

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2002.01.31	(73) Titular(es): COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH	
(30) Prioridade(s): 2001.06.22 IN DE07012001	RAFI MARG NEW DELHI 110 001	IN
(43) Data de publicação do pedido: 2004.03.31	(72) Inventor(es): INDU BHUSAN CHATTERJEE	PT
(45) Data e BPI da concessão: 2011.08.17 187/2011	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA O ISOLAMENTO DE UM OXIDANTE NOCIVO PRINCIPAL A PARTIR DO FUMO DE CIGARRO**

(57) Resumo:

OS COMPONENTES DO FUMO DE CIGARRO, CONHECIDOS ATÉ AGORA, NÃO EXPLICAM OS EFEITOS PERIGOSOS IMPRESSIONANTES DO FUMAR; ESTE INVENTO DESCREVE O ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E PROCEDIMENTOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA, PROPRIEDADES E ANÁLISE DO PRINCIPAL OXIDANTE NOCIVO RELATIVAMENTE ESTÁVEL (OXIDANTE DE FUMO DE CIGARRO) (OXIDANTE FC) PRESENTE NO FUMO DE CIGARRO, CUJO TEOR É DE CERCA DE 190��10 MG POR CIGARRO; O OXIDANTE FC ISOLADO É RESPONSÁVEL QUASE QUANTITATIVAMENTE PELO DANO OXIDATIVO DE PROTEÍNAS PRODUZIDO PELO EXTRACTO AQUOSO DE TODO O FUMO DE CIGARRO, É TAMBÉM RESPONSÁVEL PELO DANO OXIDATIVO DO ADN; UMA VEZ QUE O OXIDANTE FC É RELATIVAMENTE ESTÁVEL, ELE EXPLICA AINDA OS EFEITOS PERNICIOSOS DO FUMO DE CORRENTE LATERAL E DO FUMO PASSIVO; UM CERTO NÚMERO DE COMPOSTOS/AGENTES QUÍMICOS INCLUINDO A VITAMINA C MOSTROU PREVENIR, IN VITRO, A OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS INDUZIDA PELO OXIDANTE FC.

RESUMO

"Processo para o isolamento de um oxidante nocivo principal a partir do fumo de cigarro"

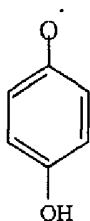
Os componentes do fumo de cigarro, conhecidos até agora, não explicam os efeitos perigosos impressionantes do fumar; este invento descreve o isolamento, identificação e procedimentos para a determinação da estrutura, propriedades e análise do principal oxidante nocivo relativamente estável (oxidante de fumo de cigarro) (oxidante fc) presente no fumo de cigarro, cujo teor é de cerca de 190 ± 10 mg por cigarro; o oxidante fc isolado é responsável quase quantitativamente pelo dano oxidativo de proteínas produzido pelo extracto aquoso de todo o fumo de cigarro, é também responsável pelo dano oxidativo do ADN; uma vez que o oxidante fc é relativamente estável, ele explica ainda os efeitos perniciosos do fumo de corrente lateral e do fumo passivo; um certo número de compostos/agentes químicos incluindo a vitamina C mostrou prevenir, *in vitro*, a oxidação de proteínas induzida pelo oxidante fc.

DESCRIÇÃO

"Processo para o isolamento de um oxidante nocivo principal a partir do fumo de cigarro"

Campo do invento

O presente invento refere-se a um processo para o isolamento da p-benzosemiquinona de fórmula 1:



um oxidante nocivo principal de fumo de cigarro. Mais particularmente, o presente invento proporciona um processo para o isolamento da p-benzosemiquinona, um oxidante nocivo principal de fumo de cigarro, que é responsável pelo dano oxidativo de proteínas e do ADN.

Antecedentes do invento

A exposição ao fumo de cigarro é a principal causa de doenças potencialmente fatais tais como bronquite, enfisema, outras doenças do tracto respiratório, doenças cardíacas coronárias, cancro dos pulmões e outras malignidades [1-5]. De facto, o fumo de cigarro é a maior causa de cancro do pulmão, agora, globalmente, o cancro mais comum. Uma vez que as abordagens para parar de fumar pelas campanhas de saúde pública e as leis anti-tabaco aprovadas pelos Governos locais têm tido um sucesso limitado, a abordagem mais viável é a prevenção dos efeitos perigosos causados pelo fumo de cigarro. Sabe-se que o fumo de cigarro contém cerca de 4000 componentes, dos quais cerca de 3000 componentes estão presentes na fase gasosa e cerca de 1000 componentes na fase de alcatrão [6]. Os oxidantes na fase gasosa, tais como O_2^- , H_2O_2 , NO, radical peróxi são extremamente instáveis [7]. Se a fase gasosa for passada em tampão de fosfato e a solução resultante for adicionada a solução de albumina, não ocorre

oxidação de proteínas (7). Aparentemente, espera-se que qualquer dano causado pela fase gasosa esteja restrinvido à cavidade bucal e tracto respiratório superior [8]. Por outro lado, o(s) oxidante(s) presente(s) no alcatrão é(são) bastante estável(eis) sendo este(s) aparentemente responsável(eis) pela produção de dano oxidativo no pulmão, coração e outros órgãos [7,9]. Cerca de 48 por cento dos componentes do alcatrão são solúveis em água [10] sendo o extracto aquoso do alcatrão conhecido por produzir dano oxidativo em macromoléculas biológicas incluindo proteínas e ADN [7,11,12]. Contudo, é difícil imaginar quantos dos componentes presentes no extracto aquoso do alcatrão são responsáveis pela produção de dano oxidativo no sistema biológico. Até agora, entre os muitos componentes do fumo de cigarro, foram sugeridas estarem implicadas como agentes causadores do desenvolvimento do cancro e doenças degenerativas, três classes de compostos, nomeadamente, (i) hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, (ii) nitrosaminas e (iii) radicais livres.

Entre os hidrocarbonetos policíclicos, o benzo[a]pireno é, de longe, o melhor estudado. No entanto, não é um carcinogénio e requer activação metabólica através do sistema do citocromo P450 para se tornar no carcinogénio final, o diol epóxido de benzo[a]pireno. Além disso, a concentração de benzo[a]pireno no fumo de cigarro é pouco abundante, cerca de 10 a 40 ng por cigarro [13], não explicando o benzo[a]pireno o dano oxidativo das proteínas produzido pelo fumo de cigarro.

Entre as nitrosaminas específicas do tabaco (TSNA), as mais estudadas são a N¹-nitrosonornicotina (NNN) e a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). De novo, as TSNA não são carcinogénios directos variando também amplamente as suas concentrações no fumo do tabaco. O intervalo observado para a NNN é de 0,004 µg a 1,35 µg e para a NNK, <0,004 µg a 1,75 µg por cigarro. Conclui-se que as TSNA no fumo de cigarro não são um índice suficiente para o potencial carcinogénico do fumo de cigarro [14]. De novo, as TSNA não podem explicar o dano oxidativo de proteínas.

Um outro aspecto do componente perigoso do fumo de cigarro é o radical livre. Pryor e seus colegas realizaram

estudos consideráveis sobre a química de radicais livres do fumo de cigarro e suas implicações toxicológicas. Estes autores sugeriram que o radical livre relativamente estável principal no alcatrão de cigarro pode ser um complexo de quinona/hidroquinona que é um sistema redox activo e que este sistema redox é capaz de reduzir o oxigénio molecular para produzir superóxido, conduzindo a radicais peróxido de hidrogénio e hidroxilo [15], que podem eventualmente conduzir a dano oxidativo de macromoléculas biológicas, no entanto, os investigadores observaram que o dano oxidativo de proteínas produzido pelos radicais estáveis de alcatrão não é inibido por SOD ou catalisador o que indica que o dano oxidativo não é mediado por radical superóxido ou peróxido de hidrogénio. Os requerentes observaram ainda que os radicais de alcatrão oxidam proteínas em atmosfera de azoto e na ausência de oxigénio molecular, o que indica uma interacção directa dos radicais de alcatrão com micromoléculas biológicas. No entanto, estes autores admitem que o radical principal identificado no alcatrão não é na realidade um monorradical e, provavelmente, não é uma espécie única (16). Eles admitem também que o alcatrão de cigarro é uma mistura incrivelmente complexa e uma vez que os radicais de alcatrão não foram isolados e claramente identificados, qualquer conclusão relativamente à química ou bioquímica dos radicais de alcatrão deve ser vista como uma sugestão [15].

Na publicação *Chemical Research in Toxicology*, vol. 11, no. 5, páginas 441-448, 00-00-1998, W.A. PRYOR: "Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar cause DNA damage", Pryor descreveu o fraccionamento de extractos aquosos de alcatrão de cigarro preparados a partir de alcatrão de cigarro envelhecido em fracções utilizando a separação em coluna de Sephadex. As fracções foram analisadas por UV e espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica (EPR) e cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS). Pryor identificou os radicais o- e p-benzosemiquinona, no entanto, o radical p-benzosemiquinona não foi isolado e separadamente caracterizado.

Na publicação *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 9-10, páginas 1064-1079, 00-00-1999, Koustubh Panda:

"Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis", encontra-se a discussão de que o extracto de fumo de cigarro contém oxidantes estáveis que oxidam as proteínas plasmáticas humanas, albumina de soro de bovino, homopolímeros de aminoácidos e causam também degradação oxidativa extensa de proteínas microssomais e que a vitamina C previne os oxidantes de proteína induzidos por fumo de cigarro. Não há qualquer informação descrita relativa ao isolamento e caracterização do oxidante nocivo a partir do extracto aquoso de fumo de cigarro.

É de mencionar que nos anos 60, a indústria do tabaco, em geral, provou nos seus próprios laboratórios que o alcatrão de cigarro causa cancro em animais [17]. Ao longo dos anos 60, os investigadores das companhias descobriram os elementos tóxicos no fumo de cigarro com a convicção de que se os componentes tóxicos podiam ser identificados, estes agentes podiam ser removidos ou eliminados e podia ser criado um cigarro "seguro", que iria distribuir nicotina sem distribuir as substâncias tóxicas [17]. No entanto, no final dos anos 70, a indústria do tabaco tinha abandonado largamente esta pesquisa particular, porque o objectivo provou ser inatinjível. Era um problema tecnicamente difícil de resolver e que provou ser intratável [17].

