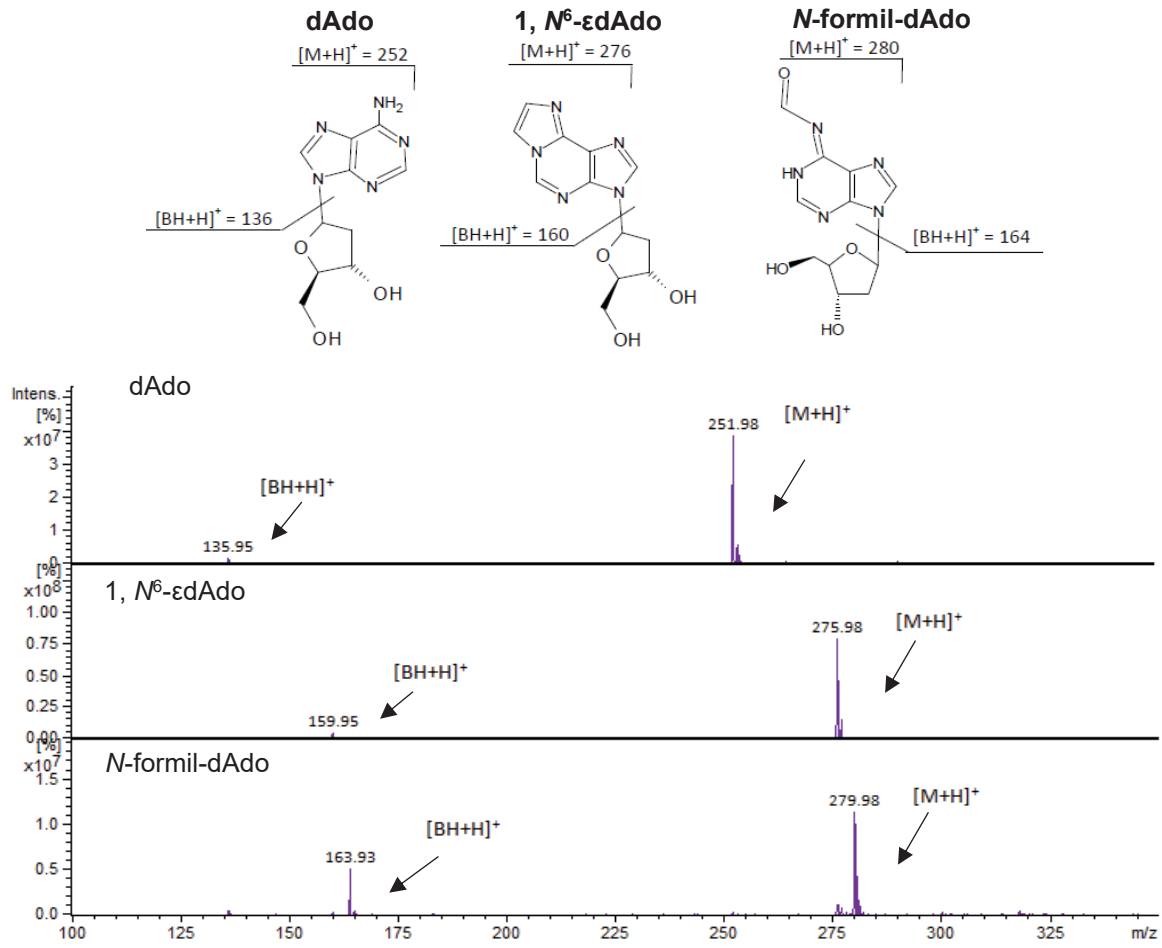
Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma UV da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo obtido em 254nm. (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de LC-MS/MS dos produtos resultantes da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo obtido pelo modo EIC. Em 15 min corresponde a dAdo em 15 min (linha vermelha: seleção *m/z* 252); o 1, N^6-εdAdo em 15.8 min (linha azul: seleção *m/z* 276 o *N*-formil-dAdo em 16.2 min (linha verde: seleção *m/z* 280).

Na figura 20, observa-se o espectro de massa do primeiro pico em 15 min correspondente a dAdo *m/z* 252, referente a molécula protonada $[M+H]^+$ com um fragmento resultante da quebra da ligação *N*-glicosídica e perda da 2'-desoxirribose *m/z* 136, referente a base protonada $[BH+H]^+$; o segundo pico em 15.8 min corresponde ao etenoaduto 1, N^6-εdAdo *m/z* 276 , referente à molécula protonada

[M+H]$^+$, com um fragmento resultante da perda da 2'-desoxirribose em *m/z* 160, referente à base protonada [BH+H]$^+$; o terceiro pico eluindo em 16.2 min corresponde ao *N*-formil-dAdo com *m/z* 280, referente à molécula protonada [M+H]$^+$ com um fragmento resultante da perda da 2'-desoxirribose em *m/z* 164, referente à base protonada [BH+H]$^+$.

Figura 19 - Espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo



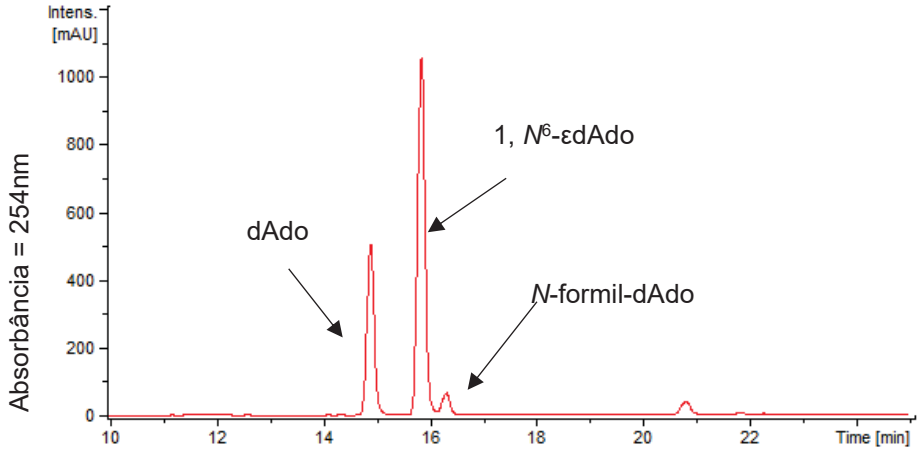
Fonte: o autor (2022).

Nota: Estruturas químicas e espectros de massas dos produtos resultantes da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo obtidos em modo *ESI+*. Os espectros foram obtidos a partir do cromatograma da figura 18 B, nos tempos de 15 min corresponde a dAdo; em 15.8 min o 1, N^6-εdAdo e em 16.2 min o *N*-formil-dAdo.

4.1.7 Análise dos produtos de foto-oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina em $H_2{}^{18}O$por LC-MS/MS

Para investigar se ocorreu a participação da H_2O na formação dos produtos gerados na reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo, foi realizada a reação utilizando a $H_2{}^{18}O$, isto é, a molécula de H_2O contendo o isótopo ^{18}O do oxigênio. Além das análises de massas, também foi realizado em paralelo o monitoramento da reação utilizando o detector UV em 254nm. Conforme mostra a figura 21, é possível verificar que o resultado mostrado no cromatograma UV exibe um perfil parecido com a reação feita em D_2O, entretanto, ocorreu uma redução na formação dos produtos. Isto já era esperado, tendo em vista que o tempo de vida do $^1O_2$ é menor em H_2O comparado com D_2O (FOOTE et al. 1995). O produto com o tempo de retenção de 15 min corresponde a dAdo; em 15.8 min o 1, N^6-εdAdo e em 16.2 min o *N*-formil-dAdo.

Figura 20 – Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em $H2^{18}O$

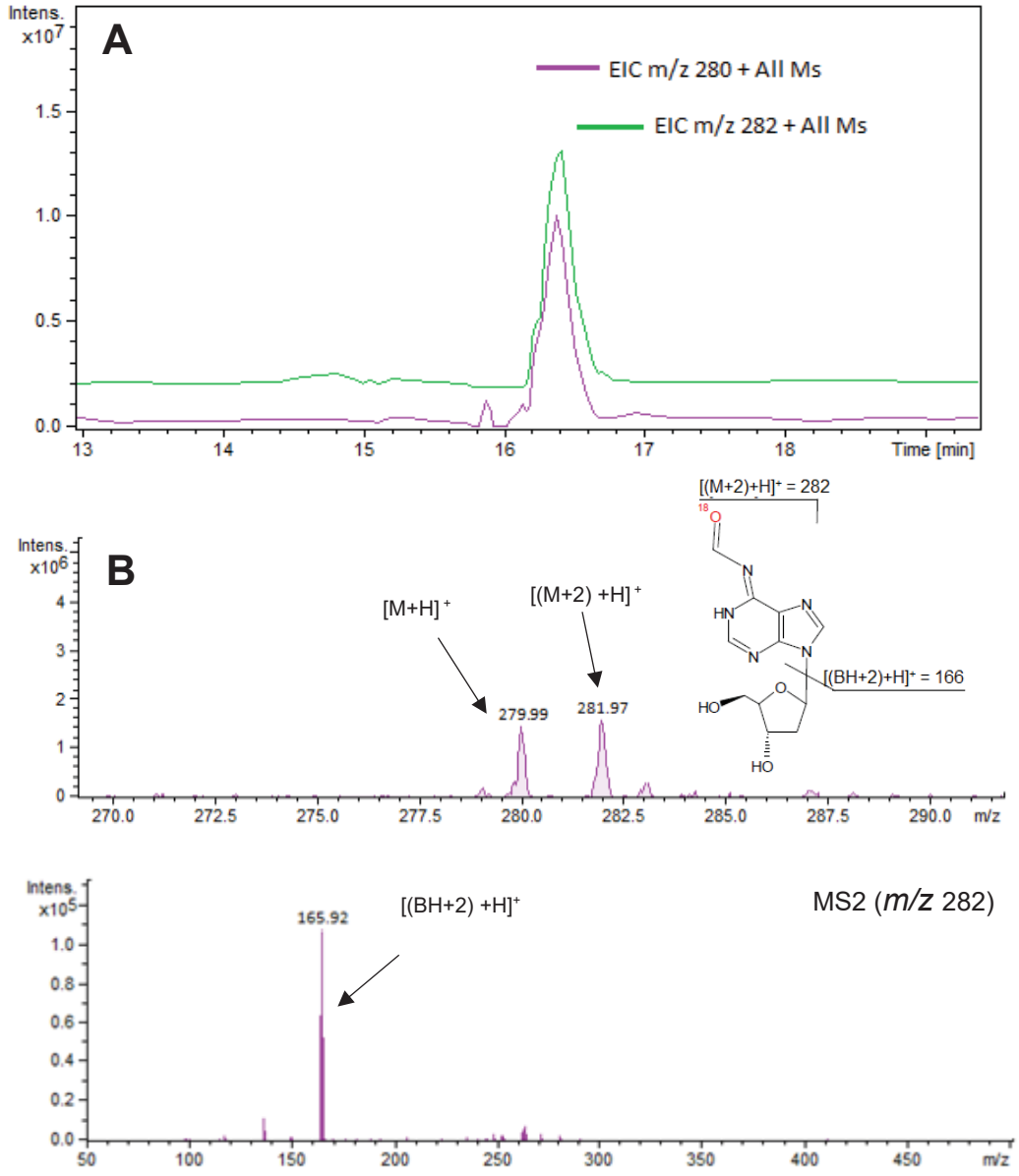


Fonte: o autor (2022).
Nota: Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em $H_2{}^{18}O$ obtido em 254nm. Em 15 min corresponde a dAdo; em 15.8 min o 1, N^6-εdAdo e em 16.2 min o *N*-formil-dAdo.

Os resultados mostram que a dAdo (*m/z* 252), com eluição no tempo de 15 min, não apresentou nenhuma marcação, portanto, o espectro de massa permaneceu igual as análises anteriores. Por outro lado, ocorreu a marcação de um oxigênio na molécula no produto *N*-formil-dAdo em 16.2 min (*m/z* 280, íon correspondente isotopicamente marcado *m/z* 282), conforme mostrado no cromatograma abaixo

(figura 22A). A confirmação da estrutura também foi feita com a fragmentação do íon *m/z* 282 que gerou um fragmento em *m/z* 166, característico da perda de 2'-desoxirribose (figura 22B).

Figura 21 - Cromatograma e espectros de massa da análise de LC-MS/MS do *N*-formil-dAdo, produto da reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo em $H_2{}^{18}O$

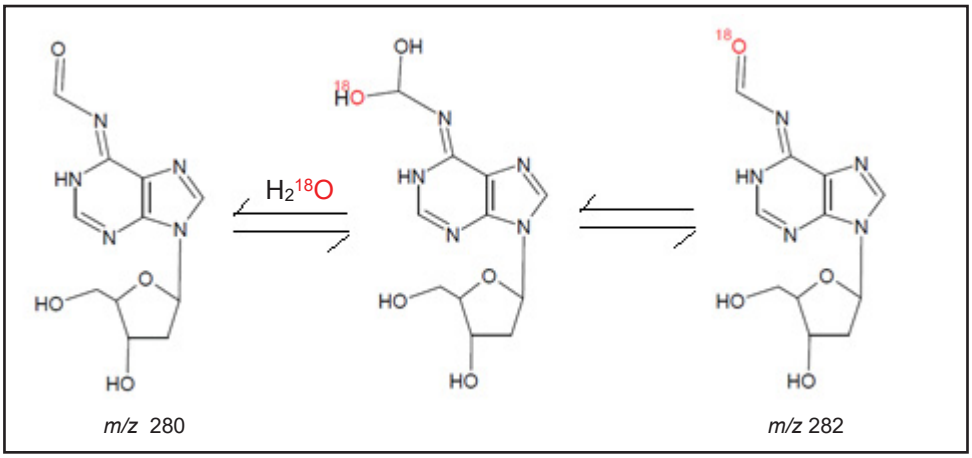


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição de cromatogramas do produto *N*-formil-dAdo não marcado (*m/z* 280) e marcado isotopicamente (*m/z* 282) em 16.2 min, obtidos na análise de LC-MS/MS pelo modo EIC. A linha roxa corresponde a seleção do íon *m/z* 280. A linha verde corresponde ao íon *m/z* 282. (B) Espectro de massas do produto *N*-formil-dAdo (*m/z* 280, íon correspondente isotopicamente marcado *m/z* 282). MS2 = Fragmentação do íon precursor *m/z* 282 → *m/z* 166.

O produto formado pela reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$, *N*-formil-dAdo, apresenta um grupo aldeído em sua estrutura (figura 22). Como já revisado anteriormente, aldeídos são grupamentos muito reativos, portanto, podem sofrer uma reação de adição nucleofílica pela H_2O resultando na formação de hidratos (diol germinal), isto é, uma molécula contendo grupos OH no mesmo carbono, conforme mostrado na figura 23. De forma geral, a adição de H_2O nos grupos carbonílicos de aldeídos e cetonas ocorre em velocidade lenta, pois a água é considerada um nucleófilo fraco, entretanto, esta reação pode ser catalisada em meio ácido por meio da adição de H_3O^+ (BRUICE, 1998; SOLOMONS, 2000). A figura 23 abaixo mostra as possíveis estruturas formadas nesta reação, em equilíbrio.

Figura 22 – Possíveis produtos da reação adição de H_2O em aldeídos



Fonte: o autor (2022).

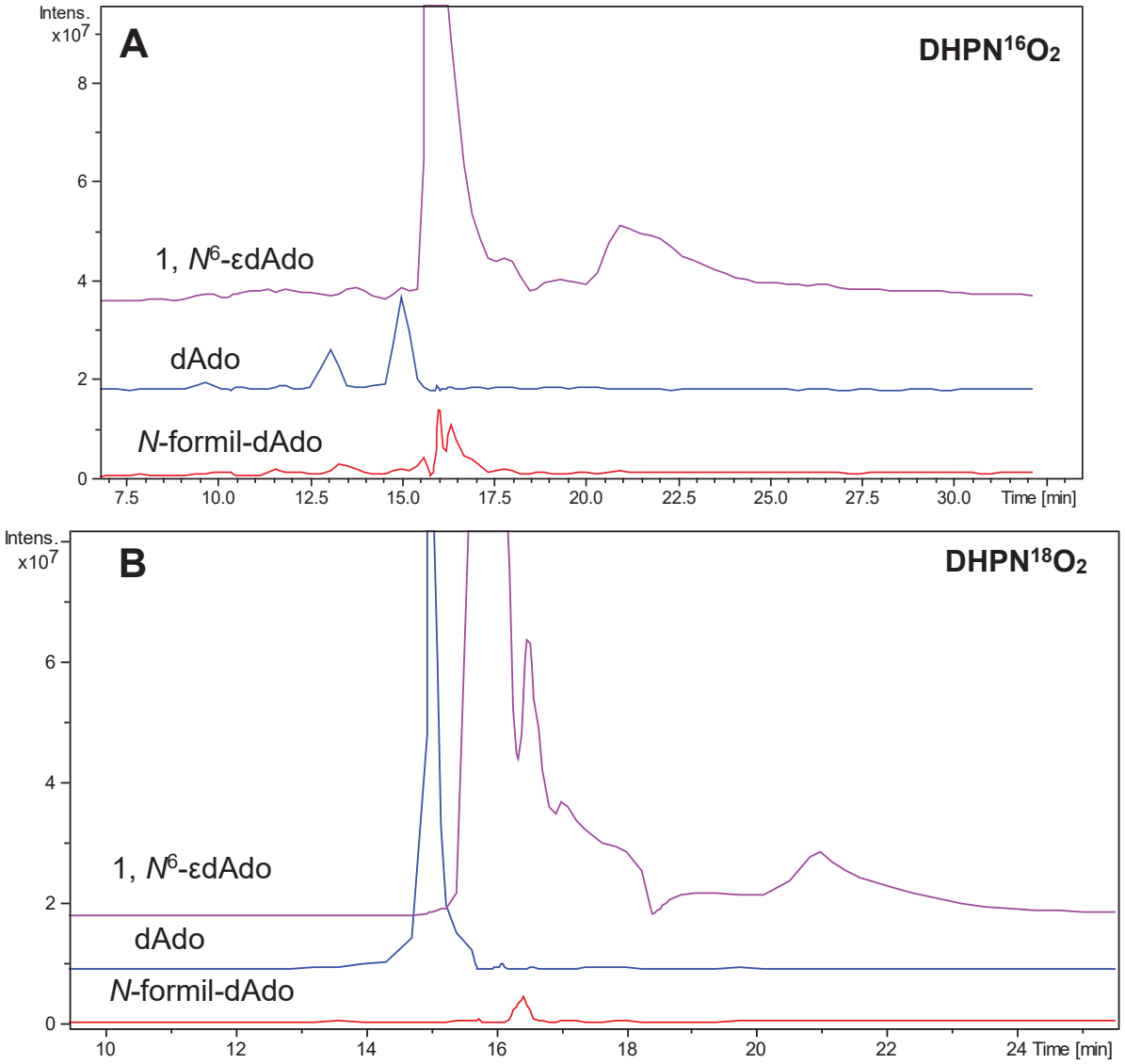
Nota: Esquema mostrando os possíveis produtos gerados pela adição da H_2O em aldeídos na molécula *N*-formil-dAdo na reação realizada em $H_2{}^{18}O$.