Muito recentemente, os investigadores observaram que o extracto aquoso do todo o fumo de cigarro/alcatrão continha um oxidante nocivo principal numa quantidade relativamente elevada, aproximadamente 190 ± 10 μg por cigarro. Os requerentes isolaram o oxidante, determinaram a estrutura e verificaram ser a p-benzosemiquinona. O oxidante é responsável quase quantitativamente pelo dano oxidativo das proteínas produzido pelo extracto aqueoso do todo o fumo de cigarro/alcatrão. O oxidante é também responsável pela oxidação do ADN. Nagata et al. (18) mostraram que os radicais de semiquinona se ligam ao ADN e danificam-no. Sabe-se também que o dano oxidativo do ADN está implicado na mutação e cancro. O oxidante é relativamente estável. A sua semi-vida no estado sólido, à temperatura ambiente, é de aproximadamente 48 horas. A presença do oxidante estável no fumo de cigarro podia explicar os efeitos perniciosos do fumo

de corrente lateral e do fumo passivo (7). O oxidante está ausente no tabaco não fumado sendo produzido durante a combustão do cigarro (7). Os requerentes identificaram um certo número de compostos/agentes químicos que desactivam o oxidante e que podem ser utilizados como antídotos.

Objectivos do invento

O principal objectivo do presente invento refere-se ao isolamento e caracterização de um oxidante nocivo principal a partir do extracto aquoso do todo o fumo de cigarro/alcatrão, que é principalmente responsável pelo dano oxidativo de macromoléculas biológicas incluindo proteínas e ADN.

Um outro objectivo do invento é proporcionar um método para a análise quantitativa do oxidante de fumo de cigarro (fc) presente em toda a solução de cigarro.

Ainda um outro objectivo do invento é a identificação de compostos/agentes químicos que vão desactivar o oxidante e actuar como antídotos no combate ao efeito nocivo do oxidante.

Sumário do invento

Um oxidante nocivo principal relativamente estável foi isolado a partir do extracto aquoso do todo o fumo de cigarro/alcatrão e purificado numa extensão de >99% por extracção diferencial de solventes, cromatografia de camada fina e HPLC preparativa. O rendimento é de cerca 16 µg por cigarro, que é cerca de 8,4% da quantidade (≈190 µg) presente no fumo de um cigarro. Foram obtidos resultados comparáveis a partir de doze marcas comerciais diferentes de cigarros. O oxidante purificado cristaliza em cristais amarelo muito pálido em forma de agulhas finas a partir de uma solução em acetona. A estrutura do oxidante mostrou ser a p-benzosemiquinona tal como evidenciado por análise elementar, espectro de massa, UV, fluorescência, espectroscopia de IV, RMN do H, RMN do C e ESR assim como pelas propriedades químicas. O oxidante pode ser quantitativamente medido quer por espectroscopia de absorção no UV quer por HPLC.

Na p-benzosemiquinona, o electrão desemparelhado é deslocado ao longo de uma estrutura aromática contendo heteroátomos o que conduz a diferentes formas mesoméricas, nomeadamente, formas aniónicas, neutras e catiónicas (Fig.1, ver ref.19). Esta ressonância podia explicar a estabilidade da semiquinona. A semi-vida do oxidante armazenado no estado sólido, à temperatura ambiente, ao ar e no escuro é de cerca de 48 horas, como determinado pela sua capacidade para oxidar o ácido ascórbico. Na solução aquosa a pH 7,4, a semi-vida é de cerca de 1,5 horas. Utilizando a oxidação do BSA ou a degradação oxidativa de proteínas microsossomais de pulmão de cobaia como sistemas modelo, o oxidante é quantitativamente responsável pelo dano oxidativo produzido pelo extracto aquoso de todo o fumo de cigarro. O oxidante fc é também responsável pela oxidação do ADN.

Foi identificado um certo número de compostos/agentes químicos que inactivam o oxidante e actuam como antídotos.

Descrição detalhada do invento

Por conseguinte, o presente invento proporciona um processo para o isolamento de p-benzosemiquinona de acordo com os passos da reivindicação 1.

Modificações adicionais são descritas nas reivindicações dependentes.

O presente invento é descrito com referência aos exemplos aqui abaixo.

Breve descrição dos desenhos acompanhantes

- Fig.1** Mostra as formas mesoméricas de p-benzosemiquinona, a) aniónica, b) e c) neutra e d) catiónica.
- Fig.2** Bandas de cromatografia de camada fina da solução de metanol após liofilização → indica a banda do oxidante fc.
- Fig.3** Perfil de HPLC do extracto de butanol após TLC. O oxidante fc (passo 6) eluiu como um pico principal ao tempo de retenção de 8,808 min. A quantidade de oxidante fc eluído foi de ~12 µg.

- Fig.4** Perfil de HPLC do oxidante fc puro, eluído ao tempo de retenção de 8,808 min.
- Fig.5** Cromatografia de camada fina do oxidante fc puro ($R_f = 0,26$).
- Fig.6a** Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A excitação foi a 293 nm e a análise de emissão foi medida de 300 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,6 nm e a 651,4 nm.
- Fig.6b** Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A excitação foi a 224 nm e a análise de emissão foi medida de 225 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,6 nm e a 652,6 nm.
- Fig.7a** Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A emissão foi a 330 nm e a análise de excitação foi medida de 220 nm a 325 nm. Os máximos de excitação foram a 228,2 nm e a 293,8 nm.
- Fig.7b** Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A emissão foi a 651 nm e a análise de excitação foi medida de 220 nm a 650 nm. Os máximos de excitação foram a 229,2 nm e a 294,8 nm.
- Fig.8** Estrutura cristalina do oxidante fc puro.
- Fig.9** Perfil espectrofotométrico de UV do oxidante fc em metanol. Tem dois máximos de absorção, um a 293,4 nm e outro a 223,0 nm.
- Fig.10** Estabilidade do oxidante sólido mantido a 25°C sob escuro. A estabilidade foi determinada pela sua capacidade para oxidar ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi medido por análise de HPLC a 254 nm.
- Fig.11** Curva padrão do ácido ascórbico baseada na análise de HPLC a 254 nm.
- Fig.12** Estabilidade do oxidante fc em tampão de fosfato de potássio 50mM, a 25°C, medida pela sua potência para oxidar o ascorbato como evidenciado pela área de HPLC.
- Fig.13** Redução quantitativa do ferricitocromo c pelo oxidante medida pela formação de ferrocitocromo c no tempo, a 550 nm. A reacção foi realizada em tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, mantendo a concentração final de ferricitocromo c a 100µM. Uma nmole do oxidante reduziu 0,71 nmole de ferricitocromo c.

- Fig.14** Curva padrão do oxidante com base na área de HPLC a 294 nm. Foram utilizadas quantidades diferentes do oxidante fc no intervalo de 10 ng a 100 ng em 20 μ l de solvente móvel.
- Fig.15** Curva padrão do oxidante com base na redução do citocromo c utilizando quantidades diferentes do oxidante no intervalo de 1 μ g a 5 μ g.
- Fig.16** Espectro de massa do oxidante fc puro.
- Fig.17** Perfil espectrofotométrico de UV da hidroquinona em metanol. Tem dois máximos de absorção, um a 293,8 nm e outro a 224,2 nm.
- Fig.18** Perfil espectrofotométrico de UV do oxidante fc armazenado à temperatura ambiente, no escuro, durante 8 dias. Os dois máximos de absorção são a 293,6 nm e a 224,4 nm.
- Fig.19** Perfil espectrofotométrico de UV de uma mistura equimolar de p-benzoquinona e hidroquinona em metanol. Há um ressalto próximo de 242 nm (o $\lambda_{\text{máx}}$ da p-benzoquinona).
- Fig.20** Perfil espectroscópico de fluorescência da hidroquinona em metanol. A excitação foi a 294 nm e a análise de emissão foi medida de 300 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,4 nm e a 651,6 nm.
- Fig.21** Perfil espectroscópico de FTIR do oxidante fc.
- Fig.22** Perfil espectroscópico de FTIR da hidroquinona.
- Fig.23** Perfil espectroscópico de RMN do H do oxidante fc em CD_3COCD_3 .
- Fig.24** Perfil espectroscópico de RMN do H da hidroquinona em CD_3COCD_3 .
- Fig.25** Perfis espectroscópicos comparativos de RMN do H de (a) oxidante fc e (b) hidroquinona.
- Fig.26** Perfil espectroscópico de RMN do H do oxidante fc após redução com ditionito de sódio.
- Fig.27** Perfil espectroscópico de RMN do C do oxidante fc em CD_3COCD_3 .
- Fig.28** Perfil espectroscópico de RMN do C da hidroquinona em CD_3COCD_3 .
- Fig.29** Espectro de ESR à temperatura ambiente do oxidante fc, recentemente preparado a partir de 100 cigarros. O espectro foi registado num espectrómetro ESR JES-REIX (Tóquio, Japão). Os parâmetros espectrais foram

os seguintes: frequência de microondas, 9,4356 GHz; potência, 2mW; amplitude de modulação de campo, 0,4 mT; frequência modulada, 100 kHz; constante de tempo, 0,3 seg; velocidade de varrimento, 2,5 mT/seg.

Fig.30 Espectro de ESR à temperatura ambiente do oxidante fc envelhecido (10 dias), preparado a partir de 400 cigarros.

Fig.31 Perfil de HPLC da solução de todo o fc analisada na coluna de sílica (LiChrospher^R Si 60, Merck) * Indica o tempo de retenção, a área e a concentração (13,6682%) do oxidante fc.

Fig.32 Perfil de HPLC do extracto aquoso da solução fc analisado na coluna de sílica (LiChrospher^R Si 60, Merck) * Indica o tempo de retenção, área e concentração (27,2269%) do oxidante fc.

Fig.33 Perfil de HPLC da solução de todo o fc analisada na coluna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu). O oxidante fc eluiu a 13,467 min.

Fig.34 Perfil de HPLC do oxidante fc puro analisado na coluna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu) eluído ao tempo de retenção de 13,458 min.

Fig.35a SDS-PAGE das proteínas microssomais de pulmão de cobaia tratadas com solução de todo o fc e o oxidante fc. Faixa 1, microssomas não tratados; faixa 2, microssomas tratados com 50 µl de solução fc; faixa 3, microssomas tratados com 100 µl de solução fc; faixa 4, microssomas tratados com 10 µg de oxidante fc; faixa 5, microssomas tratados com 20 µg de oxidante fc.

Fig.35b Análise densitométrica das bandas de proteínas de diferentes faixas da Fig.35a.

Descrição detalhada das tabelas

Tabela 1 Cálculo da potência oxidativa em diferentes fases de purificação do oxidante fc

Tabela 2 Oxidação do BSA por fracções de solução fc em diferentes fases de purificação

Concretizações do invento

Isolamento e purificação de um componente perigoso principal (oxidante fc) a partir do alcatrão de cigarro ou da solução de todo o fumo de cigarro

- (i) Cinco cigarros de ponta de filtro comerciais Indianos (74 mm) com um teor em alcatrão de 25 mg cada foram colocados em tubos de vidro que penetraram o orifício da rolha de vidro de um balão Erlenmeyer de vidro de um litro com um braço lateral e que termina a cerca de 2 cm do fundo do balão. O balão foi imerso numa mistura de gelo e sal e o braço lateral ligado a uma bomba de água. Os cigarros foram acesos e o alcatrão foi deixado condensar e assentar no fundo do balão. Recolheu-se todo o alcatrão de vinte cigarros. O frasco foi levado à temperatura ambiente e o alcatrão foi extractado com 20 ml de tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4. A solução foi filtrada através de um filtro Millipore de 0,45 μ m. O pH do filtrado foi ajustado a 7,4 com adição de 20 μ l de solução de NaOH 2N. A cor da solução era amarelo-acastanhado. Esta solução tem sido denominada solução de alcatrão. Em vez do isolamento do oxidante fc a partir do alcatrão de cigarro, este pode também ser isolado a partir do todo o fumo de cigarro. Neste caso, o fumo de 20 cigarros em grupos de 5 é directamente passado em 20 ml de tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, sendo o resto do procedimento similar ao utilizado no alcatrão. A solução obtida após a passagem de todo o fc no tampão tem sido denominada a solução de todo o fc.
- O rendimento do oxidante fc foi similar independentemente de se utilizar a solução de alcatrão ou a solução de todo o fc, como o material de partida.
- (ii) A solução de alcatrão filtrada obtida no passo 1 foi extractada três vezes com 15 ml de cloreto de metileno. A fase de cloreto de metileno inferior foi rejeitada e a fase aquosa de cor amarela superior foi recolhida e denominada o extracto aquoso de fumo de cigarro.

- (iii) A fase aquosa do passo 2 foi extractada duas vezes com 10 ml de n-butanol saturado com água e o extracto de butanol amarelo reunido foi então liofilizado no liofilizador Lyolab a -55°C sob vácuo. O material liofilizado foi extractado duas vezes com 1 ml de acetona de grau de HPLC e a solução de acetona foi seca num Speed Vac (Savant, SC 100) e dissolvida em 120 μl de metanol de grau de HPLC.
- (iv) A solução de metanol obtida no passo 3 foi então submetida a TLC de bandas utilizando placas de sílica de 0,2 mm de espessura não fluorescentes de 10cmx10cm (folhas de alumínio de TLC, Sílica gel 60, MERCK, No 1.05553). O material de 5 cigarros ($\approx 30 \mu\text{l}$ de solução de metanol) foi salpicado ao longo de uma linha cerca de 1,5 cm acima do fundo. A placa foi desenvolvida utilizando tolueno:acetato de etilo (80:20) durante 15 min. Quando a frente de solvente de desenvolvimento estava a 0,5 cm do topo, a placa foi retirada e seca à temperatura ambiente utilizando um secador. Após secagem, foram cortadas faixas de 0,5 cm quer do lado direito quer do lado esquerdo da placa e mantidas numa câmara de iodo durante 3 minutos para localização das bandas. A banda correspondente a R_f 0,26 (Fig.2) foi raspada de cada placa, colocada num tubo eppendorf de 1,5 ml e extractada durante 30 min com 600 μl de acetona de grau de HPLC com agitação em vórtex ocasional. Os tubos foram então centrifugados à temperatura ambiente durante 10 min, a 12000 rpm. A fase de acetona sobrenadante foi cuidadosamente recolhida num outro tubo eppendorf. O extracto de acetona reunido foi finalmente seco num tubo eppendorf num speed vac.
- (v) Ao material seco obtido no passo 4, que apareceu como agulhas amarelo-pálido, adicionaram-se 200 μl de água milli Q e a estes adicionaram-se 200 μl de n-butanol saturado com água e agitou-se em vórtex durante 5 min, seguido por centrifugação durante 5 min a 12000 rpm, à temperatura ambiente. A fase de n-butanol superior foi cuidadosamente removida e seca num tubo de vidro pequeno num speed vac.
- Rendimento $\approx 400 \mu\text{g}$ a partir de 20 cigarros. Nesta

fase, o oxidante fc é 98,5% puro como evidenciado por análise por HPLC.

- (vi) A amostra total obtida após o passo 5 foi dissolvida em 400 μl do solvente móvel e 20 μl desta solução (≈ 20 μg de oxidante) foram injectados num instrumento de HPLC Shimadzu 10AVP com uma coluna de sílica de 25 cm Merck de fase normal (LiChrospher[®] Si 60) utilizando o detector de UV e um cromatopac C-R6A ligado. Foram realizadas ao todo 20 injeções em diferentes grupos. As outras condições mantidas foram as seguintes.

Absorvância: 294 nm (O $\lambda_{\text{máx}}$ do oxidante em metanol era 293,4 nm como evidenciado por análise espectrofotométrica de UV, ver Fig.9)

Solvente móvel: cloreto de metileno:metanol (90:10)

Velocidade de fluxo:	0,5 ml/min
Pressão:	29 kgf/cm ²
Temperatura:	25°C
Tempo de retenção do oxidante:	8,808 min

O oxidante eluiu como um pico principal ao tempo de retenção de 8,808 min (Fig.3). O efluente de HPLC reunido obtido a partir de diferentes grupos de injeção foi recolhido numa proveta de vidro de 25 ml e seco no speed vac. O oxidante apareceu como cristais em forma de agulhas muito pequenas amarelo muito claro. O oxidante purificado por HPLC, quando re-injectado sob condições idênticas, apareceu como um único pico no perfil de HPLC num tempo de retenção de 8,808 min (Fig.4), o que indica uma pureza de 100%.

Rendimento ≈ 300 μg a partir de 20 cigarros.

- (vii) Com base na quantidade de amostra carregada e na área do pico correspondente (arbitrária) do oxidante fc, obtida na análise de HPLC, calculou-se a percentagem de recuperação do oxidante activo a partir da solução de todo o fc, como se segue.

Quatro μl da solução de todo o fc filtrada (ver passo 1) foram diluídos para 80 μl com solvente móvel e injectaram-se 20 μl na coluna de HPLC.

A área arbitrária do oxidante em 20 μl , correspondente ao tempo de retenção de 8,808 min, foi de 340583.

Por conseguinte, a área em 80 μl $\equiv 1362332 \equiv 4$ μl da

solução de todo o fc.

Assim, a área arbitrária do oxidante num ml de solução de todo o fc $\equiv 3,4 \times 10^8$.

Uma vez que um ml da solução de todo o fc é equivalente a um cigarro (ver passo 1), a área do oxidante fc por cigarro $= 3,4 \times 10^8$.

O rendimento do oxidante puro após purificação por HPLC de 20 cigarros $= 300 \mu\text{g}$.

Assim, o rendimento de um cigarro $= 15 \mu\text{g} = 15000 \text{ ng}$.

A partir da curva padrão (ver Fig.14), a área do pico de HPLC de 100 ng de oxidante fc puro $= 190000$.

Por conseguinte, a área do pico de 15000 ng, equivalente a um cigarro $= 2,85 \times 10^7$.

Assim, a recuperação do oxidante fc puro a partir da solução de todo o fc é $(2,85 \times 10^7 \times 100) / 3,4 \times 10^8 = 8,4\%$.

(viii) A potência oxidativa do oxidante fc em diferentes fases de purificação foi determinada por medição da oxidação da albumina de soro de bovino (BSA). Os resultados são apresentados como nmoles de carbonil-proteína formado por mg de BSA (Tabela 1). Em diferentes fases de purificação, como referido em "Procedimento de isolamento e purificação" acima, utilizou-se uma quantidade de material equivalente a um vigésimo de um cigarro ($50 \mu\text{l}$ de solução) nos casos da solução de alcatrão (passo 1), extracto aquoso (passo 2) e extracto de butanol (passo 3). No caso do extracto de butanol, retiraram-se $50 \mu\text{l}$ da solução de butanol, o butanol foi evaporado num speed vac, o resíduo seco pesado e directamente utilizado para a oxidação de BSA. Para os materiais obtidos no passo 4 (TLC) e passo 6 (HPLC), as quantidades utilizadas foram de $15 \mu\text{g}$ e $10 \mu\text{g}$, respectivamente.

(ix) Critérios de pureza do oxidante fc

(a) TLC: Obteve-se uma única mancha em TLC, R_f 0,26, utilizando tolueno:acetato de etilo (80:20) como o solvente de desenvolvimento (Fig.5).

(b) HPLC: Obteve-se um único pico por análise de HPLC. O tempo de retenção foi de 8,808 min utilizando o solvente móvel, cloreto de metileno:metanol (90:10) (Fig.4).

(c) Ponto de fusão: O composto funde bruscamente a 162°C.

(d) Espectroscopia de fluorescência:

A análise espectrofotométrica de UV do oxidante fc (5 mg em 1 ml de metanol) produziu dois máximos de absorção a 293,4 nm e a 223,0 nm (ver Fig.9). A espectroscopia de fluorescência foi realizada em solução de metanol como utilizado para a análise espectrofotométrica de UV. Quando excitado a 293 nm, a análise de emissão foi monitorizada de 300 nm a 800 nm e quando excitado a 224 nm, a análise de emissão foi monitorizada de 225 nm a 800 nm. Quando excitado a 293 nm, os máximos de emissão observados foram a 329,6 nm e a 651,4 nm (Fig.6a). Quando excitado a 224 nm, os máximos de emissão observados foram a 329,6 nm e a 652,6 nm (Fig.6b). Quando a análise de excitação foi monitorizada mantendo a emissão a 330 nm, os máximos de excitação observados foram a 228,2 nm e a 293,8 nm (Fig.7a). De novo, quando a emissão foi mantida a 651 nm e a análise de excitação foi monitorizada, os máximos de excitação observados foram a 229,2 nm e a 294,8 nm (Fig.7b). Os perfis espectrais observados indicam que os dois máximos de absorção surgem do mesmo composto e contribuem para a pureza do oxidante fc isolado.