4.1.8 Análise dos produtos de oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina gerados na incubação com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS

Para confirmar os resultados mostrados anteriormente, foi utilizado outro método de geração do $^1O_2$ através da termólise do endoperóxido derivado do naftaleno com O_2 incorporado DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$. De acordo com os dados da estabilidade dos produtos mostrados anteriormente, o produto da reação de foto-oxidação, *N*-formil-dAdo, pode ser degradado com a temperatura de 37°C formando a dAdo como produto final da reação. Sendo assim, o etenoaduto 1, N^6-εdAdo foi incubado com DHPN$^{16}O_2$ ou DHPN$^{18}O_2$ por 2h em um agitador térmico e durante a reação, foram retiradas alíquotas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 min com o objetivo de melhorar a detecção dos intermediários formados.

A partir da análise cinética realizada com o DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ foi possível obter os cromatogramas mostrado na figura 24. Na figura 24 (A) mostra o cromatograma dos produtos da reação com o DHPN$^{16}O_2$, reproduzindo e confirmando os resultados obtidos da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo. A figura 24 (B) corresponde mostra o cromatograma dos produtos da reação com o DHPN$^{18}O_2$. Os dois cromatogramas foram obtidos no modo EIC selecionando a *m/z* de cada produto, ambos no tempo de 30 min de reação, tempo no qual permitiu a melhor visualização dos produtos. A confirmação dos produtos foi feita considerando o tempo de retenção dos produtos e o espectro de massa com as respectivas fragmentações. O produto com o tempo de retenção de 15 min corresponde a dAdo, em 15.8 min corresponde ao 1, N^6-εdAdo e em 16.2 min o *N*-formil-dAdo em ambos os cromatogramas.

Figura 23 – Cromatogramas dos produtos de oxidação do 1, N^6-εdAdo gerados na incubação com $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$ por LC-MS/MS

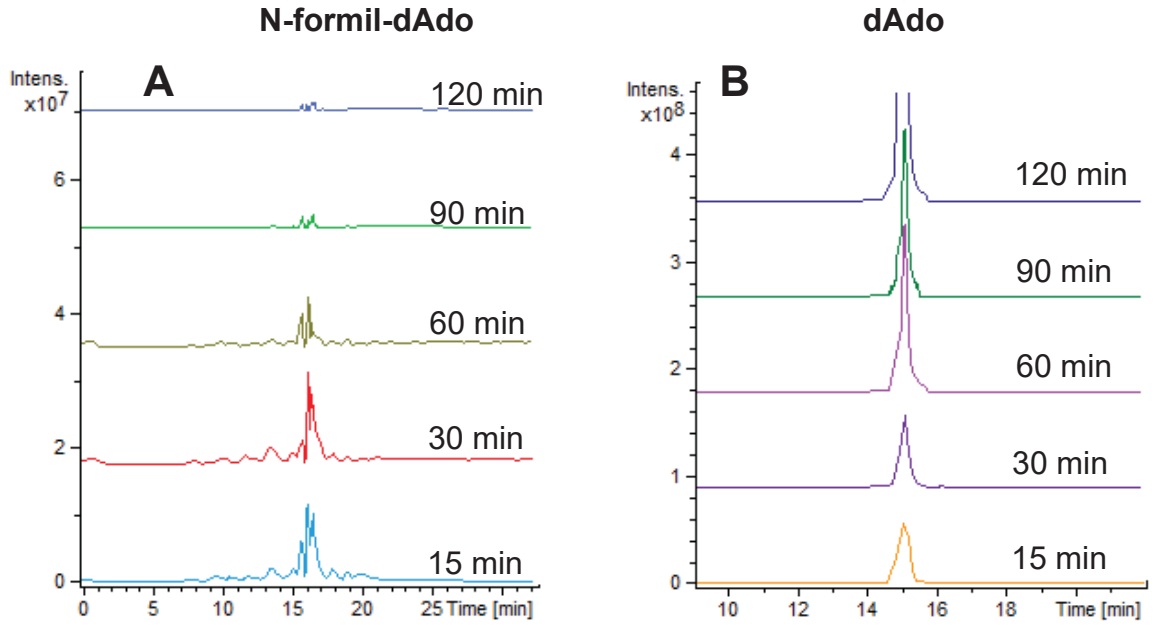


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de LC-MS/MS dos produtos da reação com $DHPN^{16}O_2$ com o 1, N^6-εdAdo obtido pelo modo EIC. (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos na análise de LC-MS/MS dos produtos da reação com $DHPN^{18}O_2$ com o 1, N^6-εdAdo obtido pelo modo EIC. Em 15 min corresponde a dAdo (linha azul: seleção *m/z* 252); o 1, N^6-εdAdo em 15.8 min (linha roxa: seleção *m/z* 276 o *N*-formil-dAdo em 16.2 min (linha vermelha: seleção *m/z* 280).

Na análise cinética, observou-se que conforme o aumento de tempo de incubação da reação do 1, N^6-εdAdo com $DHPN^{16}O_2$ ocorria a degradação do *N*-formil-dAdo (figura 25 A) e aumento da formação de dAdo (figura 25 B). Isso ocorre provavelmente porque a temperatura de 37°C acelera a decomposição do *N*-formil-dAdo, conforme mostrado na figura 25.

Figura 24 – Cromatogramas dos produtos da cinética de incubação durante a reação de oxidação do 1, N^6-ɛdAdo com DHPN$^{16}O_2$ por LC-MS/MS

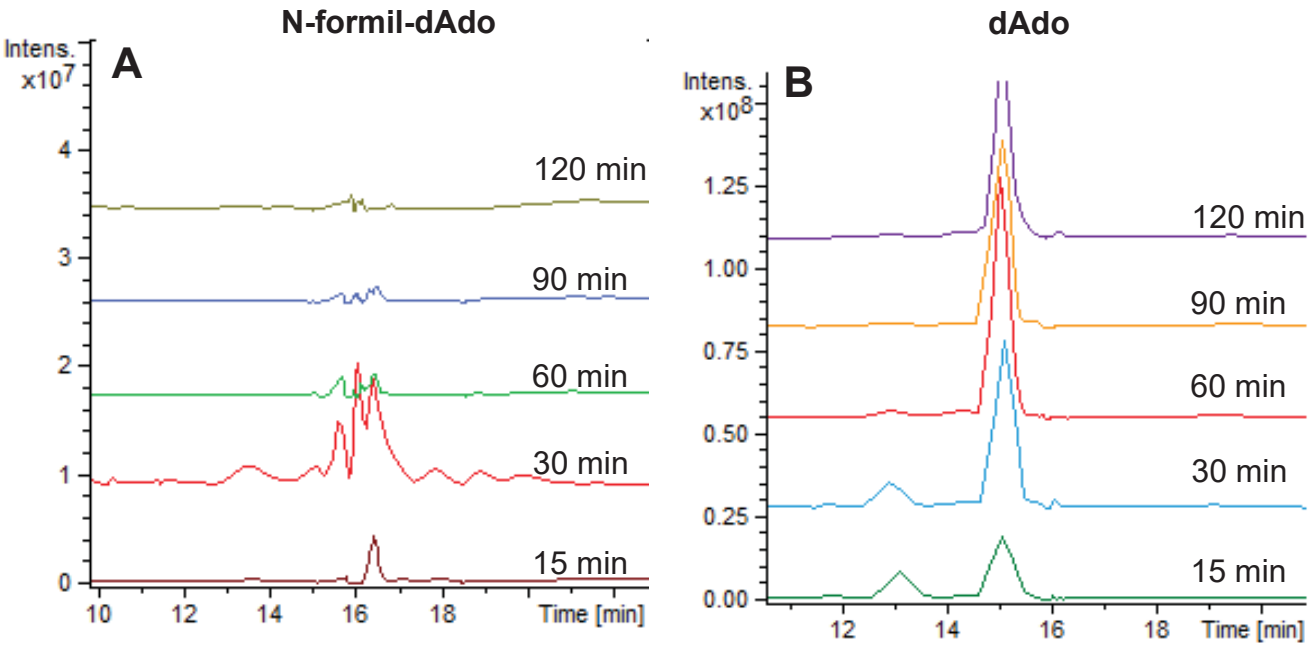


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 280 (*N*-formil-dAdo) da análise cinética de incubação do 1, N^6-ɛdAdo com DHPN$^{16}O_2$ (B) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 252 (dAdo) da análise cinética de incubação do 1, N^6-ɛdAdo com DHPN$^{16}O_2$

Os resultados da análise cinética também foram realizados com o DHPN$^{18}O_2$ (figura 26) contendo o oxigênio isotopicamente marcado, foram realizados com a finalidade de avaliar a reprodutibilidade dos resultados anteriores e também investigar a participação do $^1O_2$ na formação dos produtos, pois a termodecomposição do DHPN$^{18}O_2$ resulta na formação de $^{18}[^1O_2]$. Portanto, por meio de técnicas de espectrometria de massas é possível avaliar se ocorreu a incorporação do $^{18}[^1O_2]$ nos produtos gerados. Os resultados desta cinética foram semelhantes aos resultados obtidos com o DHPN$^{16}O_2$: foi possível visualizar a degradação do *N*-formil-dAdo (figura 26 A) e aumento da formação de dAdo (figura 26 B), aumentando o tempo de incubação. Também, a melhor detecção dos produtos foi no tempo de 30 min, conforme podemos observar na figura 26.

Figura 25 - Cromatogramas dos produtos da cinética de incubação durante a reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS

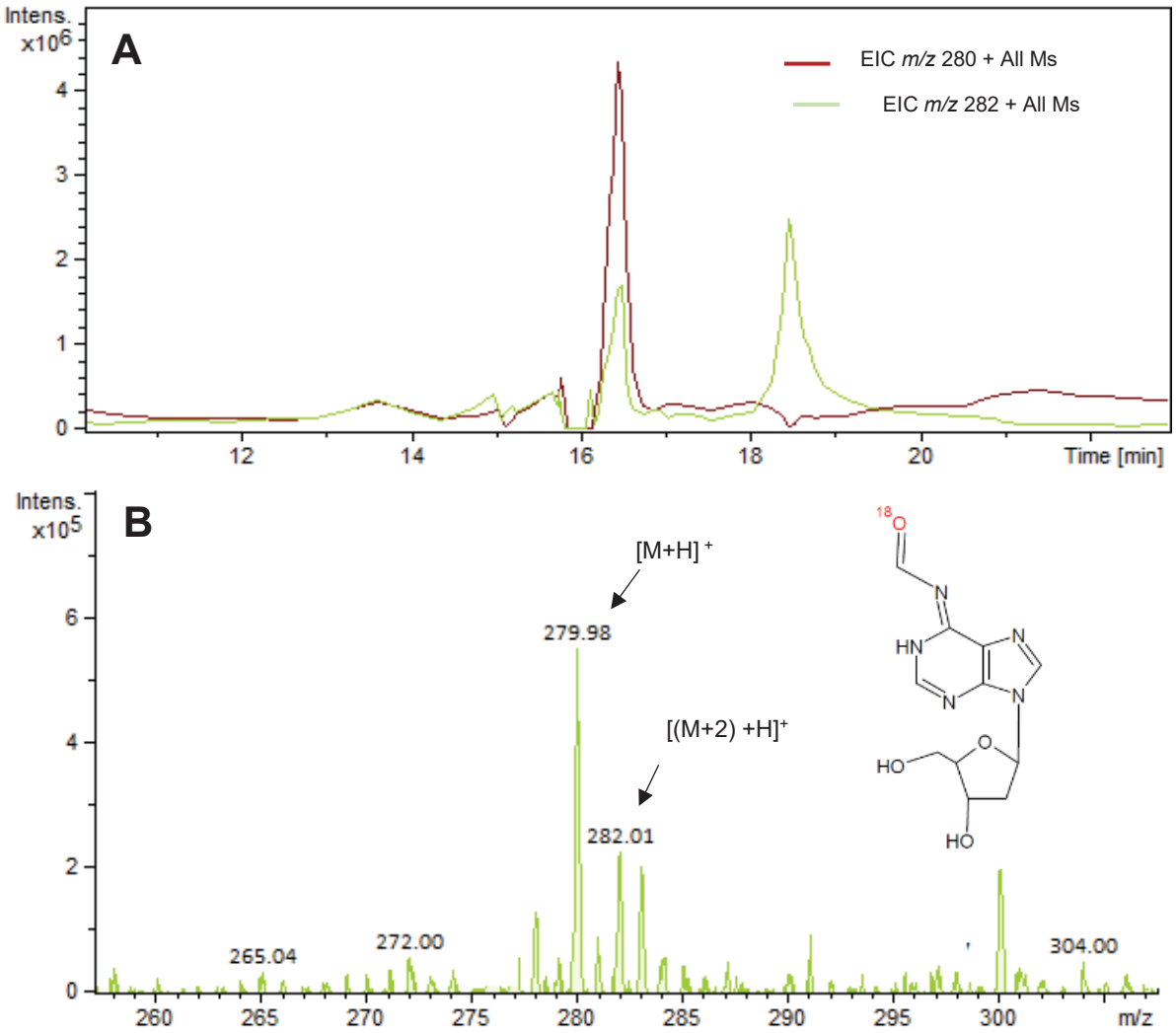


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 280 (*N*-formil-dAdo) da análise cinética de incubação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{18}O_2$ (B) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 252 (dAdo) da análise cinética de incubação do 1, N^6-εdAdo com DHPN$^{18}O_2$

A dAdo, primeiro produto eluído na reação conforme mostrado no cromatograma anterior, apresentou o mesmo perfil de espectro de massa com *m/z* 252, indicando que não ocorreu a incorporação de do $^1O_2$ na molécula. Entretanto, o *N*-formil-dAdo apresentou a incorporação do átomo de $^{18}[^1O_2]$, resultando na o *N*-formil-dAdo marcada (*m/z* 282) e não marcada (*m/z* 280), conforme mostrado na figura 27.

Figura 26 - Cromatograma e espectro de massa do produto *N*-formil-dAdo gerado oxidação do 1, N^6-ɛdAdo com DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS



Fonte: o autor (2022).

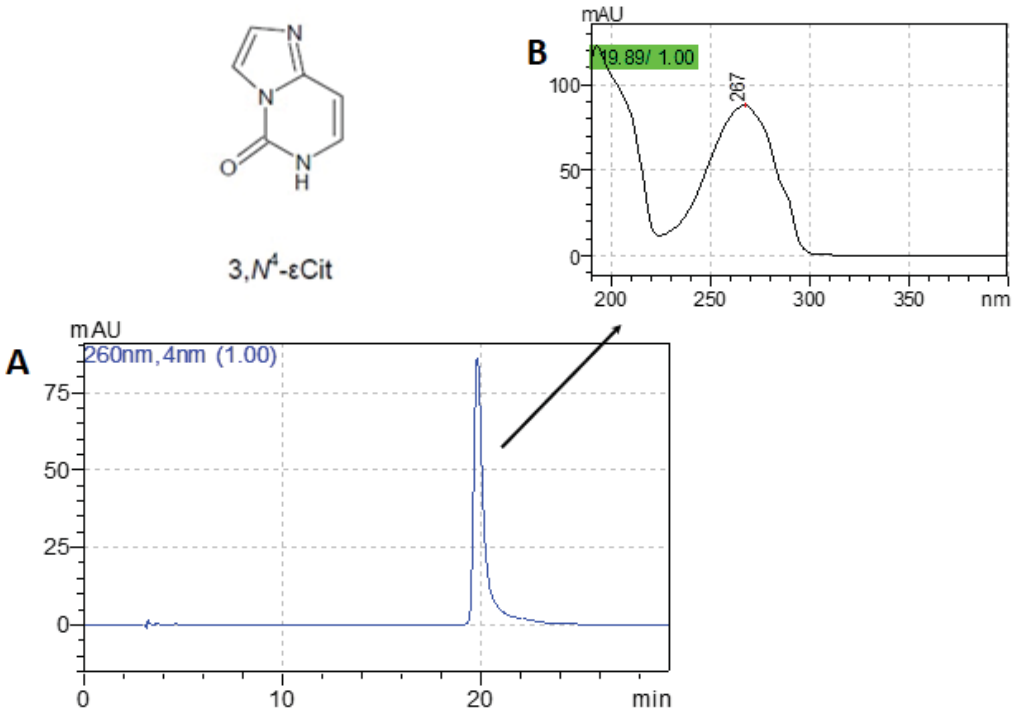
Nota: Sobreposição de cromatogramas do produto *N*-formil-dAdo (*m/z* 280, íon correspondente isotopicamente marcado *m/z* 282) em 16.2 min no tempo de incubação de 30 min da análise cinética da oxidação do 1, N^6-ɛdAdo com DHPN$^{18}O_2$, obtidos na análise de LC-MS/MS pelo modo EIC. A linha vermelha corresponde a seleção do íon 280 *m/z*. A linha verde corresponde ao íon *m/z* 282. (B) Espectro de massas do produto *N*-formil-dAdo (*m/z* 282, íon correspondente isotopicamente não marcado *m/z* 280).

4.2 Oxidação do 3, N^4-etenocitosina pelo oxigênio singlete

4.2.1 Detecção do 3, N^4-etenocitosina por HPLC-PDA

Aplicando as condições cromatográficas descritas em materiais e métodos, foi obtido como resultado o cromatograma a detecção do 3, N^4-εCit realizada por HPLC-PDA cujo cromatograma está apresentado na figura 28 abaixo. Os dados mostram um único pico no cromatograma referente ao etenoaduto 3, N^4-εCit eluindo no tempo de retenção de 20 min, apresentando o espectro característico com absorção máxima em 267 nm (figura 28 B) de acordo com o espectro mostrado no trabalho de Sun et al. (2006).

Figura 27 - Padronização da detecção do 3, N^4-εCit



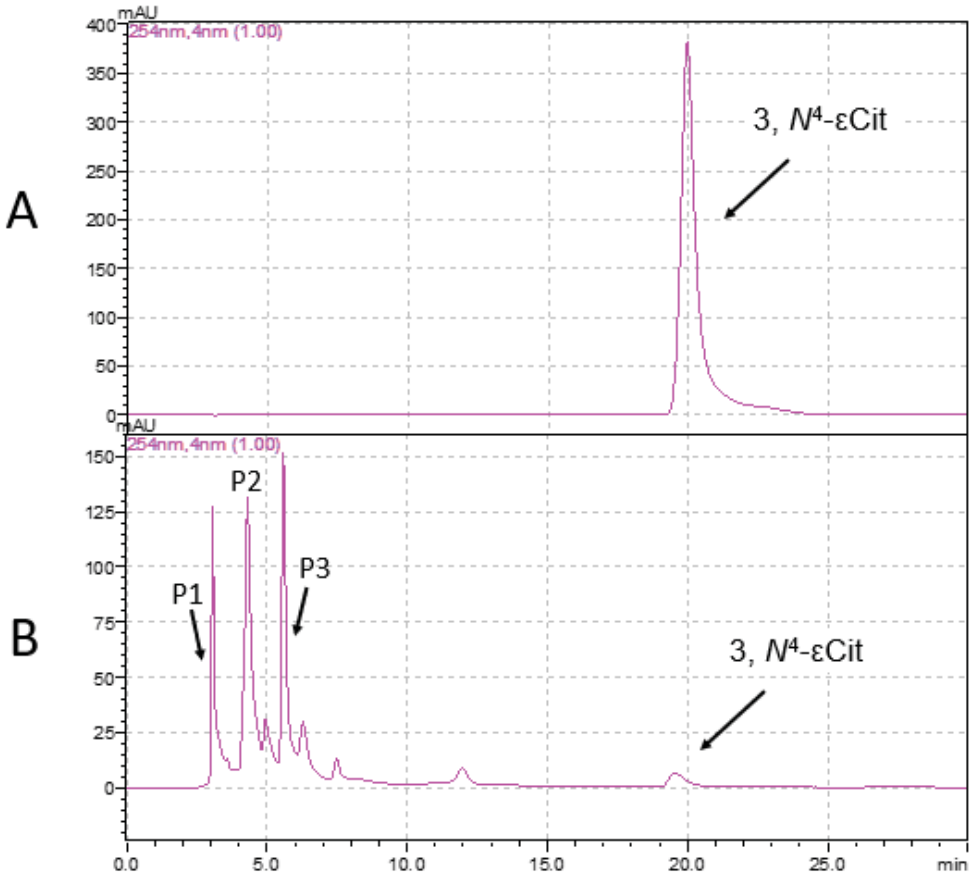
Fonte: O autor (2022).
Nota: (A) Cromatograma da padronização da detecção do 3, N^4-εCit (B) Espectro de absorção do 1, N^6-εdAdo obtido em 260 nm.