Teste quantitativo de dano nas proteínas por medição do teor em carbonilo

O sistema de incubação continha 1 mg de BSA e 50 µl de solução fc ou as suas quantidades equivalentes obtidas em diferentes fases de purificação num volume final de 200 µl de tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4. A incubação foi realizada a 37°C durante 1 hora. A carbonil-proteína foi medida por reacção com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) seguindo o método de Levine *et al.* (Methods Enzymol. 186: 464-478, 1990) similar àquele realizado anteriormente no nosso laboratório (Panda *et al.*, Free Radic. Biol. & Med. 27: 1064-1079, 1999). Após incubação da BSA com solução fc de fase completa, o extracto aquoso de fc ou o oxidante fc (volume final de 200 µl), as proteínas precipitaram com 200 µl de solução de ácido tricloroacético a 20% seguida por uma lavagem com 200 µl de solução de ácido tricloroacético a 10%

para libertar a pelota dos componentes de fc. A esta pelota lavada adicionaram-se então 500 μ l de solução de DNPH 10mM em HCl 2M e incubou-se a 37°C durante 1 h com agitação em vórtex ocasional. Em seguida, a proteína foi de novo precipitada com 500 μ l de solução de ácido tricloroacético a 20% fria e a pelota foi primeiramente lavada com 500 μ l de solução de ácido tricloroacético a 10% seguida por três lavagens sucessivas com 1 ml de uma mistura de etanol:acetato de etilo (1:1, v/v). Finalmente, o precipitado lavado foi dissolvido em 1 ml de cloridrato de guanídio 6M (pH 2,3) e a absorvância foi medida a 390 nm utilizando um espectrómetro de duplo feixe Hitachi modelo U 3020 contra um branco de reagente de HCl 2M. Os resultados foram expressos como nmoles de fenil-hidrazonas formadas por miligrama de proteína utilizando um coeficiente de extinção molar de 22000. A partir dos valores totais de fenil-hidrazona obtidos após incubação da BSA com o oxidante fc, deduziram-se os valores de fenil-hidrazona a partir daqueles obtidos com BSA não tratada para se obter os valores líquidos de carbonil-proteína formados. Os resultados são dados na tabela 1.

O oxidante fc purificado, isolado, é responsável quantitativamente pela oxidação de proteína produzida pela solução de todo o fumo de cigarro

Utilizando a oxidação de BSA como um sistema modelo, a afirmação anteriormente referida foi substantiada pelas observações seguintes:

(i) A oxidação de BSA produzida pela solução de todo o fc como evidenciado pela formação de carbonilo é mantida no oxidante fc purificado (o estável). Os componentes da solução de todo o fc rejeitados nos vários passos de isolamento e purificação do oxidante tal como extracção de solventes, TLC e HPLC não produziram oxidação de BSA. Por exemplo, na fase de extracção de solventes, a oxidação de BSA foi praticamente nula pelo extracto de cloreto de metileno (Passo 2, em "Isolamento e purificação").

(ii) A TLC do material liofilizado (Passo 4, em "Isolamento e purificação") produziu seis bandas incluindo a banda do oxidante fc a $R_f = 0,26$, como mostrado na Fig.2. Os extractos

de todas as bandas foram separadamente recolhidos, como anteriormente descrito, e utilizados para oxidação de BSA. A oxidação de BSA foi produzida apenas pelo extracto da banda correspondente a $R_f = 0,26$ contendo o oxidante fc. Os extractos de todas as outras bandas tendo $R_f = 0,12, 0,14, 0,16, 0,30, 0,80$ assim como aquele da linha de base, quando separada ou conjuntamente utilizados, não produziram oxidação de BSA.

(iii) Durante a HPLC do extracto de butanol no penúltimo passo do procedimento de purificação (Passo 6, em "Isolamento e purificação"), apenas o efluente do pico principal (tempo de retenção de 8,808 min, Fig.3b) correspondente ao oxidante fc produziu a oxidação de BSA. Outros picos menores tendo tempos de retenção no intervalo de 4,55 min a 7,25 min não produziram oxidação de BSA.

(iv) A análise de HPLC da solução de todo o fc utilizando a coluna de sílica indicou a presença de vários picos tendo tempos de retenção no intervalo de 5,717 min a 17,782 min incluindo um pico principal do oxidante fc tendo um tempo de retenção de 8,813 min (Fig.31). Quando se utilizou o extracto aquoso de fc em vez da solução de todo o fc, o oxidante eluiu a um tempo de retenção de 8,808 min (Fig.32), que é idêntico ao pico do oxidante fc tendo um tempo de retenção de 8,808 min como revelado por análise de HPLC do oxidante fc puro (Fig.4). Apenas o efluente do pico correspondente ao oxidante fc (tempo de retenção de 8,813 min) produziu oxidação de BSA. Os efluentes de todos os outros picos não oxidam separada ou conjuntamente a BSA.

(v) A análise de HPLC da solução de todo o fc foi também realizada utilizando a coluna de ODS. Os parâmetros utilizados foram:

Coluna: Shim-pack CLC-ODS (M)

Solvente móvel: água:metanol (95:5)

Velocidade de fluxo: 0,8 ml/min

Pressão: 147 kgf/cm²

Temperatura: 25°C

Absorvância: 288 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ do oxidante fc em água)

A análise de HPLC da solução de todo o fc utilizando a coluna ODS produziu cerca de 13 picos incluindo um pico principal a 13,467 min (Fig.33), que é o pico do oxidante fc como evidenciado pela análise de HPLC do oxidante fc puro (tempo de retenção de 13,46 min, Fig.34). Ainda sob esta condição, como observado utilizando a coluna de sílica anteriormente referida, apenas o efluente do pico correspondente ao oxidante fc (tempo de retenção de 13,46 min) produziu oxidação de BSA. Os efluentes dos outros picos não oxidaram separada ou conjuntamente a BSA.

Deve ser mencionado que embora a resolução obtida utilizando a coluna ODS seja melhor do que a da coluna de sílica, a coluna ODS não pode ser rotineiramente utilizada para análise da solução de fumo de cigarro ou do oxidante fc. Após algumas passagens com a solução de todo o fc, o extracto aquoso de fc ou o oxidante fc, a coluna ODS sofreu degeneração como evidenciado pelo aumento da contrapressão e perda de capacidade de resolução.

Os resultados acima mencionados indicam que apenas o oxidante fc é responsável pela oxidação da BSA. Nenhum outro componente da solução de todo o fc pode oxidar BSA. Isto é ainda confirmado pelos resultados apresentados na Tabela 2. A tabela mostra que quando se utiliza a solução de todo o fc, uma área de pico de 17030×10^3 correspondente ao oxidante fc (tempo de retenção de 8,813 min) produz 7,53 nmoles de carbonilo, que são equivalentes a $4,42 \times 10^{-7}$ nmole de carbonilo por área unitária. A tabela (Tabela 2) mostra ainda que quando se utiliza o oxidante fc purificado por HPLC em vez da solução de todo o fc, uma área de pico de 19010×10^{13} tendo um tempo de retenção de 8,808 min produz 9,56 nmoles de carbonilo, que é equivalente a $5,03 \times 10^{-7}$ nmole de carbonilo por área unitária. Os resultados indicam que a oxidação de BSA produzida pela solução de todo o fc é quase quantitativamente reproduzida, em separado, pelo oxidante puro isolado quando o último é utilizado numa quantidade correspondente à presente na solução de todo o fc.

O oxidante fc não só é responsável quantitativamente pelo dano oxidativo das proteínas causado pela solução de todo o fc, como também é um componente perigoso principal do

fumo do cigarro como evidenciado pelo seu conteúdo. A partir da análise de HPLC (p.8 em recuperação do oxidante fc), observa-se que o oxidante fc presente num ml da solução de todo o fc (equivalente a um cigarro) dá uma área arbitrária de $3,4 \times 10^8$. A partir da curva de HPLC padrão, 100 ng de oxidante fc puro dão uma área de 190000. Assim, o conteúdo do oxidante fc na solução de todo o fc de um cigarro é de cerca de $190 \pm 10 \mu\text{g}$. Foram obtidos rendimentos comparáveis a partir de 12 marcas comerciais diferentes de cigarros com ou sem filtro, padrão. Deve-se mencionar que o oxidante fc não está presente no tabaco não fumado mas forma-se durante a combustão do cigarro.

O facto do oxidante fc purificado ser responsável quantitativamente pelo dano oxidativo de proteínas produzido pela solução de todo o fc é adicionalmente evidenciado por SDS-PAGE das proteínas microssomais de pulmão de cobaia tratadas com a solução de todo o fc assim como com o oxidante fc (Fig.35a). A figura mostra que quando comparado com os microssomas não tratados (faixa 1), se produz um dano substancial com 50 μl de solução fc (faixa 2) e com 100 μl de solução fc (faixa 3), respectivamente. Quando a solução fc é substituída pelo oxidante fc puro em quantidades presentes na solução fc, o dano é ainda maior como descrito na faixa 4 (10 μg de oxidante fc) e na faixa 5 (20 μg de oxidante fc). A Fig.35b mostra a análise densitométrica das bandas de proteína de diferentes faixas (faixa 1-5), indicando a representação gráfica da extensão comparativa do dano produzido pela solução fc e pelo oxidante fc em quantidades presentes na solução fc.

O oxidante fc induziu dano oxidativo no ADN

Tem sido descrito que a solução de fumo de cigarro produz dano no ADN como evidenciado por quebra da cadeia simples e formação de 8-hidroxiguanosina. Sabe-se também que o dano no ADN está implicado na mutação e cancro. Cerca de 80% do cancro do pulmão no mundo é causado pelo fumo do cigarro. Agora os requerentes produziram dados que indicam que o dano oxidativo induzido pelo fumo do cigarro no ADN é causado pelo oxidante fc.

Dois mg de ADN de plasmídeo foram incubados com 15 µg de oxidante fc em tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, a 37°C, durante uma hora num volume final de 200 µl. Foi mantido um sistema de incubação de controlo sem oxidante fc. Após incubação, o ADN foi precipitado com 500 µl de etanol, centrifugado, lavado para ficar livre de sal com etanol a 70%, liofilizado, armazenado a -70°C e subsequentemente analisado quanto ao dano oxidativo. O dano no ADN foi medido pela produção de 8-hidroxiguanosina e 5-hidroxi-6-metilhidantoína utilizando um GC-massa. Os resultados mostram que o oxidante fc induz a formação de 24 nmoles de 8-hidroxiguanosina e de 121 nmoles de 5-hidroxi-6-metilhidantoína por 10⁶ bases de ADN.

Tabela 1. Cálculo da potência oxidativa em diferentes fases de purificação do oxidante fc

Fase	Passo de purificação	Oxidação de BSA (nmoles de carbonilo/mg de BSA)	Quantidade de material utilizado para a oxidação de BSA	Actividade específica** (nmoles de carbonilo/mg de peso seco)
1. Solução de todo o fc ou solução de alcatrão	1	7,53±0,34	0,6 mg*	12,55
2. Extracto aquoso de fc	2	8,16±0,24	0,4 mg*	20,4
3. Fracção de butanol	3	7,80±0,20	0,11 mg*	70,90
4. Extracto	4	9,23±0,14	0,015 mg	615,3

de acetona após TLC				
5. Oxidante puro após HPLC	6	9,56±0,14	0,010 mg	956,0

* Peso real após dedução do peso seco do sal presente em 50 µl de solução de tampão de fosfato de potássio.

** São dados os valores médios, D.P. < 5% (n=10)

Tabela 2. Oxidação de BSA por fracções de solução fc em diferentes fases de purificação

Fracções	Quantidade utilizada	Tempo de retenção (min) do pico de oxidante fc	Área arbitrária do pico	nmoles de carbonilo produzido/mg de BSA	nmoles de carbonilo por área unitária do oxidante x10 ⁷
1. Todo em solução*	50 µl (600 µg)	8,813	17030x10 ³	7,53±0,34	4,42±0,20
2. Extracto aquoso de fc	50 µl (400 µg)	8,808	14785x10 ³	8,16±0,24	5,52±0,16
3. Oxidante fc purificado por TLC	10 µl (15 µg)	8,808	19063x10 ³	9,23±0,14	4,84±0,07
4. Oxidante fc purificado por HPLC	10 µl (10 µg)	8,808	19010x10 ³	9,56±0,14	5,03±0,07

* Obtiveram-se resultados similares quando a solução de todo o fc foi substituída por uma quantidade igual de solução de alcatrão.

Referências

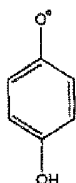
1. Bartecchi, C.E.; Mackenzie, T.D. e Schier, R.W. The human costs of tobacco use. *N. Engl. J. Med.* 330:907-912; 1994.
2. Frank, E. Benefits of stopping smoking. *West J. Med.* 159:83-87; 1993.
3. U.S. Surgeon General's Report. Department of Health, Education and Welfare; Department of Health and Human Services, USA; 1985.
4. Shah, P.K.; Helfant, R.H. Smoking and coronary artery disease. *Chest* 94:449-452; 1988.
5. Sherman, C.B. Health effect of cigarette smoking. *Clin. Chest Med.* 12:643; 1991, J.N.; Green, C.R.; Best, F.W. e Newell, M.P. Smoke composition: an extensive investigation of the water-soluble portion of cigarette smoke. *J. Agric. Food Chem.* 25:310-320; 1977.
6. Cross, C.E. Moderator. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 107:526-545; 1987.
7. Panda, K.; Chattopadhyay, R.; Ghosh, M.K.; Chattopadhyay, D.J.; e Chatterjee, I.B. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radic. Biol. Med.* 27:1064-1079; 1999.
8. Eiserich, J.P.; Vossen, V.; O'Neill, C.A.; Halliwell, B.; Cross, C.E.; e Van der Vliet. A molecular mechanism of damage by excess nitrogen oxides: nitration of tyrosine by gas phase cigarette smoke. *FEBS Lett.* 353:53-56; 1994.
9. Panda, K.; Chattopadhyay, R.; Chattopadhyay, D.J.; e Chatterjee, I.B. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced oxidative damage in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 29,115-124, 2000.
10. SchumacherNakayama, T.; Kaneko, M.; Kodama, M. e Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single strand breaks in human cells. *Nature* 314:462-464; 1985.
11. Nakayama, T.; Kaneko, M.; Kodama, M. e Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single strand breaks in human cells. *Nature* 314:462-464; 1985.
12. Borish, E.T.; Cosgrove, J.P.; Chirch, D.F.; Deutesch, W.A. e Pryor, W.A. Cigarette tar causes single-strand

- breaks in DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133:780-786; 1985.
13. Denissoenko, M.F.; Pao, A.; Targ, M-S. e Pfeifer, G.P. Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274:430-432; 1996.
 14. Fischer, S.; Spiegelhalder, B. e Preussmann, R. Tobacco specific nitrosamines in European and USA cigarettes. *Arch. Geschwulstforsch*, 60:169-177; 1990.
 15. Church, D.F. e Pryor, W.A. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ. Health Perspect.* 64:111-126; 1985.
 16. Pryor, W.A., Hales, B.J., Premovic, P.I. e Church, D.F. The radical in cigarette tar: Their nature and suggested physiological implication. *Science* 220: 425-427, 1983.
 17. Glantz, S.A.; Slade, J.; Bero, L.A.; Hanauer, P. e Barnes, D.E. *The cigarette papers*. University of California Press, Berkely, USA, 1996.
 18. Nagata, C.; Kodama, M. e Ioki, Y. In *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, Gelboin, H.V. and P.O.P. Ts'o, Eds. (Academic Press, New York), 1: 247; 1978.
 19. Wertz, J.E. e Bolton, J.R. *Electron spin resonance, elementary theory and practical applications*. McGraw-Hill Book company, New York, 1972, p. 213.

Lisboa, 2011-09-22

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para o isolamento da p-benzosemiquinona de fórmula I:



(Fórmula I)

compreendendo os passos de:

- (a) passagem de todo o fumo de cigarro recolhido a partir de um cigarro de ponta de filtro convencional tendo um teor em alcatrão de 20-30 mg por cigarro, em tampão de potássio a 30-60mM, a pH 7,4-7,8, filtração da solução acima através de um filtro Millipore de 0,45 μ m, ajuste do pH do filtrado no intervalo entre 7,4 a 7,6 por adição de solução de NaOH para obter a solução de fumo de cigarro desejada (solução fc);
- (b) extracção da solução fc acima referida três vezes com volume igual de cloreto de metileno, rejeição da fase inferior de cloreto de metileno e recolha da fase aquosa superior de cor amarela denominada o extracto aquoso de fumo de cigarro;
- (c) extracção da fase aquosa acima referida de fumo de cigarro duas vezes com volume igual de n-butanol saturado com água, liofilização do extracto de butanol amarelo reunido num liofilizador Lyolab a uma temperatura no intervalo entre -50°C e -60°C sob vácuo, seguida por extracção do material liofilizado duas vezes com acetona de grau de HPLC e secagem da solução de acetona sob vácuo e dissolução do referido extracto de acetona com metanol de grau de HPLC;
- (d) sujeição da solução de metanol acima referida a TLC em banda utilizando placas de sílica não fluorescentes, desenvolvimento das referidas placas de sílica utilizando uma mistura de tolueno e acetato de etilo numa proporção de 80:20, remoção da placa e secagem a cerca de 25°C até 30°C utilizando um secador, corte de faixas pequenas contendo o material desenvolvido a partir dos dois lados das placas,

mantendo-os numa câmara de iodo para localização da banda correspondente a R_f 0,26, raspagem da banda e extracção do material da banda com acetona de grau de HPLC seguida por recolha da fase de acetona e secagem desta sob vácuo;

(e) dissolução do extracto de acetona acima referido que aparece como agulhas amarelo-pálido por adição de volume igual de água milli Q, extracção da solução aquosa com volume igual de n-butanol saturado com água de grau de HPLC seguido por secagem da fase superior de n-butanol em tubos de vidro pequenos sob vácuo para obter o principal oxidante fc com uma pureza de 98-99% e um rendimento de 18-22 μg por cigarro; e

(f) purificação do oxidante fc acima referido obtido no passo (e) por dissolução deste num solvente móvel compreendendo uma mistura de cloreto de metileno e metanol numa proporção de 90:10 (v/v) e injectando este num instrumento de HPLC com uma coluna de sílica de 25 cm de fase normal utilizando um detector de uv a 294 nm a uma velocidade de fluxo de 0,5 ml/min, a uma temperatura de cerca de 25°C, a uma pressão de cerca de 29 kgf/cm² e recolha do efluente que aparece como um pico único a um tempo de retenção de 8,808 min com uma pureza de 100% e um rendimento de 8,4% do oxidante fc total presente na solução fc de origem.

2. Processo para o isolamento da p-benzosemiquinona de acordo com a reivindicação 1, no qual a solução de alcatrão ou fc é obtida acendendo um cigarro e recolhendo o fumo num frasco de vidro imerso numa mistura de gelo e sal que permite ao alcatrão condensar e assentar no fundo do frasco sendo a extracção realizada com o frasco acima referido à temperatura ambiente.

3. Processo de acordo com as reivindicações 1 a 2, em que a p-benzosemiquinona presente na solução fc é quantitativamente analisada por HPLC com um detector de UV que utiliza uma coluna ODS de fase inversa de 25 cm e que utiliza uma mistura de água e metanol (95:5 v/v) como fase móvel, a um comprimento de onda de 288 nm, a uma velocidade de fluxo de 0,8 ml/min, a uma temperatura de cerca de 25°C e a uma pressão de cerca de 147 kgf/cm² e tendo um tempo de retenção de 13,46 min.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o dano nas proteínas causado pela p-benzosemiquinona presente na solução fc é quantitativamente determinado por medição da formação de carbonil-proteína por reacção da proteína com a p-benzosemiquinona obtida a partir da solução fc, seguida por reacção com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e finalmente medição da absorvância a um comprimento de onda de 390 nm.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o dano nas proteínas causado pela p-benzosemiquinona presente na solução fc é quantitativamente determinado por medição da degradação oxidativa das proteínas microsossomais de tecido de cobaia por reacção da referida proteína com a p-benzosemiquinona presente na solução fc, seguida por SDS-PAGE e análise densitométrica.