4.2.2 Análise e caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-etenocitosina

Para reação de oxidação do 3, N^4-εCit, o etenoaduto foi incubado junto com o rosa bengala e submetidos a irradiação por 115 min. A figura 29 (A) corresponde ao controle, ou seja, a incubação do etenoaduto, sem o rosa bengala, submetido a

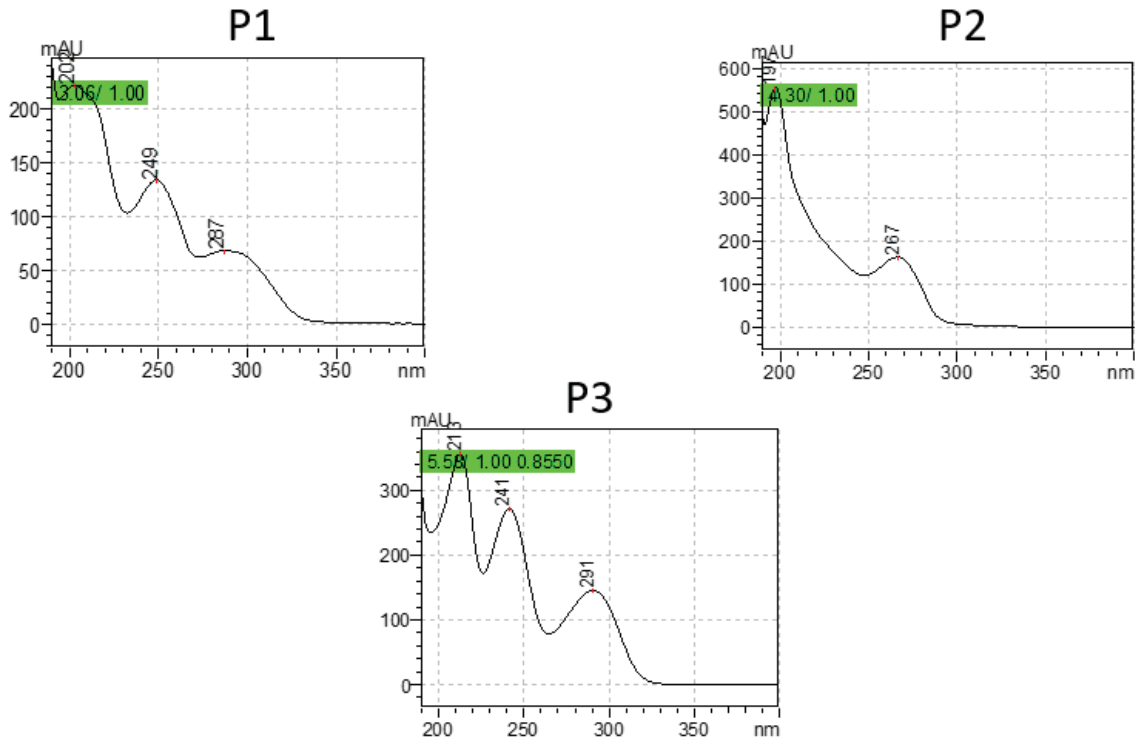
irradiação (sem a reação com $^1O_2$). A figura 29 (B) representa a reação de oxidação do etenoaduto 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$. Como resultado, no cromatograma foi possível observar que a reação consumiu quase toda a molécula – devido ao desaparecimento do pico do etenoaduto no tempo de 20 min -, e ocorreu a formação de três produtos principais, denominados P1 em 3 min, P2 em 5 min e P3 em 6 min, cujos espectros de absorção foram extraídos conforme mostrado na figura 30.

Figura 28 - Reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit em D_2O



Fonte: o autor (2022).
Nota: (A) Cromatograma correspondente ao controle: solução 1 mmol/L de 3, N^4-εCit em D_2O. (B) Cromatograma da reação do 3, N^4-εCit com o $^1O_2$.

Figura 29- Espectro de absorção dos produtos da oxidação do 3, *N*⁴-εCit pelo $^1O_2$

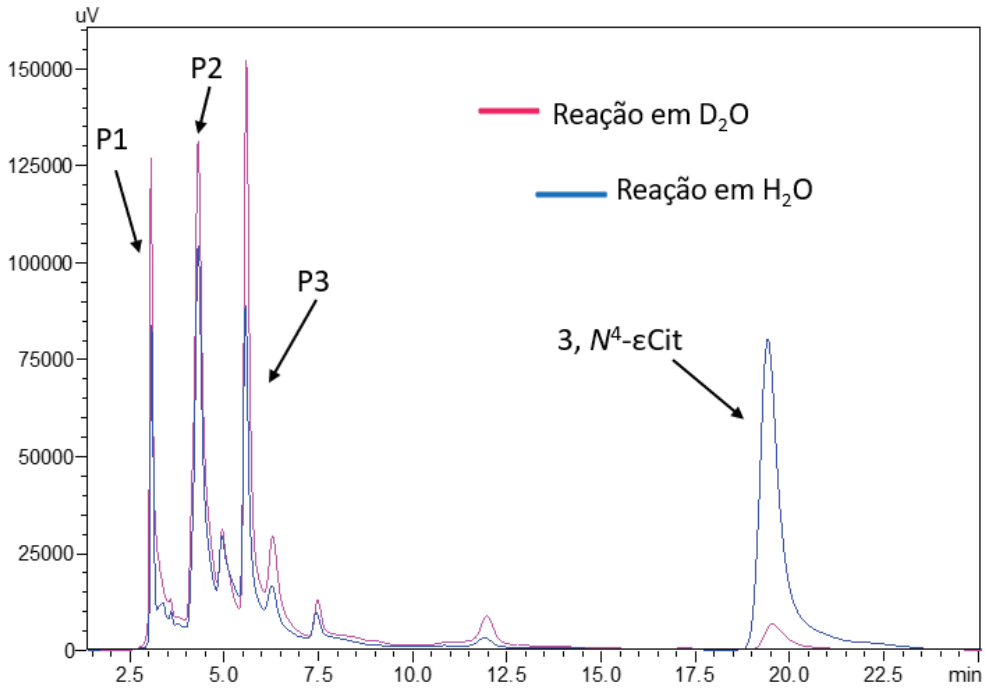


Fonte: o autor (2022).

Nota: Os espectros de absorção dos produtos (P1, P2 e P3) foram extraídos do cromatograma da figura 29 com tempos de retenção de 3 min, 5 min e 6 min, respectivamente.

A mesma reação foi realizada em solvente aquoso a fim de verificar se o resultado seria reproduzido. Os resultados estão mostrados na figura 31. De acordo com os dados ocorreu a formação dos mesmos produtos – confirmados pelos espectros de absorção-, entretanto, em menor quantidade comparado com a reação em D_2O, devido o menor rendimento de $^1O_2$ na reação.

Figura 30 – Comparação do perfil da reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit em D_2O e H_2O



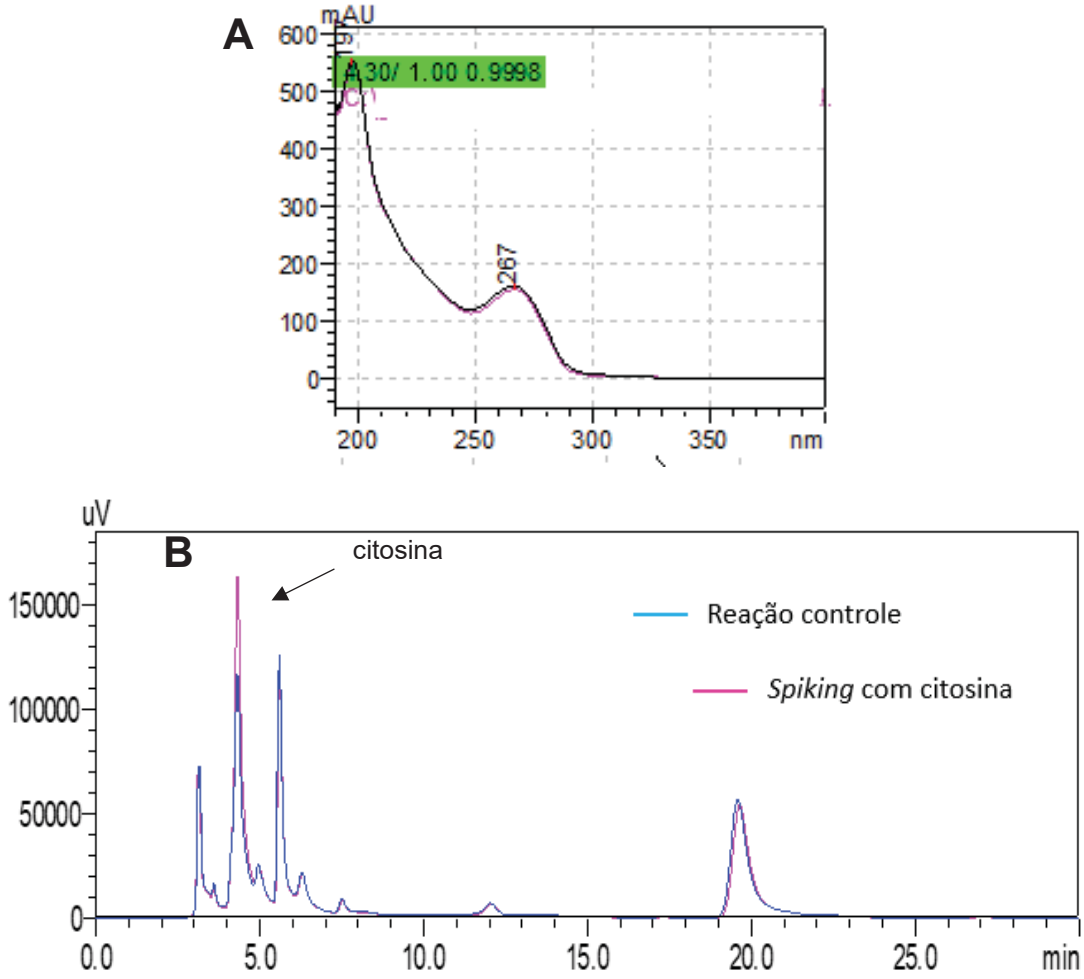
Fonte: O autor (2022).

Nota: Sobreposição de cromatogramas. A linha rosa corresponde a reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ em D_2O e a linha azul corresponde a reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ em H_2O.

O produto P2 formado na reação de oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$, cuja eluição foi em aproximadamente 5 min, apresentou um pico com o tempo de retenção e espectro de absorção semelhante base nitrogenada citosina (figura 32 A), dessa forma foi realizado um *spiking* da reação com uma solução de citosina (0,5mM) para confirmação da presença da base formada na reação.

Como resultado, mostrado da figura 32 (B), podemos observar a sobreposição de dois cromatogramas: em azul a reação controle (sem o spiking) e em rosa a reação com o *spiking* de citosina. De acordo com o cromatograma ocorreu o aumento da área somente do segundo pico após o *spiking* no tempo de retenção de 5 min, sugerindo que o pico corresponde a citosina.

Figura 31 - Cromatograma de *spiking* com citosina



Fonte: O autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição dos espectros de absorção do padrão comercial de citosina (em rosa) e do P2 extraído do cromatograma da figura 29 em 5 min (B) Sobreposição de cromatogramas. A linha azul corresponde a reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ controle (sem spiking). A linha rosa corresponde a reação com o *spiking* de citosina.

4.2.3 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-etenocitosina por infusão direta (Ion-Trap)

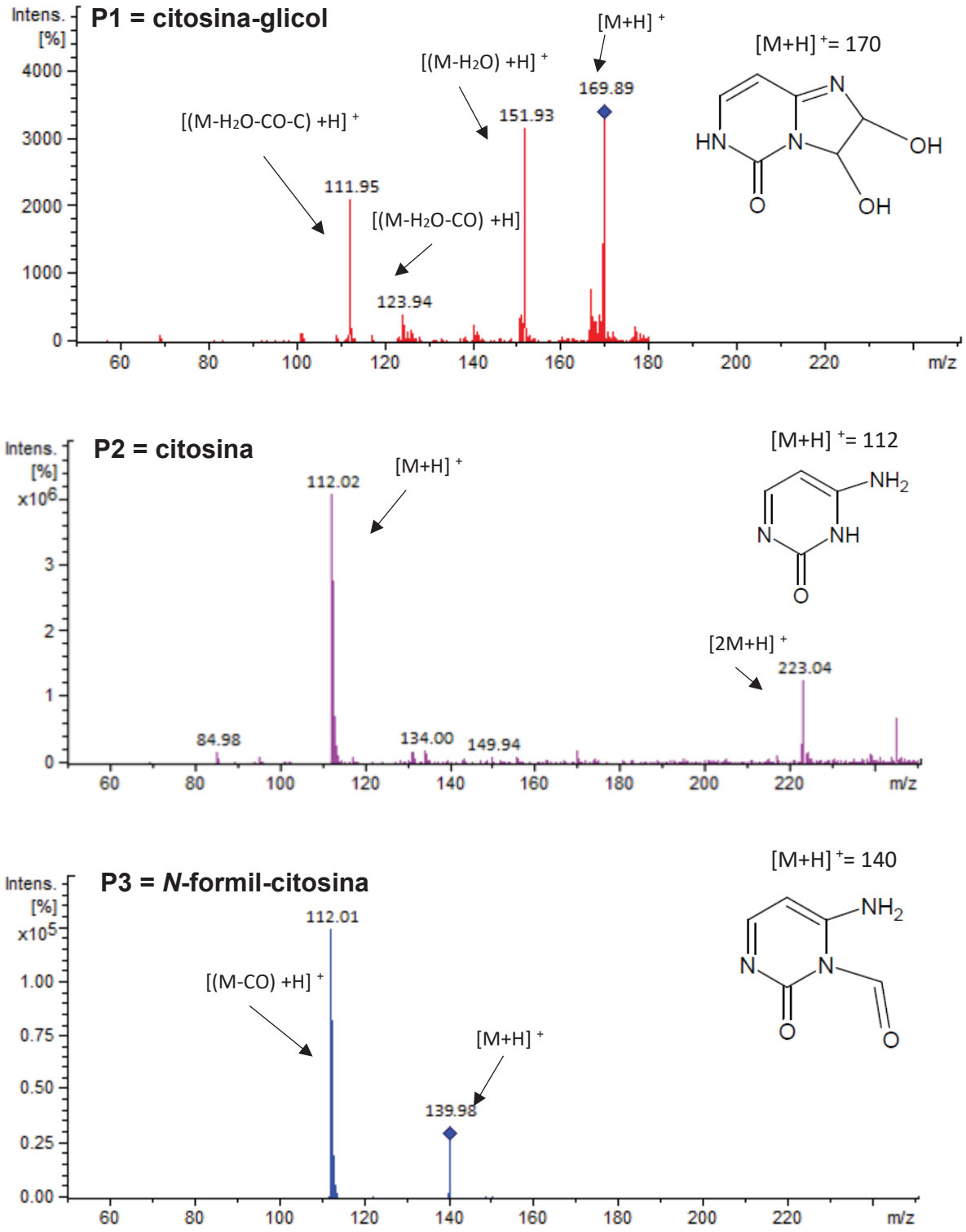
Para caracterizar o P1, P2 e o P3 formados na reação, foi realizado o isolamento e purificação por HPLC-PDA desses produtos em escala semipreparativa. Em seguida, as amostras foram liofilizadas e enviada para USP para análise de infusão direta no Ion Trap (*Amazon Speed Brucker*), no modo *ESI+*.

O P1, com tempo de retenção em 3 min, apresentou um íon com massa *m/z* 170 ($[M+H]^+$) que corresponde a um incremento de massa de *m/z* 34 com reação a massa do etenoaduto (*m/z* 136), ou seja, ocorreu a adição de dois grupos hidroxilas na molécula, caracterizando um produto diol (glicol). Para a confirmação desta estrutura a molécula foi fragmentada, conforme mostrado a na figura 33. O primeiro fragmento com *m/z* 152 corresponde a perda de um OH, que corresponde a um epóxido ou um composto hidroxilado. O fragmento do íon *m/z* 152 origina um fragmento em *m/z* 124, resultante de perda de um átomo de carbono e um oxigênio e um fragmento final resulta na citosina (*m/z* 112). As estruturas das respectivas fragmentações estão mostradas na figura 33.

O pico P2, com o tempo de retenção em 5 min, cujo espectro de absorção é semelhante a base nitrogenada citosina, apresentou um íon com massa *m/z* 112 que corresponde a massa da citosina protonada $[M+H]^+$. Além disso, o espectro de massas deste produto também mostra um pico *m/z* 223 que corresponde ao dímero de citosina protonado $[2M+H]^+$.

O pico P3, com o tempo de retenção em 6 min, apresentou um íon com *m/z* 140 que corresponde a um incremento de massa de *m/z* 28, ou seja, a presença de uma carbonila (C=O) na citosina. Além disso, a fragmentação do íon *m/z* 140 resulta em um pico *m/z* 112 que corresponde a estrutura da citosina.

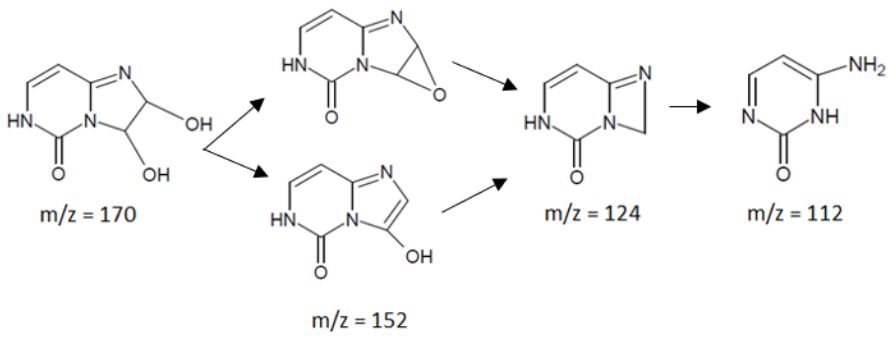
Figura 32 - Espectro de massa dos produtos da foto-oxidação do 3, *N*⁴-εCit purificados por HPLC-PDA



Fonte: o autor (2022).

Nota: Espectro de massas obtido pela análise de infusão direta modo *ESI* + dos produtos de foto-oxidação do 3, *N*⁴-εCit (P1, P2 e P3) purificados por HPLC-PDA. O P1 foi identificado como citosina-glicol e o P2 como citosina e o P3 como *N*-formil-citosina.

Figura 33 - Esquema de fragmentação do produto citosina-glicol



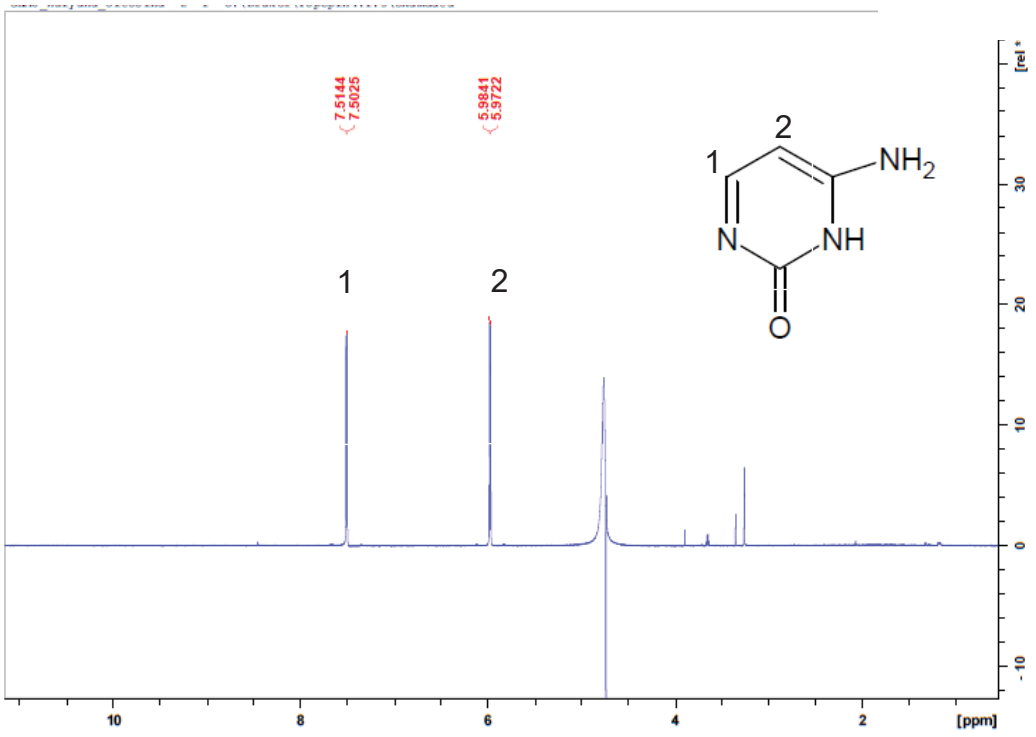
Fonte: o autor (2022).

Nota: Esquema dos fragmentos obtidos pela análise de infusão direta modo *ESI +* do produto citosina-glicol na de foto-oxidação do 3, N^4-εCit.

4.2.4 Caracterização do P2 da reação de foto-oxidação do 3, N^4-etenocitosina por RMN

Para confirmar a presença de citosina como produto da reação, a reação foi realizada em maior escala e o P2 (com eluição em 5 min) foi purificado por HPLC-PDA utilizando uma coluna semipreparativa. Em seguida a amostra foi liofilizada e resusspendida em D_2O para análise de ^1H no RMN 600Hz. Os espectros estão mostrados na figura 35. A confirmação da estrutura da citosina foi feita comparando os sinais gerados no espectro de H (figura 35) com os dados da literatura (WISHART et al. 2009).

Figura 34 - Espectro ^1H do P2 do 3, N^4-εCit



Fonte: O autor (2022).
Nota: Espectro ^1H do P2 do 3, N^4-εCit

Tabela 3 - Deslocamentos químicos no espectro ^{1}H RMN do P2 do 3, N^4-εCit em D_2O

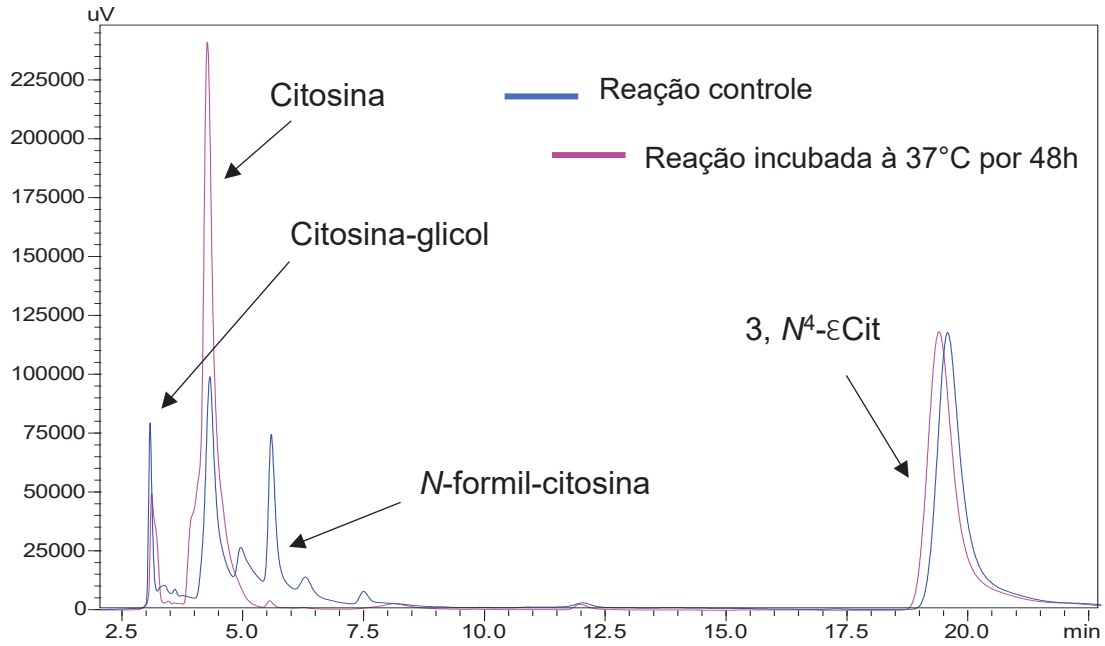
Identificação	Deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade
1	7.51	d
2	5.98	d

*d = dupleto

4.2.5 Análise da estabilidade dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-etenocitosina por HPLC-PDA

Para avaliar a estabilidade dos produtos formados na foto-oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^{1}O_2$ a reação foi incubada por 24h e 48h em uma estufa a 37°C. Os tempos foram definidos com base no trabalho de MARTINEZ et al. 2018, pela semelhança no perfil de produtos da reação de oxidação com o 1, N^2-εdGuo. Nos resultados mostrados na figura 36, observa-se os cromatogramas da incubação. Os picos em 3, 5 e 6 min correspondem aos produtos da reação: citosina-glicol, citosina e *N*-formil-citosina, respectivamente. O pico em 20 min corresponde ao 3, N^4-εCit que sobrou da reação. A partir deste resultado, foi mostrado que em 48h de incubação da reação a 37°C ocorre a redução da área do pico do citosina-glicol em 3 min e ausência do pico referente ao *N*-formil-citosina em 6 min. Em contrapartida, conforme aumenta o tempo de incubação, ocorre o aumento da área do pico correspondente a citosina, sugerindo que os produtos citosina-glicol e *N*-formil-citosina estão se decompondo com a temperatura formando a citosina como produto final. O tempo de 24 h incubação apresentou um cromatograma muito similar ao controle, por isso não foi apresentado.

Figura 35 – Análise da estabilidade dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit



Fonte: o autor (2022).
Nota: Cromatograma em azul correspondente a reação controle (sem incubação); o cromatograma em rosa corresponde a reação incubada à 37ºC por 48h.

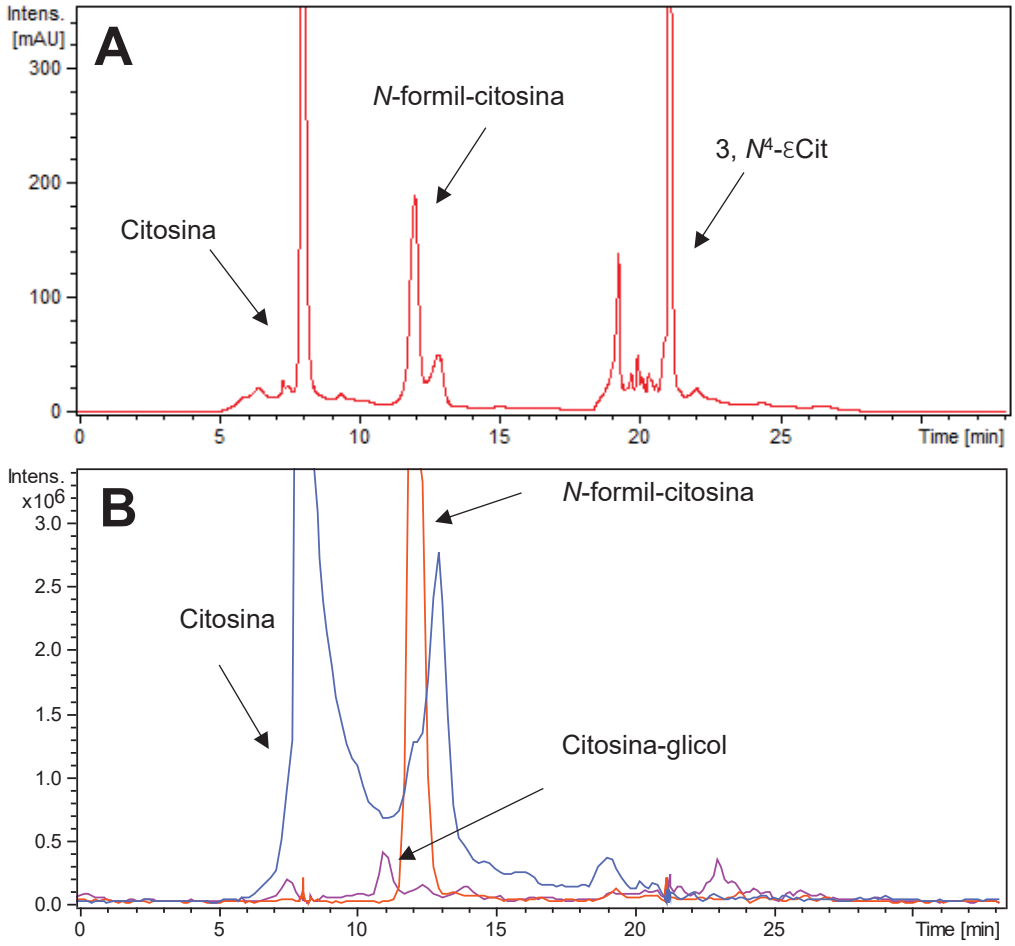
4.2.6 Caracterização dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-eteno-citosina por LC-MS/MS

Para confirmar os resultados anteriores obtidos na infusão direta, também foi realizada uma análise de LC-MS/MS dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-εCit. Além disso, a vantagem de utilizar outro detector, diferente do PDA, pode auxiliar na buscar por outros produtos e intermediários de oxidação do 3, N^4-εCit que não puderam ser detectados com o PDA por não apresentarem espectros de absorção em razão da sua estrutura química. Para análise de LC-MS/MS, foi necessário realizar uma adaptação das condições cromatográficas aplicadas no HPLC-PDA. Simultaneamente, foi feito o monitoramento da reação usando um detector UV programado para 254nm.

Na figura 37 (A), observa-se o cromatograma UV obtido em 254 nm da reação de oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ em D_2O. Na figura 37 (B). foi obtido o cromatograma pelo modo EIC selecionando os íons: o 112, 170 e 140 *m/z*. O primeiro produto de eluição em 8 min corresponde a citosina (*m/z* 112); o segundo em 11 min produto é o citosina-glicol (*m/z* 170) e o terceiro corresponde ao *N*-formil-citosina (*m/z* 140).

Na figura 38, encontram-se os espectros correspondentes de cada produto extraídos do cromatograma. Vale ressaltar que ocorreu uma mudança na ordem de eluição dos produtos decorrente da alteração das condições cromatográficas, tais como reagentes, equipamento, fase móvel e da coluna utilizada.

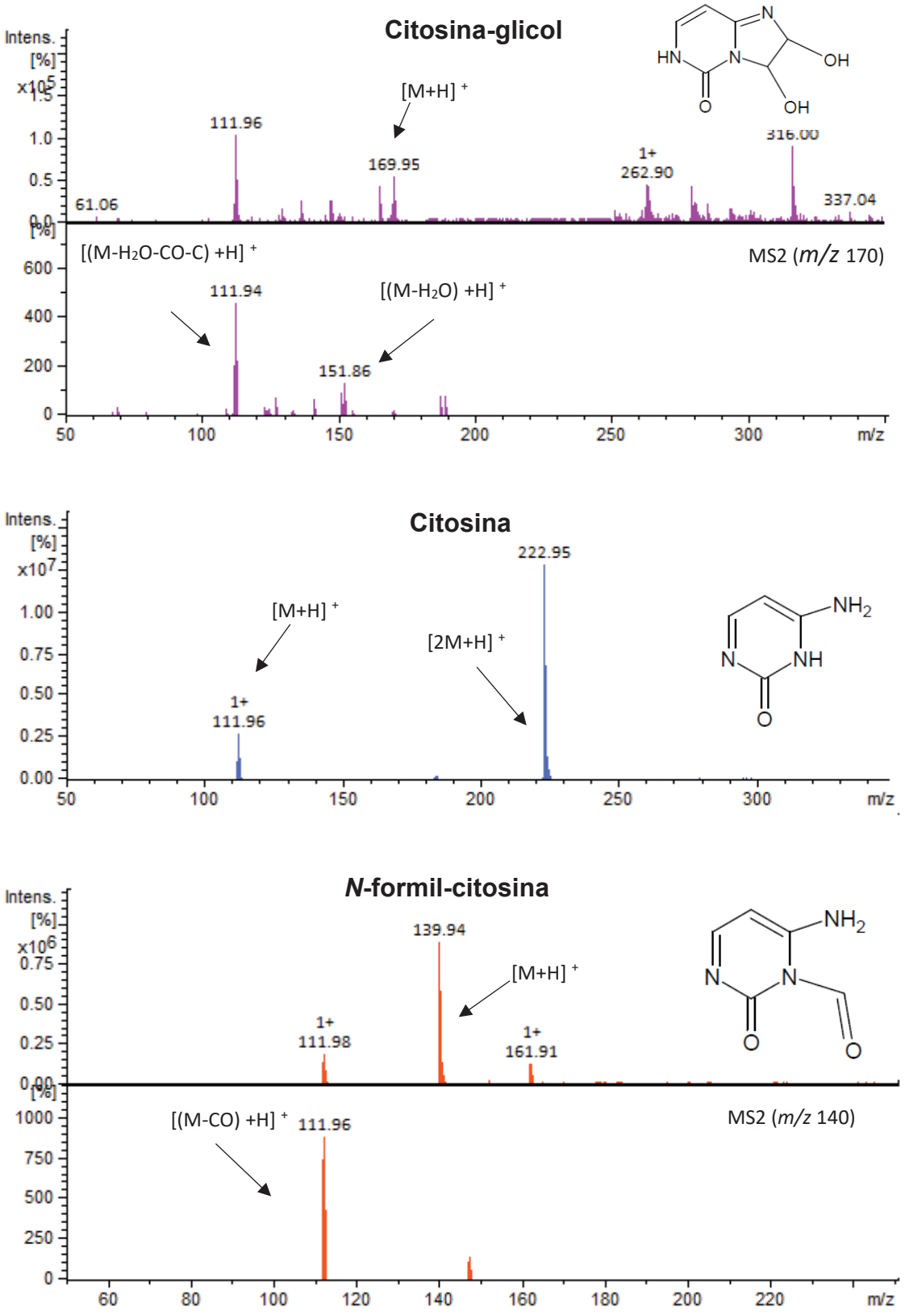
Figura 36 - Cromatograma do monitoramento análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit

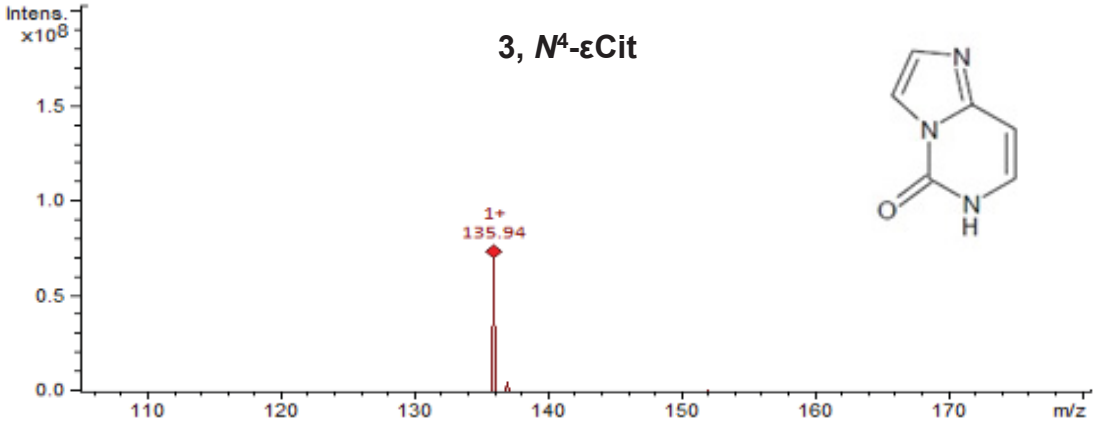


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma UV da foto-oxidação do 3, N^4-εCit obtido em 254nm. (B) Cromatograma dos produtos resultantes da foto-oxidação do 3, N^4-εCit obtido pela análise de LC-MS/MS em modo EIC. Em 8 min corresponde a citosina (linha azul: seleção íon *m/z* 112); em 11 min o citosina-glicol (linha roxa: seleção íon *m/z* 170) e 12 min o *N*-formil-citosina (linha laranja: seleção íon *m/z* 140).

Figura 37 - Espectros de massa da análise de LC-MS/MS dos produtos da foto-oxidação do 3, N^4-εCit





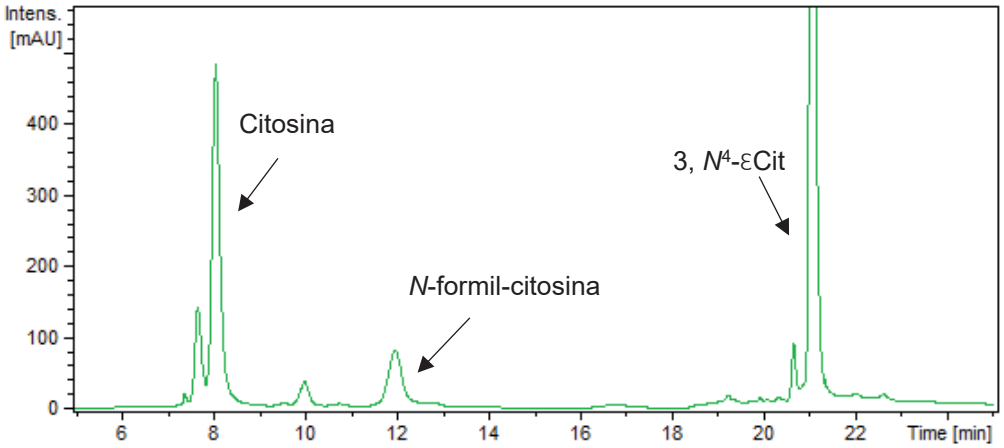
Fonte: o autor (2022).

Nota: Estruturas químicas e espectros de massas dos produtos resultantes da foto-oxidação do 3, N^4-εCit obtidos em modo *ESI+*. Os espectros foram obtidos a partir do cromatograma da figura 37 (B) extraídos nos tempos 8 min corresponde a citosina; em 11 min o citosina-glicol, em 12 min o *N*-formil-citosina e em 20 min o 3, N^4-εCit (que sobrou da reação). MS2 = Fragmentação do íon precursor *m/z* 170 → *m/z* 152*; m/z* 140 → *m/z* 112.