6. Processo de acordo com a reivindicação 5, no qual a proteína utilizada no teste de danos oxidativos nas proteínas é seleccionada a partir do grupo constituído por BSA e proteínas microsossomais de pulmão de cobaia.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido método é utilizado para determinação quantitativa da p-benzosemiquinona de oxidante fc em cigarros com base no teor em alcatrão da marca comercial particular do cigarro.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido método é utilizado para determinação quantitativa da p-benzosemiquinona de oxidante fc em cigarros com base no nível de toxicidade da marca comercial particular do cigarro.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual a quantidade de p-benzosemiquinona isolada a partir do fumo de diferentes marcas comerciais de cigarros consumidos é utilizada para determinar o índice de toxicidade de uma marca particular de cigarros com base na quantidade de p-benzosemiquinona presente.

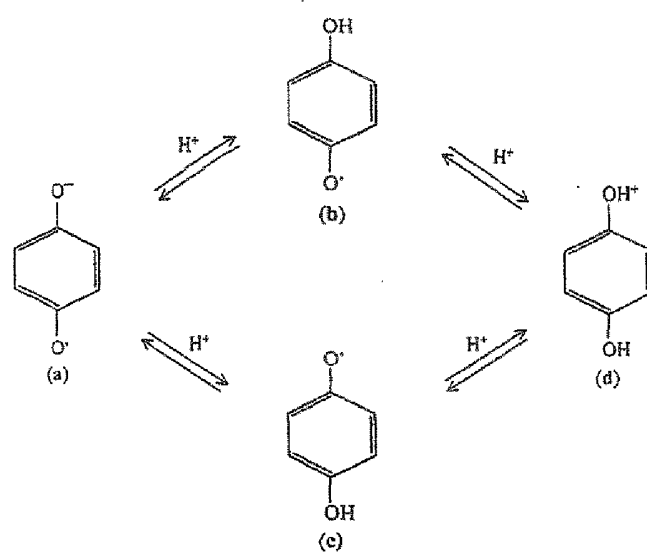


Fig.1 Formas Mesoméricas de p-benzosemiquinona. (a) aniónica, (b), (c) neutra; (d) catiónica.

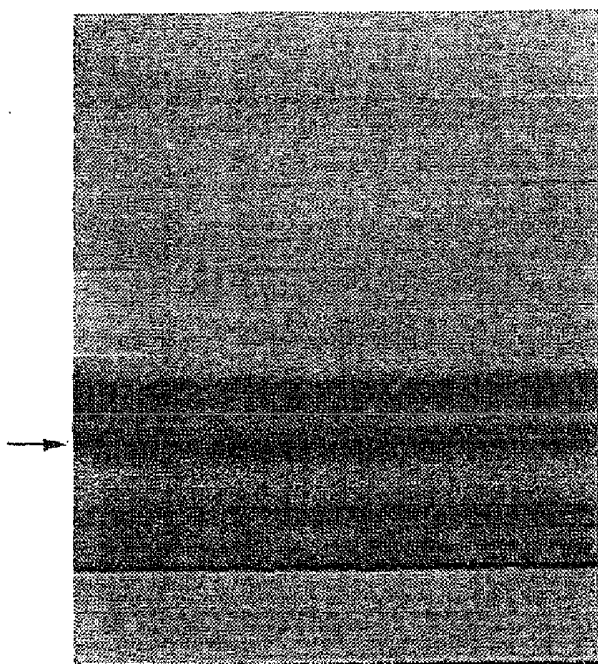


Fig.2 Bandas de cromatografia de camada fina da solução de metanol após liofilização (passo 5) → indica a banda de oxidante fc.

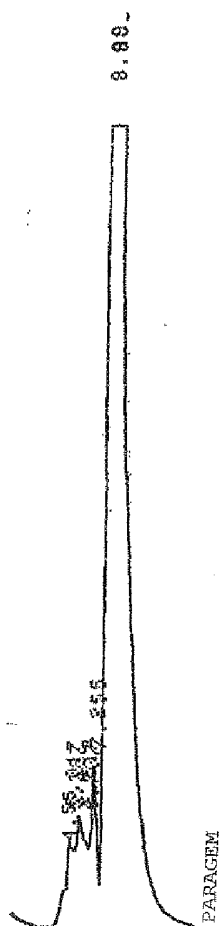


Fig.3 Perfil de HPLC do extracto de butanol após TLC. O oxidante fc (passo 6) eluiu como um pico principal ao tempo de retenção de 8,808 min. A quantidade de oxidante fc eluído foi de $\approx 12 \mu\text{g}$.

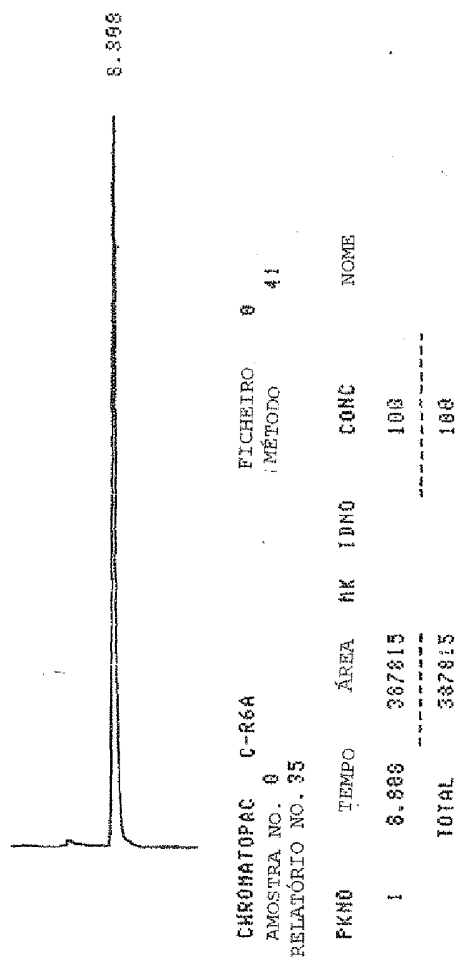


Fig.4 Perfil de HPLC do oxidante fc puro, eluído ao tempo de retenção de 8,808 min.

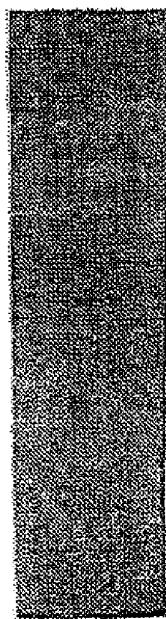


Fig.5 Cromatografia de camada fina do oxidante fc puro ($R_f = 0,26$).

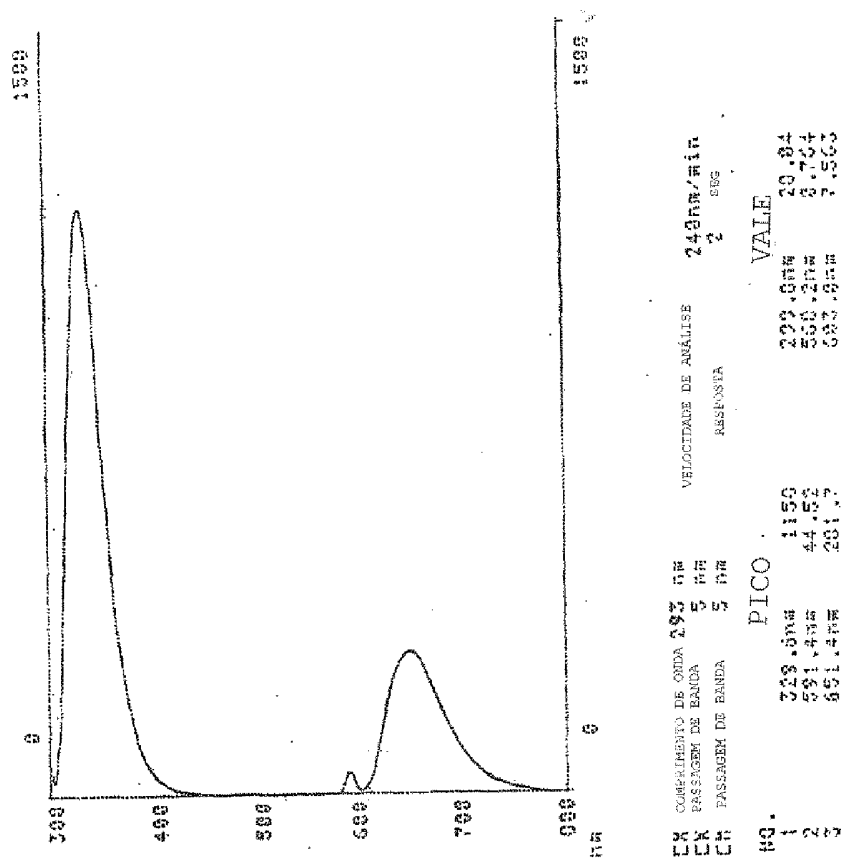


Fig.6a Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A excitação foi a 293 nm e a análise de emissão foi medida de 300 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,6 nm e a 651,4 nm.

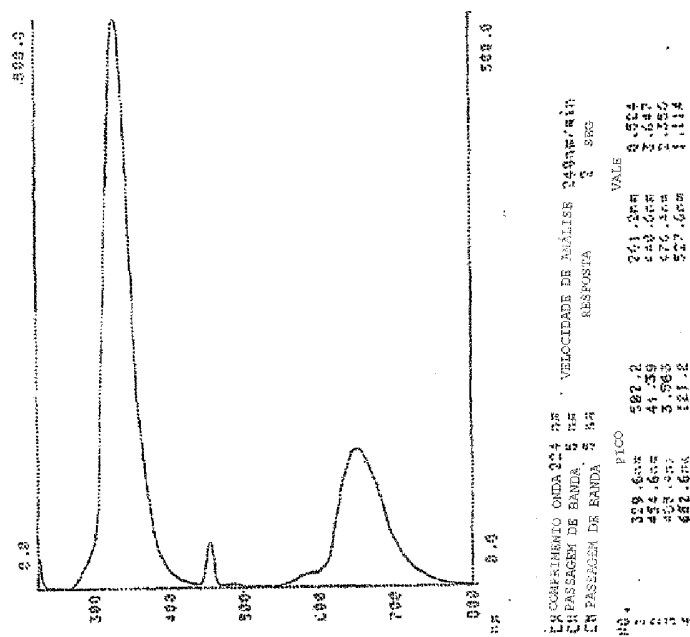


Fig.6b Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A excitação foi a 224 nm e a análise de emissão foi medida de 225 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,6 nm e a 652,6 nm.