4.2.7 Análise dos produtos de foto-oxidação do 3, N^4-etenocitosina em $H_2{}^{18}O$ por LC-MS/MS

Para investigar se ocorre a participação da H_2O nas reações de foto-oxidação do 3, N^4-εCit foi realizada a reação utilizando a $H_2{}^{18}O$ contendo o isótopo ^{18}O do oxigênio. Além das análises de massas, também foi realizado em paralelo o monitoramento da reação utilizando o detector UV em 254nm. Conforme mostra a figura 39, é possível verificar que o resultado mostrado no cromatograma UV exibe um perfil parecido com a reação feita em D_2O, entretanto, ocorreu uma redução na formação dos produtos em razão do menor rendimento do $^1O_2$. Observa-se em 8 min a citosina e em 12 min o *N*-formil-citosina. O produto citosina-glicol não foi observado no monitoramento UV.

Figura 38 - Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação 3, *N*^{4}-εCit em $H_2{}^{18}O$

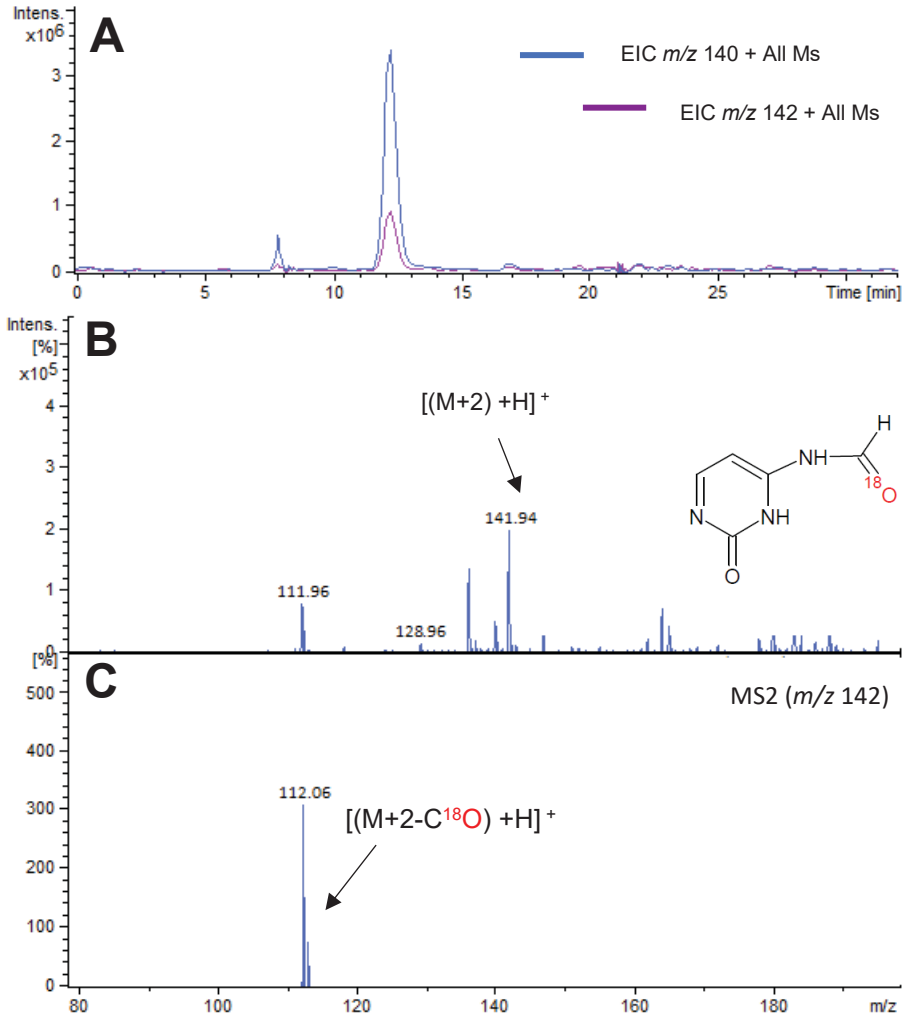


Fonte: o autor (2022).

Nota: Cromatograma UV dos produtos da reação de foto-oxidação do 3, *N*^{4}-εCit do em H2^{18}O obtido em 254nm. Em 8 min corresponde a citosina; em 12 min o *N*-formil-citosina e em 20 min o 3, *N*^{4}-εCit.

De acordo com os resultados obtidos, a citosina (*m/z* 112), com eluição no tempo de 8 min, não apresentou nenhuma marcação, portanto, o espectro de massa permaneceu igual as análises anteriores. Por outro lado, ocorreu a marcação no produto *N*-formil-citosina (*m/z* 140, íon correspondente isotopicamente marcado *m/z* 142), conforme mostrado no cromatograma e espectros abaixo (figura 40):

Figura 39 - Cromatograma e espectro de massas do *N*-formil-citosina em $H_2{}^{18}O$

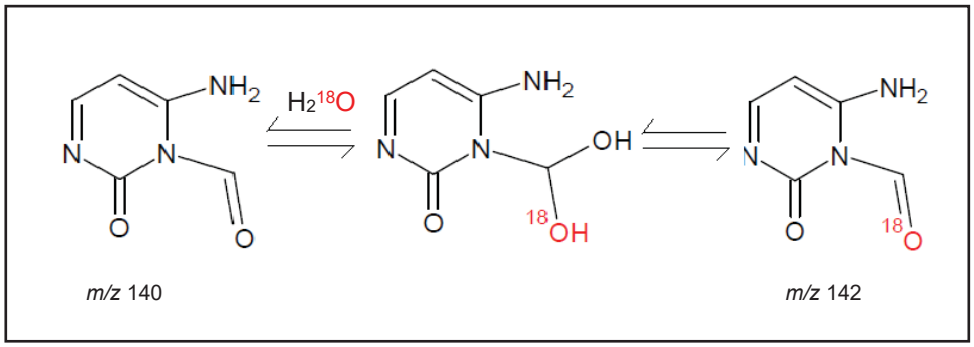


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição de cromatogramas obtidos da análise de LC-MS/MS obtido pelo modo EIC *m/z* 140 (em azul) e *m/z* 142 (em roxo) (B) Espectro de massas do produto citosina-glicol (*m/z* 140, íon correspondente isotopicamente marcado *m/z* 142) obtido em 12 min. MS2 = Fragmentação do íon precursor *m/z* 142 → *m/z* 112.

O produto *N*-formil-citosina, análogo ao *N*-formil dAdo, também apresenta um grupo aldeído em sua estrutura, portanto, sugere-se que também ocorre a reação de adição nucleofílica de água no grupamento aldeído da molécula formilada (BRUICE, 1998; SOLOMONS, 2000). A figura 41 abaixo mostra as possíveis estruturas formadas nesta reação, em equilíbrio.

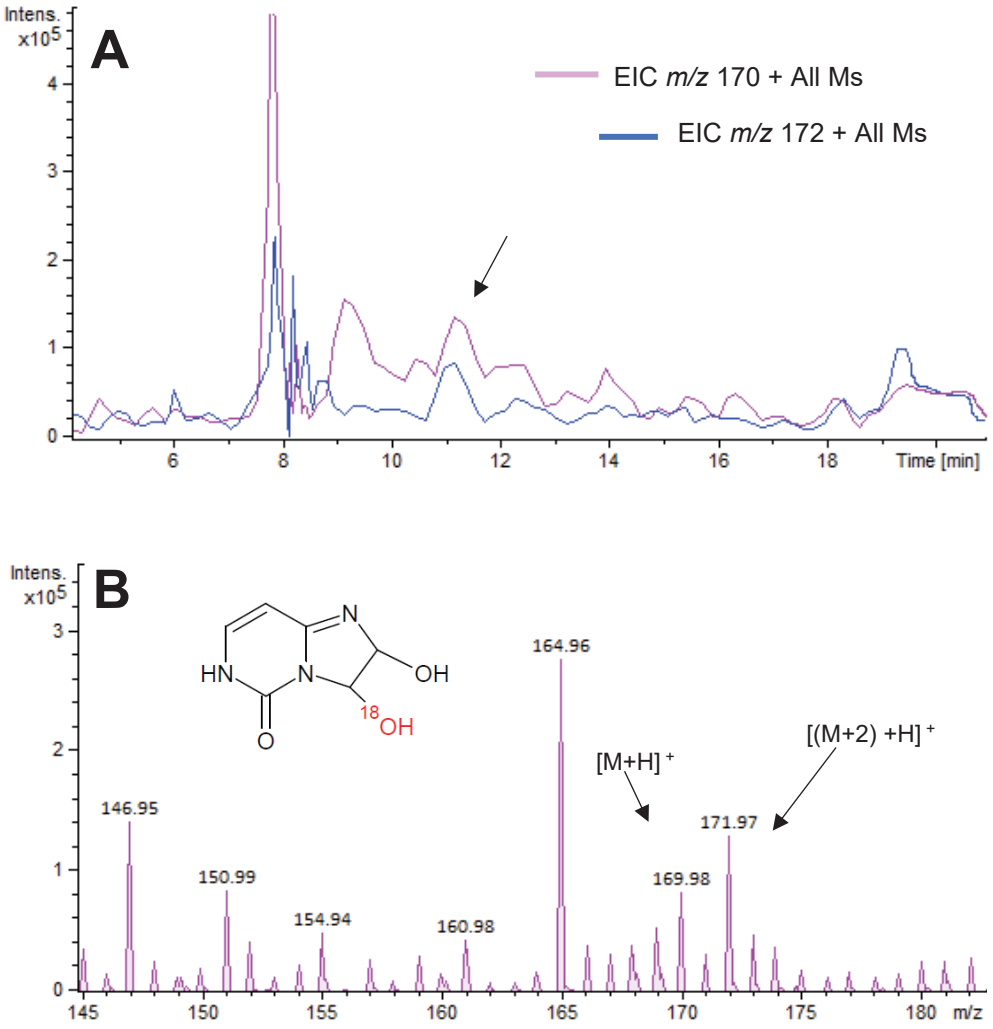
Figura 40 - Possíveis produtos da reação adição de H_2O em aldeídos em *N*-formil-citosina



Fonte: o autor (2022).
Nota: Esquema mostrando os possíveis produtos gerados pela adição da H_2O em aldeídos na molécula *N*-formil-citosina na reação realizada em $H_2{}^{18}O$.

A análise do cromotograma da molécula citosina-glicol revelou um indício de marcação de ^{18}O na molécula no tempo de 11 min, sugerindo a participação de H_2O na formação deste produto (figura 42). Entretanto, devido ao baixo rendimento de $^1O_2$ nas condições de reação, o produto não pode ser fragmentado para confirmação. Dessa forma, ainda são necessários ensaios utilizando técnicas mais sensíveis para evidenciar a participação da H_2O na formação do produto citosina-glicol.

Figura 41 - Cromatograma e espectro de massas do citosina-glicol em $H_2{}^{18}O$



Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição de cromatogramas obtidos da análise de LC-MS/MS obtido pelo modo EIC 170 *m/z* (em roxo) e 172 *m/z* (em azul) (B) Espectro de massas do produto citosina-glicol (*m/z* 172, íon correspondente não marcado = *m/z* 170) obtido em 11 min.

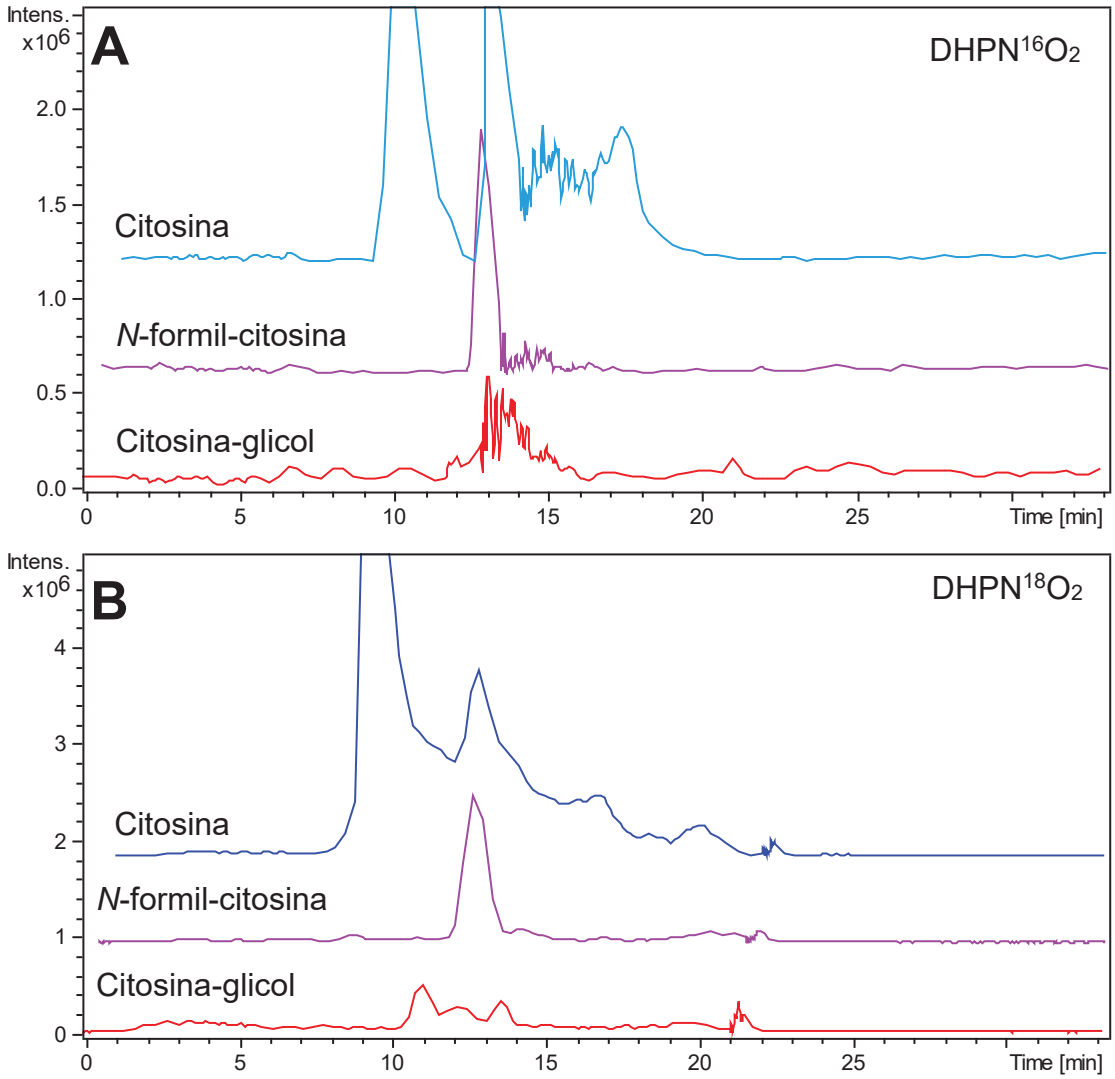
4.2.8 Análise dos produtos de oxidação do 3, N^4-etenocitosina gerados na incubação com DHPN$^{16}O_2$ e DHPN$^{18}O_2$ por LC-MS/MS

Para confirmar os resultados mostrados anteriormente, foi utilizado outro método de geração do $^1O_2$ através da termólise do endoperóxido derivado do naftaleno com O_2 incorporado (DHPNO_2). De acordo com os dados da estabilidade dos produtos mostrados anteriormente, os produtos da reação de foto-oxidação, *N*-formil-citosina e citosina-glicol, podem ser degradados com a temperatura de 37°C formando a citosina como produto final da reação. Sendo assim, o etenoaduto 3, N^4-εCit foi incubado com DHPN$^{16}O_2$ ou DHPN$^{18}O_2$ por 2h em um agitador térmico e durante a reação, foram retiradas alíquotas nos tempos de 15, 30, 60 e 90 minutos com o objetivo de melhorar a detecção dos intermediários formados.

A partir da análise cinética realizada com o DHPN$^{16}O_2$ ou DHPN$^{18}O_2$ foi possível obter os cromatogramas dos produtos mostrados na figura 43. Os cromatogramas foram obtidos no tempo de 15 minutos, onde permitiu a melhor visualização dos produtos. No cromatograma do DHPN$^{16}O_2$ (figura 43 A) foram detectados os produtos *N*-formil-citosina e a citosina na reação, sem a presença do citosina-glicol. Já no cromatograma da figura 43 (B) que corresponde a reação com o DHPN$^{18}O_2$, foi possível detectar os três produtos. Ambos os cromatogramas foram obtidos pelo modo EIC por meio da seleção dos íons 112, 170 e 140 m/z que corresponde a citosina, *N*-formil-citosina e citosina- glicol, respectivamente.

Como já havia uma certa dificuldade na detecção do produto citosina-glicol nas reações anteriores devido seu baixo rendimento e instabilidade, principalmente no detector LC-MS/MS, na reação cinética com o DHPN$^{18}O_2$ foi injetado um volume maior para verificar se realmente esse produto não era formado na reação com o DHPN. Dessa forma, os resultados obtidos na reação com o DHPN$^{18}O_2$ mostraram a presença do citosina-glicol confirmados por meio do tempo de retenção e espectro de massa, além disso, melhorou a detecção dos outros dois produtos (citosina e *N*-formil-citosina), indicando que o problema estava relacionado a padronização do volume da injeção nas reações.

Figura 42 - Cromatograma dos produtos da reação de 3, N^4-εCit com $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$

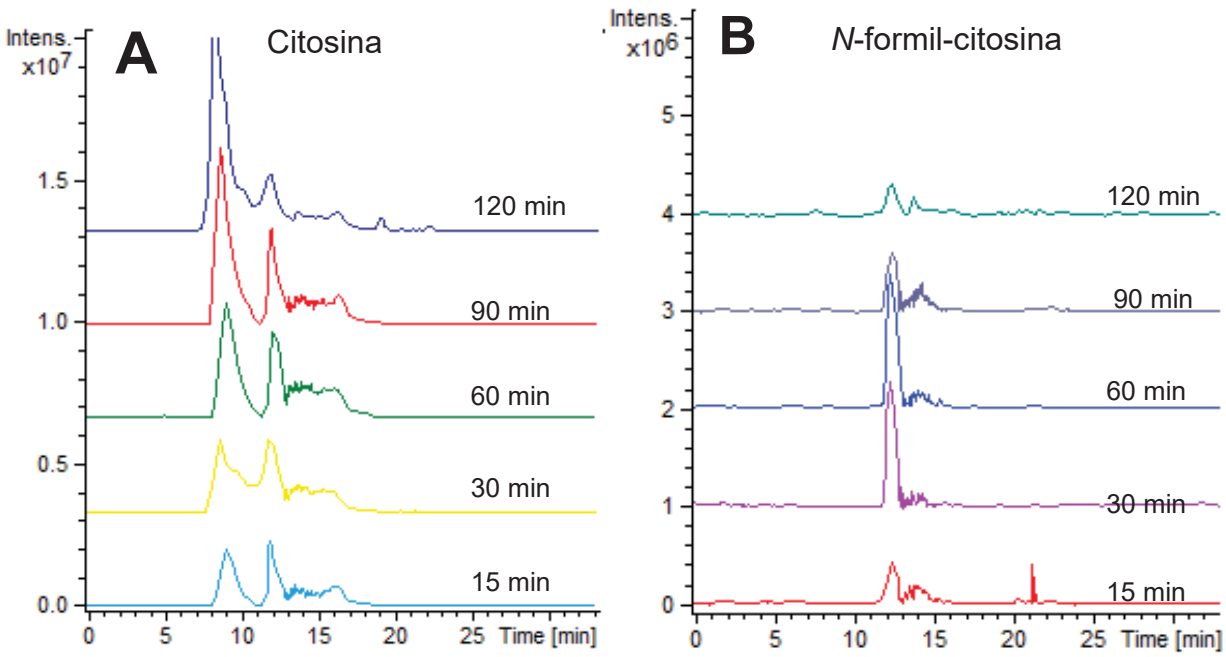


Fonte: o autor (2022).

Nota: (A)Cromatograma dos produtos gerados na reação do 3, N^4-εCit com $DHPN^{16}O_2$ obtido em 15 min de incubação em modo EIC. (B) Cromatograma dos produtos gerados na reação do 3, N^4-εCit com $DHPN^{18}O_2$ obtido em 15 min de incubação. Linha azul: seleção do íon *m/z* 112; Linha roxa: seleção do íon *m/z* 140*;* Linha vermelha: seleção do íon *m/z* 170.

As análises cinéticas dos produtos gerados com o DHPN$^{16}O_2$ mostraram que ocorre aumento da citosina conforme aumenta o tempo de incubação do DHPN$^{16}O_2$ com o 3, *N*^{4}-εCit (figura 44 A) e a degradação do produto *N*-formil-citosina (figura 44 B).

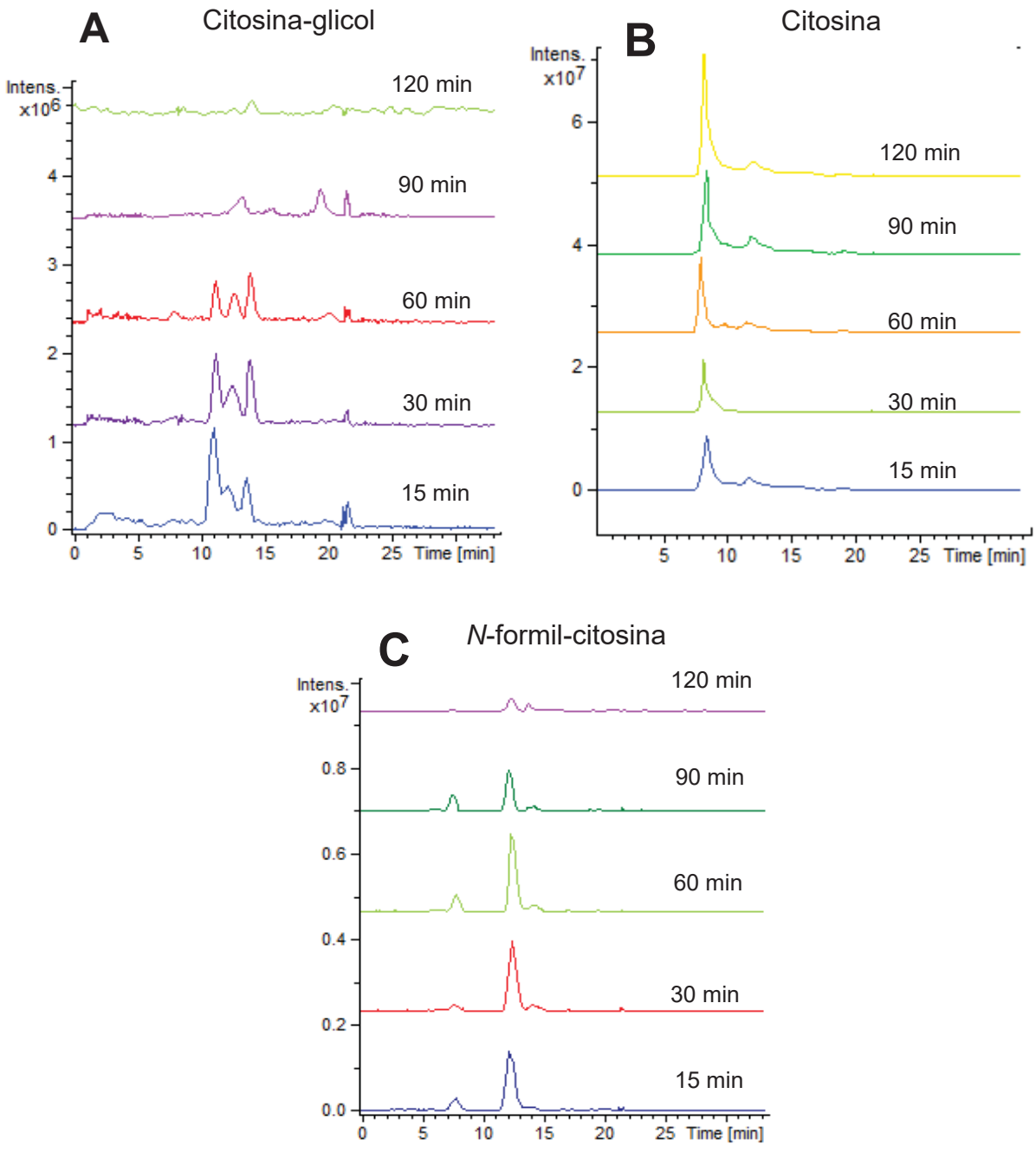
Figura 43 – Análise cinética da oxidação do 3, *N*^{4}-εCit com DHPN $^{16}O_2$



Fonte: o autor (2022).
Nota: (A) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 112 (citosina) da análise cinética de incubação do 3, *N*^{4}-εCit com DHPN$^{16}O_2$ (B) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 140 da análise cinética de incubação do 3, *N*^{4}-εCit com DHPN$^{16}O_2$

As análises cinéticas dos produtos gerados com o DHPN$^{18}O_2$ reproduziram e confirmaram os resultados anteriores feitos com o DHPN$^{18}O_2$ e, além disso, foi possível detectar o citosina-glicol, observou-se que conforme o aumento do tempo de incubação com o DHPN$^{18}O_2$ também ocorria a degradação desse produto (figura 45) A).

Figura 44 - Análise cinética da oxidação do 3, *N*⁴-εCit DHPN$^{18}O_2$



Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 170 (citosina) da análise cinética de incubação do 3, *N*⁴-εCit com DHPN$^{18}O_2$ (B) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 112 da análise cinética de incubação do 3, *N*⁴-εCit com DHPN$^{18}O_2$ (C) Cromatograma de monitoramento do íon *m/z* 140 da análise cinética de incubação do 3, *N*⁴-εCit com DHPN$^{18}O_2$

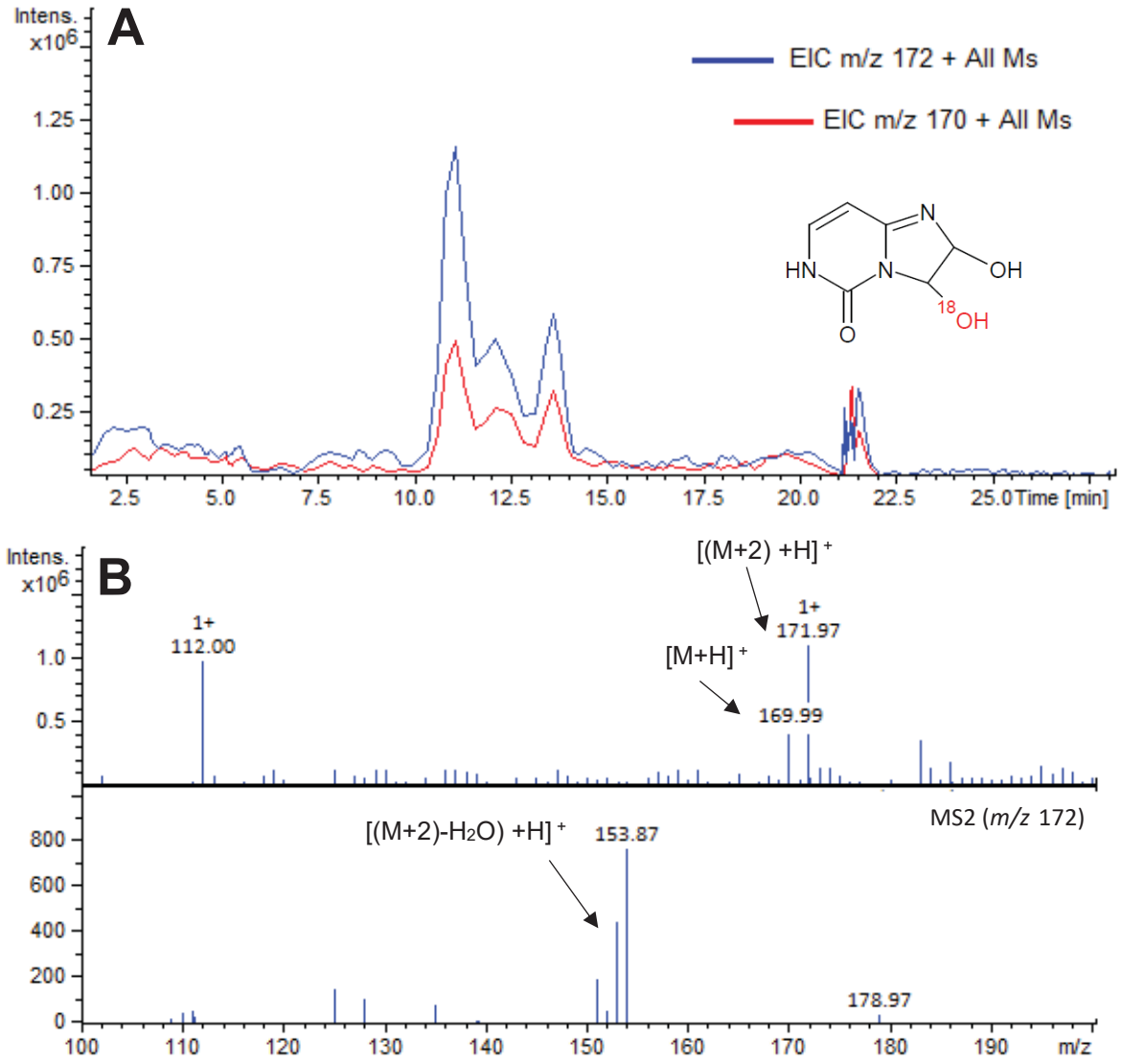
As reações feitas com o DHPN$^{18}O_2$, contendo o oxigênio isotopicamente marcado, foram realizados com a finalidade de investigar se ocorria a participação do $^1O_2$ na formação dos produtos, pois a termodecomposição do DHPN$^{18}O_2$ resulta na formação de $^{18}[^1O_2]$. Dessa forma, foram avaliados e extraídos os espectros de cada um desses produtos.

Como resultado, na citosina não ocorreu a incorporação do oxigênio marcado, portanto seu espectro de massas permaneceu com *m/z* 112 $[M+H]^+$ correspondente a base protonada. Entretanto, nos produtos N-formil citosina e citosina-glicol ocorreu a incorporação de um átomo de oxigênio marcado em cada molécula, confirmando a participação do $^1O_2$ na formação destes produtos.

No espectro de massa produto citosina-glicol (figura 46), extraído no tempo de 11 min, foi possível observar o íon *m/z* 170 $[M+H]^+$, correspondente a base protonada e o íon *m/z* 172, correspondente a mesma molécula marcada $[(M+2)+H]^+$. A fragmentação do íon *m/z* 172 gera um fragmento em *m/z* 154 que corresponde a perda de H_2O, similar a fragmentação do citosina-glicol não marcado.

No espectro de massa produto *N*-formil-citosina (figura 47), extraído no tempo de 12 min, foi possível observar o íon *m/z* 140 $[M+H]^+$, correspondente a base protonada e o íon *m/z* 170, correspondente a mesma molécula marcada $[(M+2)+H]^+$. A fragmentação do íon *m/z* 142 gera um fragmento em *m/z* 112 que corresponde a citosina, ou seja, ocorreu a perda de *m/z* 30 que corresponde a carbonila marcada com o $^{18}[^1O_2]$.

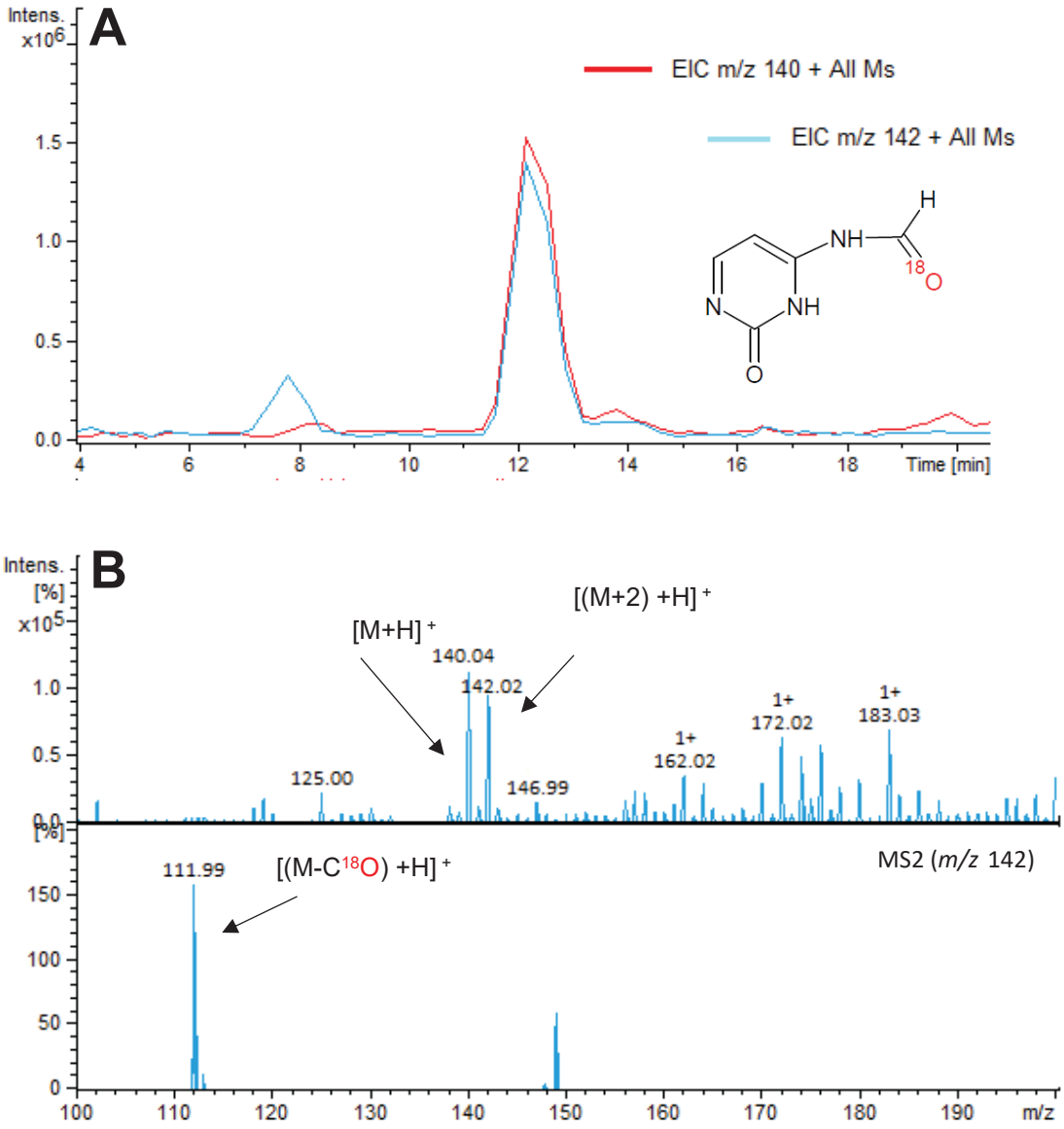
Figura 45 - Cromatograma do produto citosina-glicol marcada isotopicamente a partir do DHPN$^{18}O_2$



Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição de cromatogramas obtidos da análise de LC-MS/MS obtido pelo modo *EIC m/z* 170 (em vermelho) e *m/z* 172 (em azul) (B) Espectro de massas do produto citosina-glicol (*m/z* 172, íon correspondente não marcado *m/z* 170) obtido em 11 min. MS2 = Fragmentação do íon precursor *m/z* 172 → *m/z* 154.

Figura 46 - Cromatograma do produto *N*-formil-citosina marcada isotopicamente a partir do DHPN$^{18}O_2$



Fonte: o autor (2022).

Nota: (A) Sobreposição de cromatogramas obtidos da análise de LC-MS/MS obtido pelo modo EIC *m/z* 140 (em vermelho) e *m/z* 142 (em azul) (B) Espectro de massas do produto *N*-formil-citosina (*m/z* 142, íon correspondente não marcado *m/z* 140), obtido em 12 min. MS2 = Fragmentação do íon precursor 142 *m/z* →112 *m/z.*

.

5 DISCUSSÃO

Os etenoadutos de DNA têm sido extensivamente estudados nos últimos anos principalmente devido a sua correlação com exposição a carcinógenos ocupacionais e ambientais (BARBIN, 2000; LOUREIRO et al., 2002; BARTSCH, 2011; TUDEK et al., 2016; MEDEIROS, 2019). Além deste mecanismo de formação exógena, também foi mostrado que a formação destas lesões pode ocorrer de forma endógena por meio da peroxidação lipídica. Por exemplo, o DDE, um dos hidroperóxidos lipídicos mais tóxicos formado nesse evento, pode reagir com a dAdo e a dGuo resultando na formação de 1, N^6-εdAdo e 1, N^2-εdGuo, respectivamente (LOUREIRO et al., 2000; LOUREIRO et al., 2002). Além disso, no processo de peroxidação lipídica também ocorre a formação de vários outros produtos radicais e não radicais. Os produtos não radicais, por serem mais estáveis, podem ter um alcance maior e atingir regiões mais distantes da célula. Dentre os produtos não radicais formados na peroxidação lipídica, o $^1O_2$ merece atenção em razão de ser uma ROS com elevado potencial oxidante, capaz de danificar biomoléculas (WEST, 2006; MEDEIROS, 2019).

A estabilidade química dos etenoadutos já foi avaliada em várias condições diferentes, incluindo frente a alguns processos oxidativos (YIP & TSOU, 1973; BASU et al.,1993; SPEINA et al., 2001, 2003; BARBATI et al., 2010). Martinez et al. (2018) avaliou a reatividade da lesão 1, N^2-εdGuo frente ao $^1O_2$ e observou a restauração do nucleosídeo de origem, sugerindo que o $^1O_2$ poderia exercer um papel no reparo de etenoadutos de DNA. Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a relevância biológica da reação entre 1, N^2-εdGuo e o $^1O_2$ por meio da quantificação de desativação total do $^1O_2$ (k_t) em D_2O. O valor de k_t da dGuo e do 1, N^2-εdGuo resultaram em valores muito próximos, ou seja, o $^1O_2$ não tem uma preferência entre reagir com a base ou a lesão (MARTINEZ et al., 2018).

No presente estudo foi realizada a oxidação pelo $^1O_2$ de dois etenoadutos de DNA o 3, N^4-εCit, derivado da base citosina e o do 1, N^6-εdAdo, derivado do nucleosídeo do dAdo. A geração de $^1O_2$ foi realizada por fotossensibilização do tipo II usando o corante rosa bengala, submetido a irradiação em um comprimento de onda (λ) específico empregando a luz LED verde (523nm) que permite gerar somente o $^1O_2$ (ALLEN et al., 1991). Também foi empregada outra metodologia para gerar $^1O_2$, a

partir do $DHPNO_2$, com a finalidade de confirmar os dados. A seguir serão discutidos com mais detalhes a reação com cada etenoaduto.