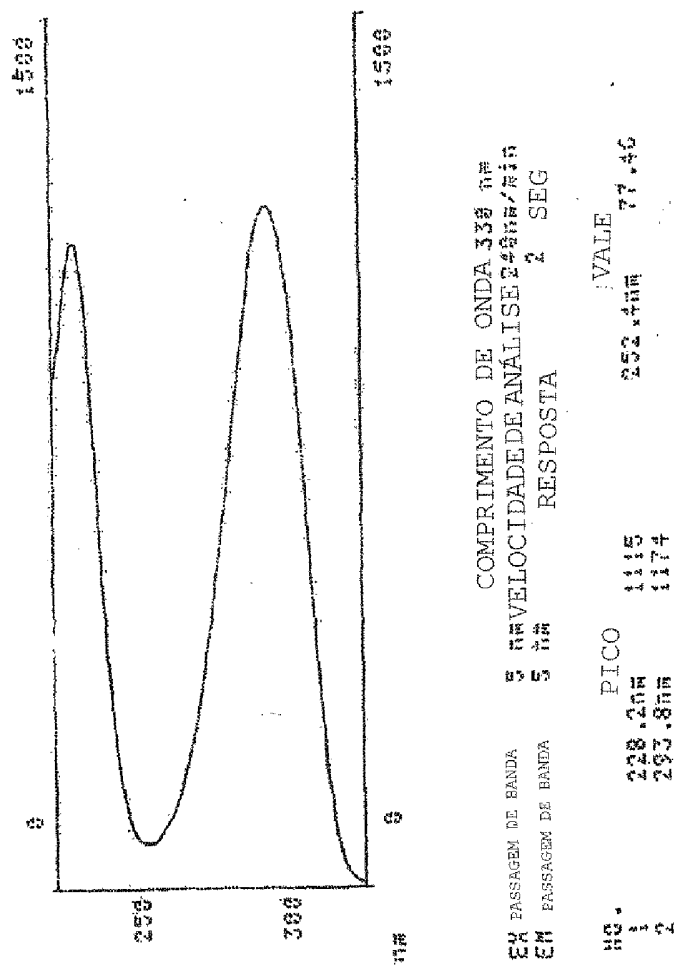


Fig.7a Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante fc em metanol. A emissão foi a 330 nm e a análise de excitação foi medida de 220 nm a 325 nm. Os máximos de excitação foram a 228,2 nm e a 293,8 nm.

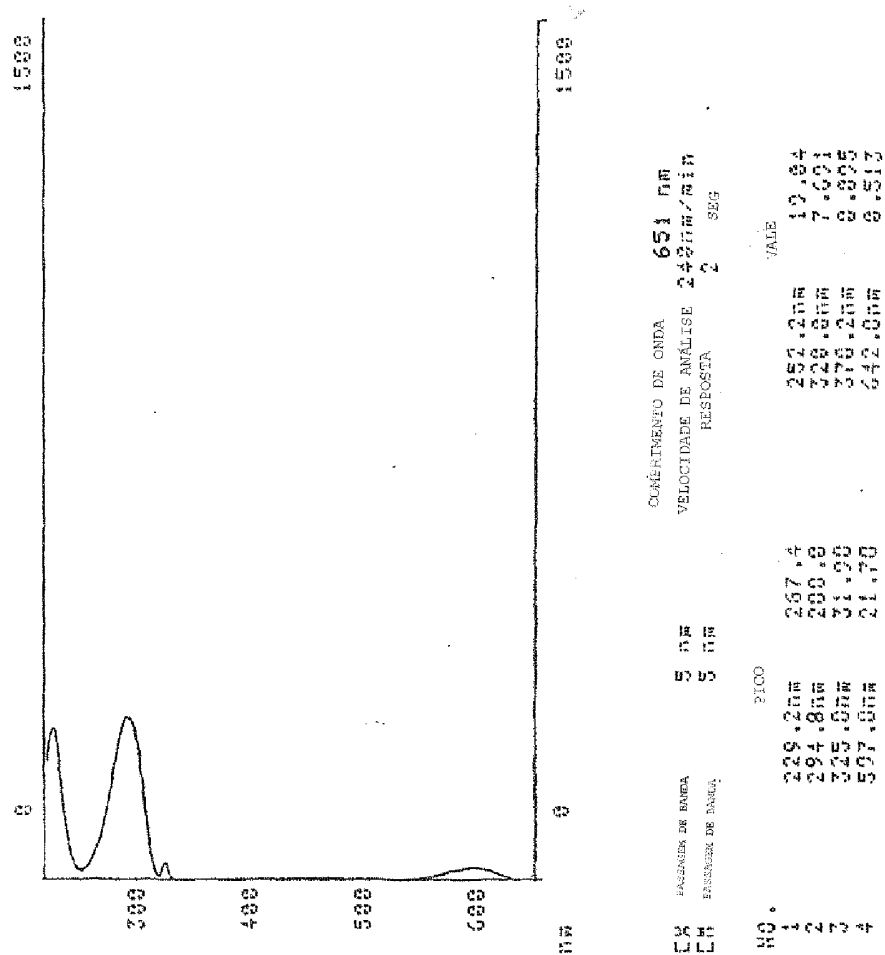


Fig.7b Perfil espectroscópico de fluorescência do oxidante FC em metanol. A emissão foi a 651 nm e a análise de excitação foi medida de 220 nm a 650 nm. Os máximos de excitação foram a 229,2 nm e a 294,8 nm.

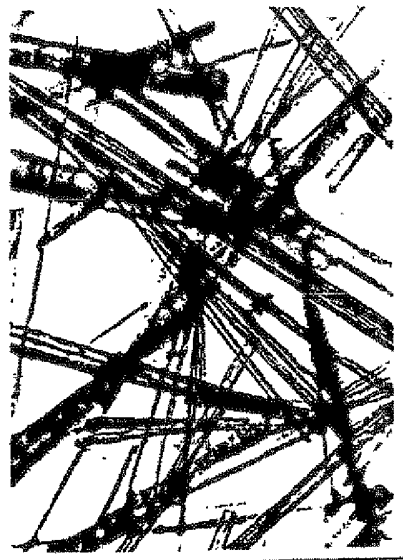


Fig.8 Estrutura cristalina do oxidante fc puro.

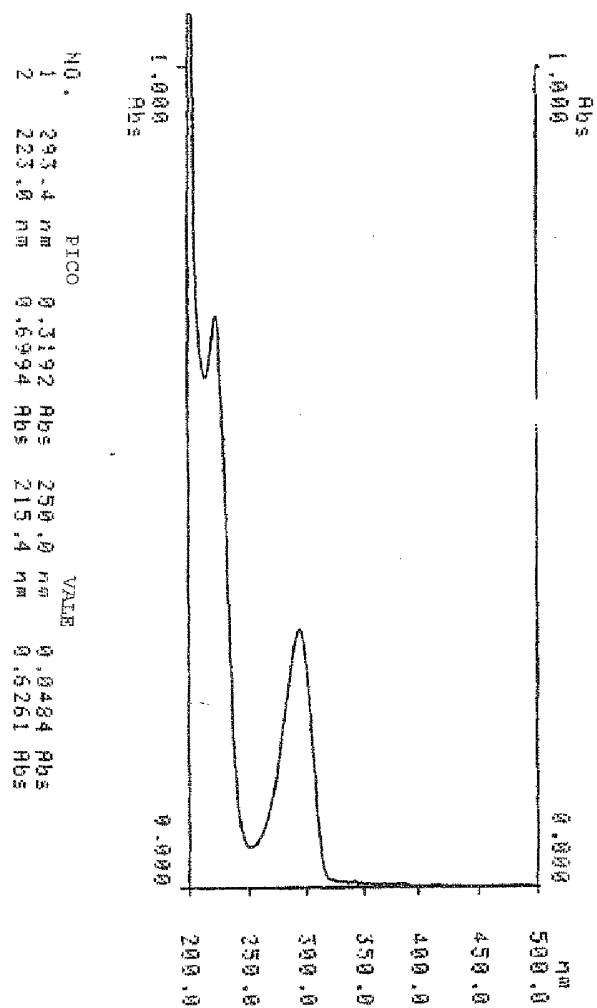


Fig.9 Perfil espectrofotométrico de UV do oxidante fc em metanol. Tem dois máximos de absorção, um a 293,4 nm e outro a 223,0 nm.

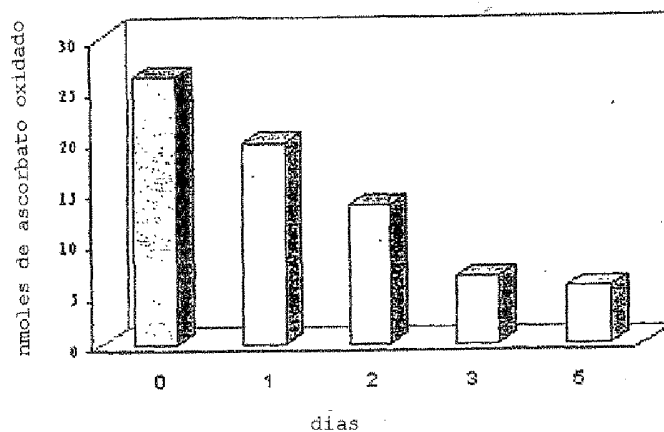


Fig.10 Estabilidade do oxidante sólido mantido a 25°C sob escuro. A estabilidade foi determinada pela sua capacidade para oxidar ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi medido por análise de HPLC a 254 nm.