5.1 Oxidação do 1, N^6-eteno-2'-desoxiadenosina pelo $^1O_2$

Inicialmente, foi realizada a foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo utilizando o corante rosa bengala para geração de $^1O_2$ no sistema. De acordo com os dados obtidos nas análises de HPLC-PDA e LC-MS/MS, utilizando estas metodologias, foi possível detectar e caracterizar dois produtos principais formados na reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$. O primeiro produto formado, na ordem de eluição, foi a dAdo – o nucleosídeo normal –, e o segundo foi o *N*-formil-dAdo. A detecção deste último produto sugere que o mecanismo envolvido seja via dioxetano, ou seja, o $^1O_2$ ataca a dupla ligação no anel contendo o grupo amino exocíclico pela cicloadição [2+2] originando o dioxetano. Este composto, por sua vez, é muito instável, ocasionando a quebra da ligação (O-O) resultando na formação de duas carbonilas, em seguida ocorre a clivagem de um grupo formil por ação da água formando o *N*-formil-dAdo.

Esse mecanismo de formação do dioxetano é um mecanismo clássico do $^1O_2$ amplamente estudado e pode ocorrer com várias biomoléculas como o triptofano (RONSEIN et al., 2009) , 8-oxodGuo (MARTINEZ et al., 2002) e o colesterol (UEMI et al., 2009; BAPTISTA et al., 2017). Além disso, sabe-se que os dioxetanos podem apresentar uma estabilidade muito variável dependendo da sua estrutura, podendo resultar na clivagem da ligação O-O produzindo dois compostos carbonílicos. O mecanismo mais aceito de decomposição de dioxetanos é o mecanismo concertado não sincronizado onde ocorre o rompimento da ligação C-C e O-O sendo que a segunda ocorre de forma mais avançada (TURRO E CHOW, 1981; ADAM E BAADER, 1985).

De acordo com Martinez *et al*., 2018, a reação de oxidação de outro etenoaduto, 1, N^2-εdGuo, pelo $^1O_2$ também resultou na formação do nucleosídeo normal (dGuo) e de um produto formilado (*N*-formil-dGuo) via dioxetano pelo mecanismo de cicloadição [2+2]. A semelhança dos produtos gerados provavelmente tem relação com a estrutura química destas moléculas, que apresentam uma dupla ligação no anel exocíclico contendo um grupamento amino, característico dos etenoadutos de DNA. Entretanto, além da formação destes dois produtos, a reação do 1, N^2-εdGuo com o

$^1O_2$ resultou na formação de um terceiro produto com um grupamento diol (dGuo-glicol) que não foi detectado na reação com o 1, N^6-εdAdo.

A 1, N^6-εdAdo, diferentemente do 3, N^4-εCit e do e 1, N^2-εdGuo, não possui carbonilas em sua estrutura; dessa forma, era esperado que poderia ocorrer um mecanismo diferente pelo $^1O_2$ nessa reação. Todavia, como ocorreu a detecção do produto formilado, isso mostra que, independentemente da presença desse grupamento na molécula, o ataque na dupla ligação do anel exocíclico é favorecido, formando o dioxetano.

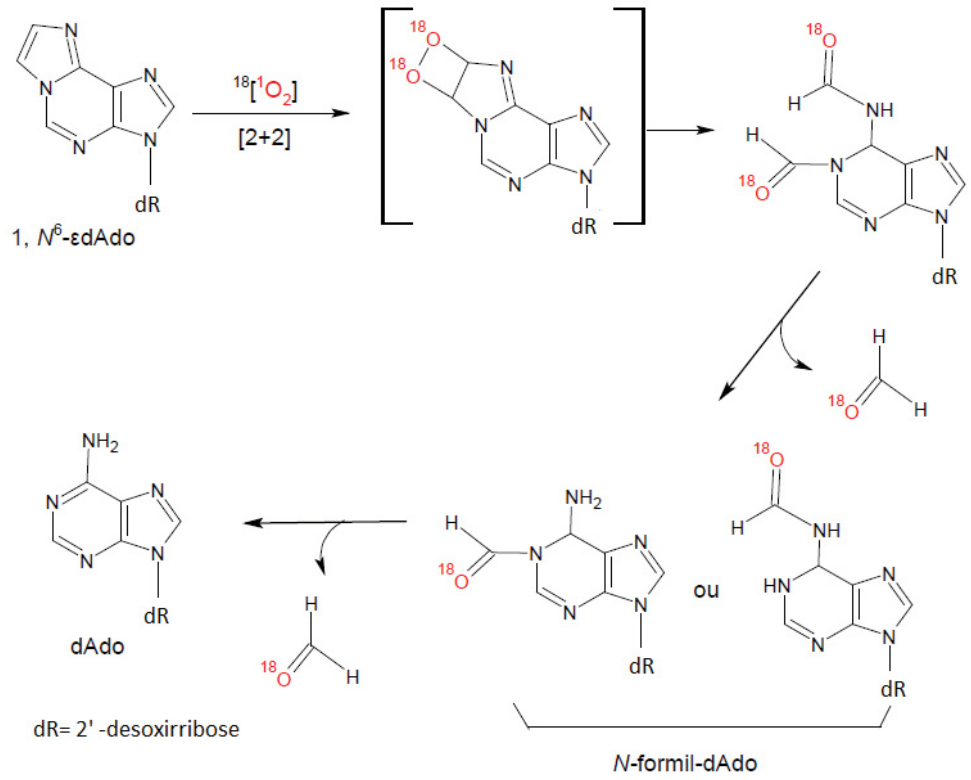
A confirmação destes resultados foi realizada a partir da termólise do endoperóxido DHPNO_2, outra ferramenta utilizada para produzir $^1O_2$. De acordo com Pierlot, (2000a), para se obter um bom rendimento de $^1O_2$ por essa metodologia é necessário submeter a reação a agitação e incubação a 37°C por 2,5h. Entretanto, conforme os resultados da análise de estabilidade destes produtos, foi demonstrado que o produto *N*-formil-dAdo degrada com essa temperatura em poucas horas após a reação de foto-oxidação, portanto, a temperatura interfere na formação destes produtos. Dessa forma, foram retiradas alíquotas durante a incubação da reação de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ gerado pelo DHPNO_2 a fim de melhorar a detecção dos produtos. Os resultados da cinética feita com o DHPNO_2 reproduziram os ensaios da foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo, confirmando a formação dos mesmos produtos. Além disso, foi visto que durante a incubação com o DHPNO_2 ocorria a degradação do N-formil-dAdo e aumento da formação de dAdo, ou seja, a oxidação N^6-εdAdo pelo $^1O_2$ resulta no nucleosídeo normal como produto da reação.

Para investigar com mais detalhes os mecanismos envolvidos na reação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$, também foram realizados os ensaios com marcações isotópicas utilizando o DHPN$^{18}O_2$. Este ensaio permitiu visualizar a marcação de um átomo de oxigênio na molécula de N-formil-dAdo, confirmando que é um produto do oxigênio singlete. Dessa forma, foi proposta a rota para formação desse produto foi esquematizado na figura 48.

Para obter mais informações sobre o mecanismo, foi avaliada a participação de H_2O na reação de foto-oxidação do 1, N^6-εdAdo com o rosa bengala para geração de $^1O_2$ em $H_2{}^{18}O$. Os dados obtidos na análise dessa reação por LC-MS/MS mostraram que pode ocorrer a participação da H_2O no produto *N*-formil-dAdo, pois ocorreu a incorporação de um átomo de oxigênio marcado (^{18}O) na molécula. A incorporação do isótopo pode ser explicada pelo mecanismo clássico de formação de hidratos por meio

da adição nucleofílica de água em grupos carbonílicos, como aldeídos e cetonas. Nesta reação a água atua como um nucleófilo e pode reagir com a carbonila presente no grupamento aldeído da molécula *N*-formil-dAdo resultando na formação de um diol germinal. A presença das duas estruturas depende do equilíbrio na reação (figura 23). (BRUICE, 1998; SOLOMONS, 2000).

Figura 47 - Rota de formação para os produtos de oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$



Fonte: o autor (2022).

Nota: Inicialmente o 1, N^6-εdAdo é oxidado pelo $^1O_2$ por meio da cicloadição [2+2] e resulta na formação de um intermediário dioxetano. Este, por sua vez, sofre uma clivagem na ligação (O-O) e resulta na formação de duas carbonilas nas extremidades. Em seguida ocorre a perda do grupo formil, pela ação da água originando o produto *N*-formil-dAdo que também pode perder o outro grupo formil resultando na formação de dAdo.

5.2 Oxidação do 3, N^4-etenocitosina pelo $^1O_2$

Na reação de foto-oxidação do 3, N^4-εCit utilizando o corante rosa bengala, diferente do que ocorreu para o 1, N^6-εdAdo, foram detectados três produtos pelas análises de HPLC-PDA e LC-MS/MS. Os produtos detectados foram caracterizados como: citosina-glicol, *N*-formil-citosina, e a citosina. A detecção do *N*-formil-citosina, assim como ocorreu na reação com o 1, N^6-εdAdo, também sugere que o mecanismo envolvido seja via dioxetano, ou seja, o $^1O_2$ ataca a dupla ligação no anel contendo o grupo amino exocíclico pela cicloadição [2+2] originando o dioxetano. Este composto, por sua vez, é muito instável, ocasionando a quebra da ligação (O-O) resultando na formação de duas carbonilas, uma das carbonilas é clivada na molécula por ação da água formando o *N*-formil-citosina. Outro produto foi detectado na reação caracterizado como citosina-glicol cujo mecanismo ainda não é muito claro.

A reação de oxidação do 3, N^4-εCit resultou em três produtos, assim como ocorreu na reação de oxidação do 1-N^2-εdGuo. Além do produto formilado e o nucleosídeo normal, também ocorreu a formação de uma molécula com um grupamento glicol (diol). Como ambas as moléculas possuem uma carbonila em sua estrutura, diferente do 1, N^6-εdAdo, sugere-se que a presença desse grupamento favoreça a formação e estabilidade deste produto.

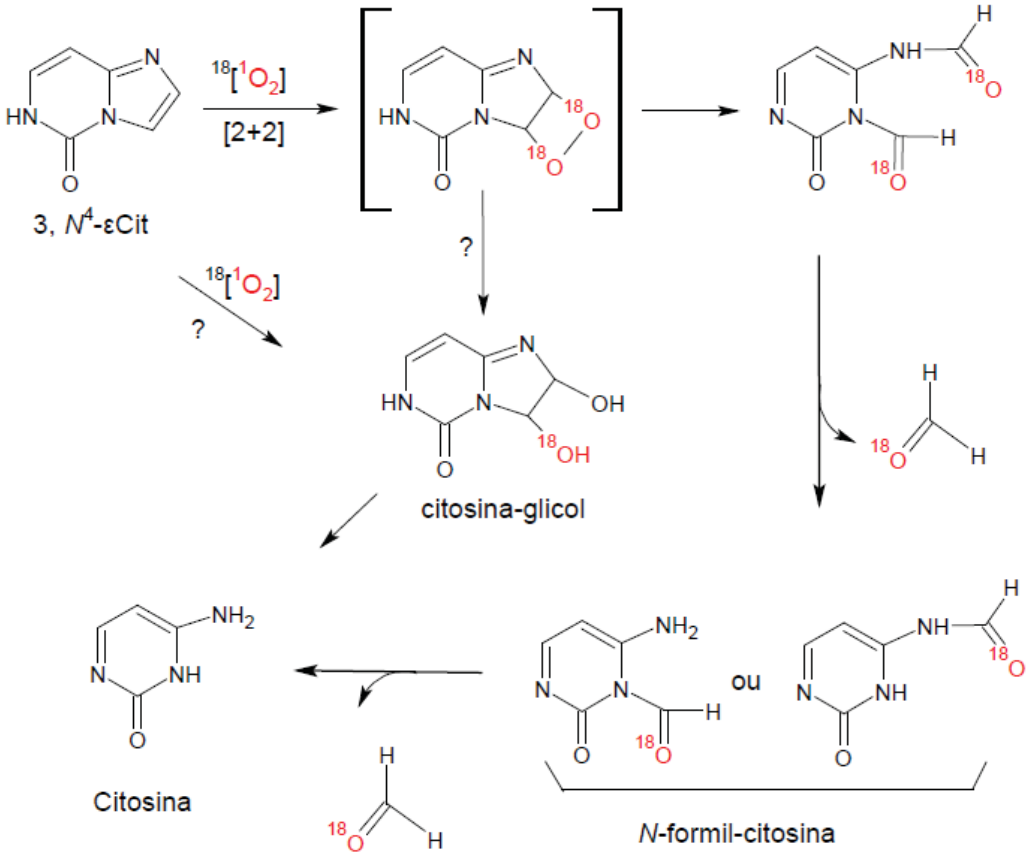
Com a finalidade de confirmar estes dados, a mesma reação foi realizada a partir da termólise do endoperóxido DHPN$^{16}O_2$ e o DHPN$^{18}O_2$, outra ferramenta utilizada para produzir $^1O_2$. Da mesma forma que o 1, N^6-εdAdo, os resultados da análise de estabilidade destes produtos realizados a partir da incubação da reação a 37°C em uma estufa, foi demonstrado que os produtos citosina-glicol e o *N*-formil-citosina degradam com essa temperatura em poucas horas após a reação de foto-oxidação. Portanto, também foram retiradas alíquotas durante a incubação da reação de oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$ gerado pelo DHPNO_2 a fim de melhorar a detecção dos produtos. No entanto, a cinética com o DHPNO_2 detectou somente dois produtos, a citosina e o *N*-formil citosina. Em razão disso, a realização da cinética com o DHPN$^{18}O_2$ foi realizada com um volume maior de injeção.

A reação de oxidação pelo $^1O_2$ foi realizada utilizando DHPN$^{18}O_2$, a decomposição térmica deste derivado endopéroxido gera o $^{18}[^1O_2]$. A utilização da técnica espectrometria de massas é fundamental para realizar a detecção dos

produtos e visualizar a incorporação do isótopo ^{18}O. Com essa técnica foi demonstrado que ocorreu a incorporação do isótopo do oxigênio (^{18}O) na molécula *N*-formil-citosina e um oxigênio na citosina-glicol. Esses dados confirmaram que estes dois produtos são resultantes da oxidação pelo $^1O_2$, provavelmente pelo mecanismo de cicloadição [2+2] com um intermediário dioxetano. Dessa forma, foi proposta a rota para formação desse produto foi esquematizado na figura 49.

O mecanismo de formação do produto citosina-glicol ainda não está muito claro, pois não é um produto comum da decomposição de um dioxetano. Delaney et al., (2005), relatou uma estrutura similar ao citosina-glicol originada a partir da oxidação da lesão 1, N^6-εdAdo pela enzima Alk B via epóxido seguida de uma hidratação. Entretanto, de acordo com a literatura não é comum ocorrer a decomposição de dioxetanos a epóxidos. Portanto, o $^1O_2$ poderia estar atuando por algum mecanismo diferente. Além disso, os resultados deste trabalho mostraram um sinal de possível participação da H_2O nesse mecanismo, de acordo com a reação de fotossensibilização realizada em $H_2{}^{18}O$, pois foi identificado a citosina glicol com a incorporação do isótopo no mesmo tempo de retenção do produto e também o produto não marcado. Entretanto, como não foi possível fragmentar a molécula devido seu baixo rendimento, ainda é necessário confirmar esses dados com técnicas mais sensíveis. O baixo rendimento do produto pode ser explicado em decorrência da menor formação de $^1O_2$ em solvente aquoso em relação ao solvente deuteurado (SCHMIDT; AFSHARI, 1992). Isso ocorre pelas vibrações dos grupamentos OH que contribuem para o decaimento do estado singlete para o triplete. Além disso, também foi visto que no produto *N*-formil-citosina, pode ocorrer incorporação de um átomo de ^{18}O da $H_2{}^{18}O$ na molécula, pelo mesmo mecanismo discutido na oxidação do 1, N^6-εdAdo pelo $^1O_2$, através da adição nucleofílica de água em aldeídos (figura 41) (BRUICE, 1998; SOLOMONS, 2000).

Figura 48 - Possível rota de formação para os produtos de oxidação do 3, N^4-εCit pelo $^1O_2$



Fonte: o autor (2022).

Nota: Inicialmente o 3, N^4-εCit é oxidado pelo $^1O_2$ por meio da cicloadição [2+2] e resulta na formação de um intermediário dioxetano. Este, por sua vez, pode sofrer uma clivagem na ligação (O-O) e resultar na formação de duas carbonilas nas extremidades. Em seguida ocorre a perda do grupo formil, pela ação da água originando o produto *N*-formil-citosina que também pode perder o outro grupo formil resultando na formação de citosina. O mecanismo de formação do citosina-glicol ainda não está claro, sugere-se que ele pode ser formado pelo dioxetano, ou por outro mecanismo do $^1O_2$ na oxidação do 3, N^4-εCit ainda desconhecido.

No presente trabalho, foi mostrado que independente da diferença na estrutura química destes etenoadutos, o $^1O_2$ seguiu um padrão de mecanismo de oxidação favorecendo a formação da base/nucleosídeo como produto final, restaurando-o. Estudos mostraram que o $^1O_2$ pode se comportar de forma diferente na oxidação de um composto isolado, no composto incorporado em um oligonucletídeo ou na célula (DUARTE et al., 2000; MARTINEZ et al., 2002; DI MASCIO et al., 2019). Por exemplo, a oxidação pelo $^1O_2$ da lesão de DNA 8-oxodGuo, quando isolada, resulta na formação predominante de dSp e baixas concentrações de dOz (MARTINEZ et al., 2002). Entretanto, quando inserida em um oligonucletídeo, prevalece a formação de ácido oxalúrico (DUARTE et al., 2000). Estes mecanismos

foram evidenciados a partir de uma fonte química de $^1O_2$ isotopicamente marcada. Dessa forma, muitos fatores podem interferir e alterar o favorecimento dos produtos pela oxidação desta ROS. Considerando isso, o estudo da oxidação dos etenoadutos de DNA pelo $^1O_2$ em diferentes contextos é relevante.

Ao longo dos anos, muitos trabalhos buscaram desenvolver e aprimorar metodologias analíticas ultrassensíveis para a detecção de etenoadutos de DNA em células e amostras biológicas com o objetivo de utilizá-los como biomarcadores de doenças e estresse oxidativo (LOUREIRO 2000; HAM et al. 2004; (SUN et al. 2006) GAVINA et al. (2014; LI et al. 2015). Com este crescente desenvolvimento, será possível fornecer maiores informações e estudar com mais detalhes a oxidação destas lesões no contexto celular, principalmente no *pool* de nucleotídeos (reservatório de desoxinucleotídeos), considerado um alvo sensível devido à proximidade com fontes primárias de ROS como a mitocôndria e os peroxissomos (HAGHDOOST et al., 2006 HAGHDOOST et al., 2006) e não apresenta proteção como o DNA.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, realizou-se o estudo da oxidação de duas lesões de DNA (3, N^4-εCit e 1, N^6-εdAdo) pelo $^1O_2$ utilizando diferentes estratégias e metodologias para detectar e caracterizar os produtos de oxidação. O conjunto das técnicas de cromatografia, espectrometria de massas, marcações isotópicas e RMN foram essenciais para investigar os mecanismos das reações.

As metodologias utilizadas para as síntese e purificação do etenoadutos de DNA 3, N^4-εCit e 1, N^6-εdAdo foram eficientes e tiveram um rendimento adequado para a realização do trabalho. As adaptações dos métodos da literatura para as análises de HPLC-PDA e LC-MS/MS foram reprodutíveis e tiveram boa resolução para realizar a detecção e caracterização dos etenoadutos de DNA e seus produtos de oxidação.

A oxidação do etenoaduto 1, N^6-εdAdo resultou na formação dos produtos *N*-formil-dAdo e dAdo. A análise de estabilidade mostrou que o *N*-formil-dAdo degrada a 37°C, resultando na formação de dAdo como produto final.

A oxidação do etenoaduto 3, N^4-εCit resultou na formação do citosina-glicol, *N*-formil-citosina e a citosina. As análises de estabilidade dos produtos sugerem que os produtos citosina glicol e *N*-formil citosina se decompõem a 37°C formando a citosina como produto final da reação.

Os ensaios com marcações isotópicas permitiram confirmar a participação do $^1O_2$ na formação dos produtos de oxidação e investigação dos mecanismos mostrando que o mecanismo via dioxetano é o mais compatível com os resultados obtidos.

Portanto, os dados obtidos neste estudo demonstraram que os etenoadutos de DNA 3, N^4-εCit e 1, N^6-εdAdo, são susceptíveis a oxidação pelo $^1O_2$ formando os produtos finais citosina e 2'-desoxiadenosina, respectivamente, ou seja, o $^1O_2$ restaurou a base e/ou nucleosídeo de origem.

Em suma, este estudo contribuiu na elucidação das bases químicas envolvidas na oxidação de etenoadutos de DNA pelo $^1O_2$ através da caracterização dos produtos e investigação da decomposição destes produtos. Além disso, fortaleceu a importância da investigação do papel do $^1O_2$ no contexto de reparo de etenoadutos de DNA e forneceu mais informações que contribuem no favorecimento de produtos do $^1O_2$.

7 REFERÊNCIAS

ADAM, W., BAADER, W. J. Effects of methylation on the thermal stability and chemiluminescence properties of 1,2-dioxetanes. Journal of the American Chemical Society 107(2): 410-416. 1985.

ADAM, W.; KAZAKOV, D. V.; KAZAKOV, V. P. Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 9, p. 3371–3387, 2005.

AKASAKA, S.; GUENGERICH, F. P. Mutagenicity of site-specifically located 1,N2-ethenoguanine in Chinese hamster ovary cell chromosomal DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, n. 6, p. 501–507, 1999.

ALLEN, M. T.; LYNCH, M.; LAGOS, A.; REDMOND, R. W.; KOCHEVAR, I. E. A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. **BBA - General Subjects**, v. 1075, n. 1, p. 42–49, 1991.

BACELLAR, I.; OLIVEIRA, MARIA CECÍLIA; DANTAS, L.; et al. dependent reactions between photosensitizer and lipids Photosensitized membrane permeabilization requires contact- dependent reactions between photosensitizer and lipids. , 2018.

BAPTISTA, S.; CADET, J.; MASCIO, P. DI; et al. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions : Guidelines and. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p. 912–919, 2017.

BARBATI, S.; BONNEFOY, A.; BOTTA, A.; CHIRON, S. Chemosphere DNA adducts . Consequences in oxidative stress biomarker development. , v. 80, p. 1081–1087, 2010.

BARBIN, A. Etheno-adduct-forming chemicals: From mutagenicity testing to tumor mutation spectra. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 462, n. 2–3, p. 55–69, 2000.

BARTSCH, H.; BARBIN, A.; MARION, M.; NAIR, J. FORMATION , DETECTION , AND ROLE IN CARCINOGENESIS OF ETHENOBASES IN DNA *. , v. 26, p. 349–371, 1994.

BASU, A. K.; WOOD, M. L.; NIEDERNHOFER, L. J.; RAMOS, L. A.; ESSIGMANN, J. M. Mutagenic and Genotoxic Effects of Three Vinyl Chloride-Induced DNA Lesions: 1 ,p-Ethenoadenine, 3,N4-Ethenocytosine, and 4-Amino-5-(imidazol-2-yl)imidazole+. **Biochemistry**, v. 32, p. 12793–12801, 1993.

BOITEUX, S.; GAJEWSKI, E.; LAVAL, J.; DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. Biochemistry. v. 31, n. 1, p. 106-110, 1992.

BLOODWORTH, A., EGGELTE, H. Endoperoxides. Singlet O2. Frimer, A. A., CRC Press, Boca Raton. II: 93-204. 1985.

BRUICE, P. Y.; **Organic Chemistry**, 2nd ed., Prentice Hall: New Jersey, 1998.

CARVALHO, V. M.; MASCIO, P. DI; CAMPOS, I. P. D. A.; et al. Formation of 1 , N 6 -Etheno-2 ′ -deoxyadenosine Adducts by trans , trans -2 , 4-Decadienal. **Chem. Res. Toxicol**, v. 11, n. 98, p. 1042–1047, 1998.

CARVALHO, V. M.; ASAHARA F.; DI MASCIO P. Novel 1,N^{6}-Etheno-2-deoxyadenosine Adducts from Lipid Peroxidation Products. Chem. Res. Toxicol. *13,* 397-405, 2000.

CARVALHO, V. M. Adutos de DNA gerados por Produtos da Lipoperoxidação: caracterização, detecção, incorporação em Oligonucleotídeos e Implicações Biológicas. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001

CADET, J.; BERGER, M.; DOUKI, T., AND ; RAVANAT, J. L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biological significance. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. v. 131, n. p. 1-87, 1997.

DAVIES, M.J., 2004. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. Photochem. Photobiol Sci. 3, 17-25. 2004.

DELANEY, J. C.; SMEESTER, L.; WONG, C.; et al. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation in vitro and in vivo. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, n. 10, p. 855–860, 2005.

DEWILDE, A; PELLIEUX, C.; PIERLOT, C.; WAURÉ P.; AUBRY, J.M. Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide, Biol. Chem., 379, 1377, 1998.

DUARTE, V.; GASPARUTTO, D.; YAMAGUCHI, L. F.; et al. Oxaluric Acid as the Major Product of Singlet Oxygen-Mediated Oxidation of 8-Oxo-7 , 8-dihydroguanine in DNA. , , n. 17, p. 12622–12628, 2000.

FLOYD, R.A., WEST, M.S., ENEFF, K.L., SCHNEIDER, J.E. Mediation of 8-hydroxy-guanine formation in DNA by thiazin dyes plus light. Free Radic Biol Med. 8(4), 327-330. 1990.

FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type I1. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FOOTE, CHRISTOPHER S. Photosensitized Oxygenations and the Role of Singlet Oxygen. **Accounts of Chemical Research**, v. 1, n. 4, p. 104–110, 1968.

FOOTE, C S. Mechanisms of photosensitized oxidation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 162, n. 3857, p. 963–70, 1968. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4972417>. .

FOOTE, C. S.; WEXLER, S. Olefin Oxidations with Excited Singlet Molecular Oxygen. , v. 86, n. 18, p. 3879–3880, 1964.

FOOTE, C. S.; VALENTINE, J.; GREENBERG, A.; LIEBMAN, J. Active Oxygen in Chemistry. Blackie, New York. v. n. p. 31, 1995.

GATES, K. S. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 1747–1760, 2009.

GAVINA, J. M. A.; YAO, C.; FENG, Y. Talanta Recent developments in DNA adduct analysis by mass spectrometry : A tool for exposure biomonitoring and identi fi cation of hazard for environmental pollutants. **Talanta**, v. 130, p. 475–494, 2014. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.050>. .

EL GHISSASSI, F.; BARBIN, A.; NAIR, J.; BARTSCH, H. Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. **Chemical research in toxicology**, v. 8, n. 2, p. 278–83, 1995.

GIROTTI, W. Photobiology school photodynamic lipid peroxidation in biological systems*. , v. 51, p. 497–509, 1990.

GUENGERICH, F. P.; KIM, D. H.; IWASAKI, M. Role of Human Cytochrome P-450 IIE1 in the Oxidation of Many Low Molecular Weight Cancer Suspects. **Chemical Research in Toxicology**, v. 4, n. 2, p. 168–179, 1991.

HAGHDOOST, S.; CZENE, S.; NA, I. Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. , v. 39, n. February, p. 153–162, 2006.

HAM, A. L.; ENGELWARD, B. P.; KOC, H.; et al. New immunoaffinity-LC-MS / MS methodology reveals that Aag null mice are deficient in their ability to clear 1 , N 6 -etheno-deoxyadenosine DNA lesions from lung and liver in vivo. , v. 3, p. 257–265, 2004.

KAJIWARA, T.; KEARNS, D. R. Direct Spectroscopic Evidence for a

Deuterium Solvent Effect on the Lifetime of Singlet Oxygen in Water. , v. 605, n. 1964, p. 5886–5890, 1973.

KANEKO, T.; HONDA, S.; NAKANO, S. I.; MATSUO, M. Lethal effects of a linoleic acid hydroperoxide and its autoxidation products, unsaturated aliphatic aldehydes, on human diploid fibroblasts. **Chemico-Biological Interactions**, v. 63, n. 2, p. 127–137, 1987.

KANOFSKY, J. R.; AXELROD, B. Singlet oxygen production by soybean lipoxygenase isozymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 3, p. 1099–1104, 1986. Â© 1986 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36059-3>. .

KANOFSKY, J. R.; SIMA, P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 14, p. 9039–9042, 1991.

KAUTSKY, H. QUENCHING OF LUMINESCENCE BY OXYGEN. **Trans. Faraday Soc.**, v. 35, p. 216, 1938.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperox. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 301, p. 598–625, 2005.

KLOTZ, L.; PELLIEUX, C.; BRIVIBA, K.; et al. Mitogen-activated protein kinase (p38- , JNK- , ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. , v. 922, p. 917–922, 1999.

KEARNS, D. R. Selection rules for singlet-oxygen reactions. Concerted addition reactions. Journal of the American Chemical Society 91(24): 6554-6563. 1969.

KOCHETKOV, N. K. SHIBAEV, V. N. KOST, A. A. New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acids modification. Tetrahedron Letters, 1971.

KULIG, M.J., SMITH, L.L. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. J. Org. Chem. 38, 3639-3642. Lassegue. 1973.

LANGOUET, S.; MICAN, A. N.; MULLER, M.; et al. Erratum: Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by Escherichia colli polymerases in vitro and in vivo: 1,N2-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1,2- a]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9. **Biochemistry**, v. 37, n. 24, p. 8816, 1998.

LEVINE, R. L.; YANG, I. Y.; HOSSAIN, M.; et al. Mutagenesis induced by a single 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells. **Cancer Research**, v. 60, n. 15, p. 4098–4104, 2000.

LI, H.; CUI, S.; WANG, S.; JIANG, X.; ZHANG, S. Ultrasensitive UPLC-MS-MS Method for the Analysis of Etheno-DNA Adducts in Human White. , 2015.

LI, Z.; QIAN, X.; XU, Y. Synthesis and properties of oligonucleotides containing fluorescent ethenodeoxyadenosine and ethenodeoxycytidine. , v. 54, p. 247–252, 2002.

LITINSKI, V.; CHENNA, A.; SAGI, J.; SINGER, B. Sequence context is an important determinant in the mutagenic potential of 1,N6-ethenodeoxyadenosine (εA): Formation of εA basepairs and elongation in defined templates. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 8, p. 1609–1615, 1997.

LOUREIRO, A. P. M.; DI, P.; MEDEIROS, M. H. G. formação de adutos exocíclicos com bases de dna: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Mutagenesis**, v. 25, n. 5, p. 777–793, 2002.

LOUREIRO, A P M; DI MASCIO, P.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H. G. trans,trans-2,4-Decadienal-induced 1,N-2-etheno-2 '-deoxyguanosine adduct formation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 7, p. 601–609, 2000.

LOUREIRO, ANA PAULA M; MASCIO, P. DI; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H. G. Adduct Formation. **Chem. Res. Toxicol**, v. 13, p. 601–609, 2000.

LOUREIRO, A. P. M. CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE ADUTOS ENTRE 2'-DESOXIGUANOSINA E TRANS,TRANS-2,4-DECADIENAL. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

MANO, C. M.; PRADO, F. M.; MIYAMOTO, S.; et al. Excited singlet molecular O2 (1Dg) is generated enzymatically from excited carbonyls in the dark. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 4, p. 1–10, 2014.

MAZUR, S.; FOOTE, C. S. Chemistry of singlet oxygen. IX. Stable Dioxetane from Photooxygenation of Tetramethoxyethylene. J. Am. Chem. Soc. 92, 3225−3226. 1970.

MARTINEZ, G. R.; BRUM, H.; LANZI, G. S.; et al. Oxidation of 1-N2-etheno-2′-deoxyguanosine by singlet molecular oxygen results in 2′-deoxyguanosine: a pathway to remove exocyclic DNA damage? **Biol. Chem**, v. 399, n. 8, p. 859–867, 2018.

MARTINEZ, G. R.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J. L.; et al. Identification of the main oxidation products of 8-methoxy-2′- deoxyguanosine by singlet molecular

oxygen. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 11, p. 1491–1500, 2005.

MARTINEZ, G. R.; DI MASCIO, P.; BONINI, M. G.; et al. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen (1ΔgO2) and nitroxyl (NO-). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10307–10312, 2000.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; RAVANAT, J.; CADET, J.; MASCIO, P. DI. [^{18} O] -Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7 , 8-Dihydroguanine Oxidative Damage : Detection of Spiroiminodihydantoin , Imidazolone and Oxazolone Derivatives. , v. 383, n. April, p. 607–617, 2002.

MCCAPRA, F. An application of theory of electrocyclic reactions to bioluminescence. Chemical Communications(3): 155. 1968.

NAIR V., OFFERMAN R. J. Ring-extended products from the reaction of epoxy carbonyl compounds and nucleic acid bases. *J. Org. Chem*. 50, 5627–5631.1985.

NAIR, J.; CARMICHAEL, P. L.; FERNANDO, R. C.; PHILLIPS, D. H.; STRAIN, A. J.;BARTSCH, H.; Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1998.

DI MASCIO, P.; 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.

DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; et al. Singlet molecular oxygen: Düsseldorf - São Paulo, the Brazilian connection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 161–175, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.016>. .

DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MIYAMOTO, S.; et al. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 3, p. 2043–2086, 2019. review-article, American Chemical Society.

MASCIO, P. DI; SIES, H. Quantification of Singlet Oxygen Generated by Thermolysis of 3,3'-(1,4-Naphthylidene)dipropionate. Monomol and Dimol Photoemission and the Effects of 1,4-Diazabicyclo[2.2.2loctane. **J. Am. Chem. SO**, v. 111, p. 2909–2914, 1989.

MEDEIROS, M. H. G. Exocyclic DNA adducts as biomarkers of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 3, p. 419–425, 2009.

MEDEIROS, M. H. G. DNA damage by endogenous and exogenous aldehydes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 10, p. 2000–2009,

2019.

MIYAMOTO, S.; RONSEIN, G. E.; CORRÊA, T. C.; et al. Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite. **Dalton Transactions**, , n. 29, p. 5720–5729, 2009.

MUÑOZ, F.; MVULA, E.; BRASLAVSKY, S. E.; VON SONNTAG, C. Singlet dioxygen formation in ozone reactions in aqueous solution. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, , n. 7, p. 1109–1116, 2001.

PANDYA, G. A.; MORIYA, M. 1,N6-ethenodeoxyadenosine, a DNA adduct highly mutagenic in mammalian cells. **Biochemistry**, v. 35, n. 35, p. 11487–11492, 1996.

PERES, P. S. Alterações nos níveis das lesões oxidativas da guanina pelo oxigênio singlete geradas na presença de glutationa. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2016.

PIERLOT, C.; AUBRY, J. M.; BRIVIBA, K.; SIES, H.; DI MASCIO, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods in Enzymology**, v. 319, n. 1997, p. 3–20, 2000.

PIERLOT, C.; HAJJAM, S.; BARTHMY, C.; AUBRY, J. Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (102 , lag) carriers for biological media 1. , v. 36, p. 31–39, 1996.

RAVANAT, J. L.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40601–40604, 2000.

RONSEIN, G. E.; BOF, C.; HELENA, M.; MEDEIROS, G. DE; DI, P. Products of Tryptophan : A Combination of Tandem Mass Spectrometry Analyses and Isotopic Labeling Studies. **JAM**, v. 20, n. 2, p. 188–197, 2009. American Society for Mass Spectrometry. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2008.08.016>. .

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

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.

SATTSANGI, P. D.; LEONARD, N. J.; FRIHART, C. R. 1,N2-Ethenoguanine

and N2,3-Ethenoguanine. Synthesis and Comparison of the Electronic Spectral Properties of These Linear and Angular Triheterocycles Related to the Y Bases. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 20, p. 3292–3296, 1977.

SCHMIDT, R. Photosensitized Generation of Singlet Oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, n. 5, p. 1161–1177, 2007.

SCHMIDT, R.; AFSHARI, E. Collisional Deactivation of 02(’Ag) by Solvent Molecules. Comparative Experiments with 16O2 and 18O2. , v. 02, n. 6, p. 788–794, 1992.

SHIBUTANI, S.; SUZUKI, N.; MATSUMOTO, Y.; GROLLMAN, A. P. Miscoding Properties of 3 , N 4 -Etheno-2 ′ -deoxycytidine in Reactions Catalyzed by. **Biochemistry**, v. 2960, n. 96, p. 14992–14998, 1996.

SODUM, R. S.; CHUNG*, F.-L. Structural Characterization of Adducts Formed in the Reaction. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 2, p. 23–28, 1989.

SUN, X.; KARLSSON, A.; BARTSCH, H.; NAIR, J. New ultrasensitive 32P-postlabelling method for the analysis of 3,N4-etheno-2′-deoxycytidine in human urine. **Biomarkers**, v. 11, n. 4, p. 329–340, 2006.

SCHENCK, G. O.; EGGERT, H.; DENK, W. photochemische reaktionen. 3. uber Die Bildung Von Hydroperoxyden Bei Photosensibilisierten Reaktionen Von O-2 Mit Geeigneten Akzeptoren,Insbesondere Mit Alpha-Pinen Und Beta-Pinen. Justus Liebigs Ann. Chem. 1953, 584, 177−198.

SHEU, C.; FOOTE, C. S. Endoperoxide formation in a guanosine derivative. Journal of the American Chemical Society. v. 115, n. 22, p. 10446-10447, 1993.

SODUM, R. S.; CHUNG*, F.-L. Structural Characterization of Adducts

TERAO, J., MATSUSHITA, S. The isomeric compositions of hydroperoxides produced by oxidation of arachdonic acid with singlet oxygen. Agric. Biol. Chem. 45, 587-593. 1981.

TUDEK, A.; CZERWIŃSKA, J.; KOSICKI, K.; et al. DNA damage, repair and the improvement of cancer therapy – A tribute to the life and research of Barbara Tudekz. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 852, 2020.

TUDEK, B.; ZDŻALIK-BIELECKA, D.; TUDEK, A.; et al. Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes. **Free Radical Biology and Medicine**, , n. September, 2016.

TURRO, N. J.; CHOW, M. F.; RIGAUDY, J. Mechanism of Thermolysis of

Endoperoxides of Aromatic Compounds. Activation Parameters, Magnetic Field, and Magnetic Isotope Effects. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 24, p. 7218–7224, 1981.

UEMI, M.; RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. DI. Generation of Cholesterol Carboxyaldehyde by the Reaction of Singlet Molecular Oxygen [O 2 (1 ∆ g)] as Well as Ozone with Cholesterol. , v. 2, p. 875–884, 2009.

WEST, J. D.; MARNETT, L. J. Endogenous Reactive Intermediates as Modulators of Cell Signaling and Cell Death. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 2, p. 173–186, 2006.

WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; et al. HMDB : a knowledgebase for the human metabolome. , v. 37, n. October 2008, p. 603–610, 2009.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation : Mechanisms and Analysis. , p. 5944–5972, 2011.

ZDZALIK, D.; VÅGBØ, C. B.; KIRPEKAR, F.; et al. Protozoan ALKBH8 oxygenases display both DNA repair and tRNA modification activities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; **Organic Chemistry**, 7th ed., John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000.