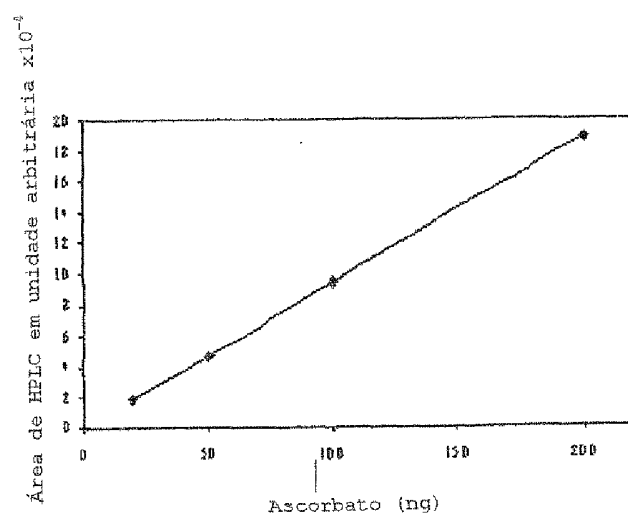


Fig.11 Curva padrão do ácido ascórbico baseada na análise de HPLC a 254 nm.

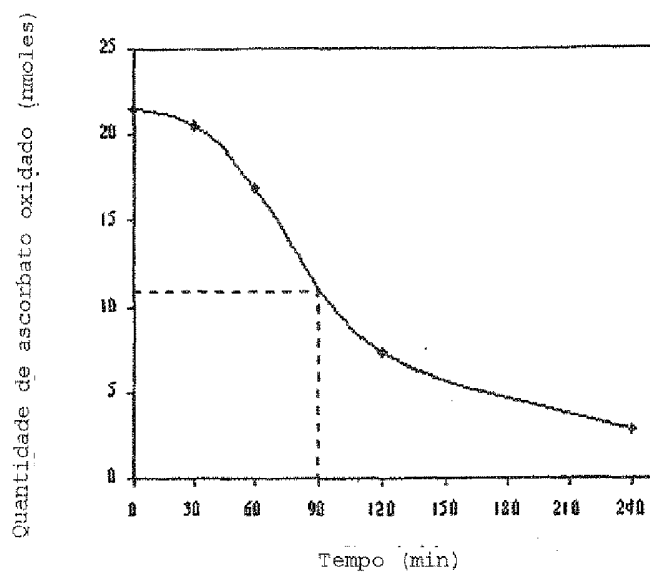


Fig.12 Estabilidade do oxidante Fe^{2+} em tampão de fósforo de potássio 50mM, a 25°C, medida pela sua potência para oxidar o ascorbato como evidenciado pela área de HPLC.

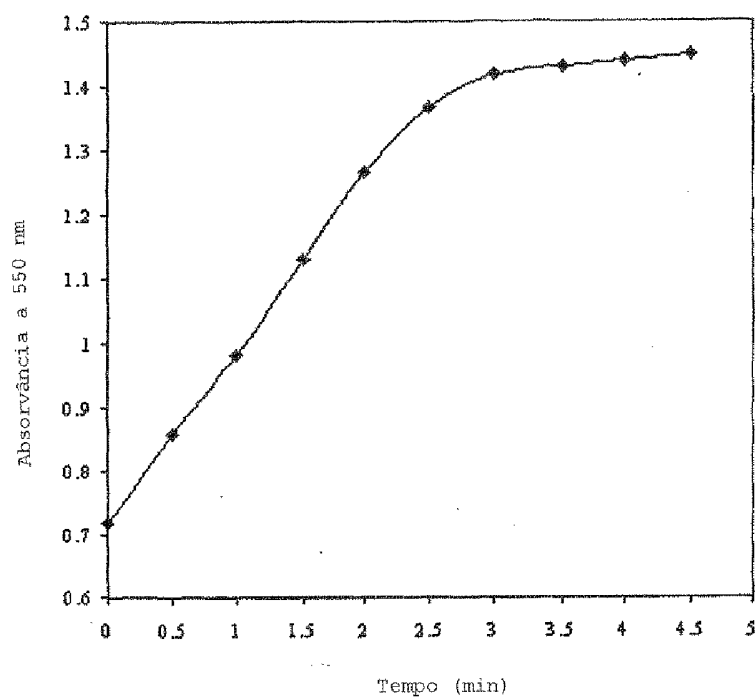


Fig.13 Redução quantitativa do ferricitocromo c pelo oxidante medida pela formação de ferrocitocromo c no tempo, a 550 nm. A reacção foi realizada em tampão de fosfato de potássio 50mM, pH 7,4, mantendo a concentração final de ferricitocromo c a 100 μ M. Uma nmole do oxidante reduziu 0,71 nmole de ferricitocromo c.

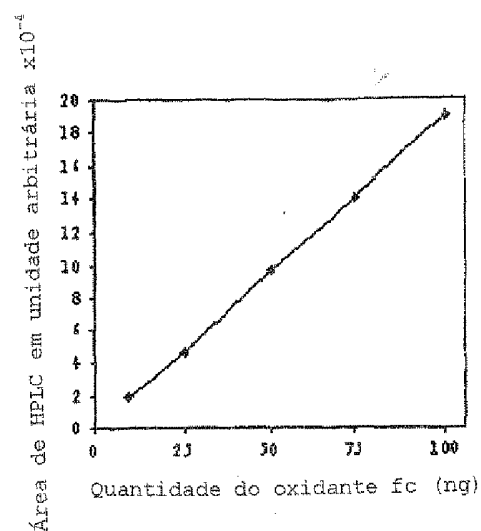


Fig.14 Curva padrão do oxidante com base na área de HPLC a 294 nm. Foram utilizadas quantidades diferentes do oxidante fc no intervalo de 10 ng a 100 ng em 20 μ l de solvente móvel.

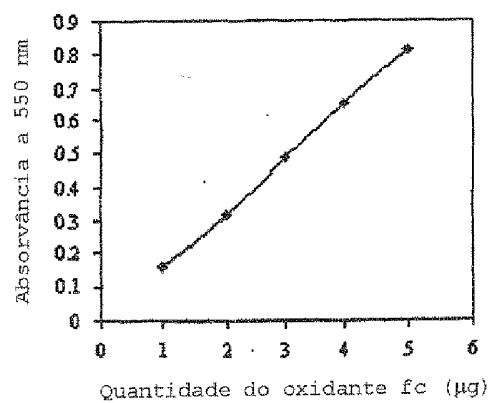


Fig.15 Curva padrão do oxidante com base na redução do citocromo c utilizando quantidades diferentes do oxidante no intervalo de 1 μ g a 5 μ g.

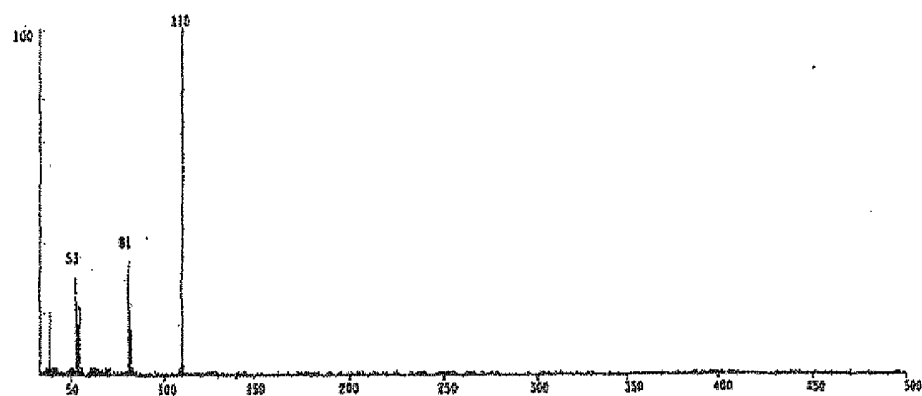


Fig.16 Espectro de massa do oxidante fc puro.

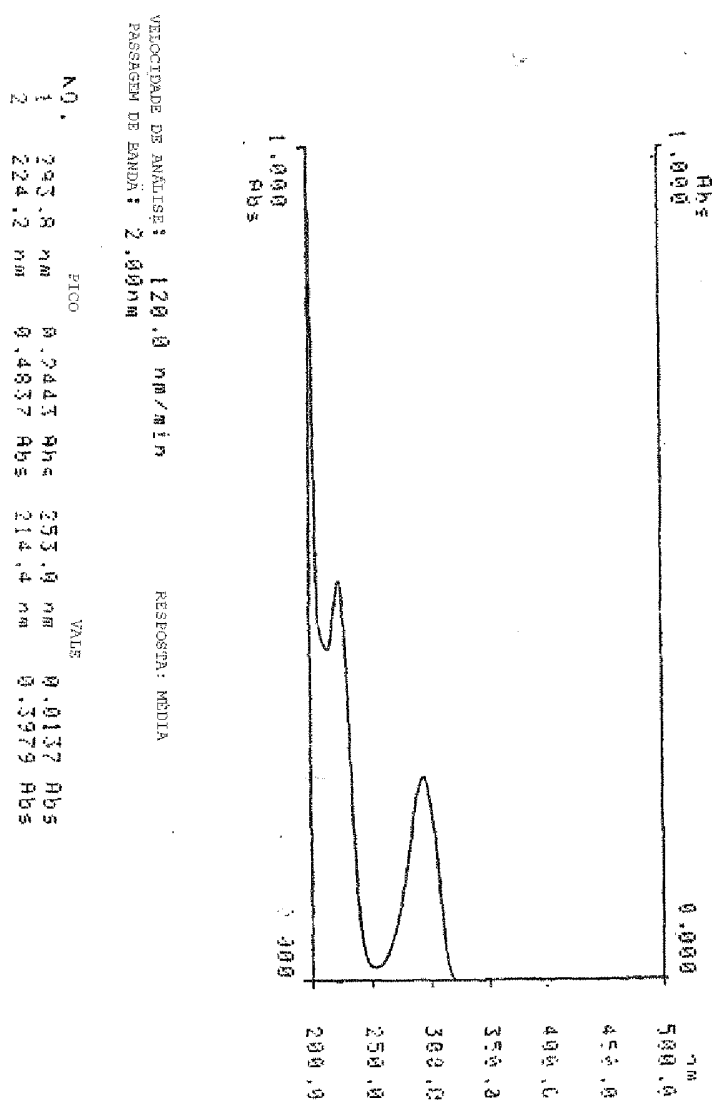


Fig.17 Perfil espectrofotométrico de UV da hidroquinona em metanol. Tem dois máximos de absorção, um a 293,8 nm e outro a 224,2 nm.

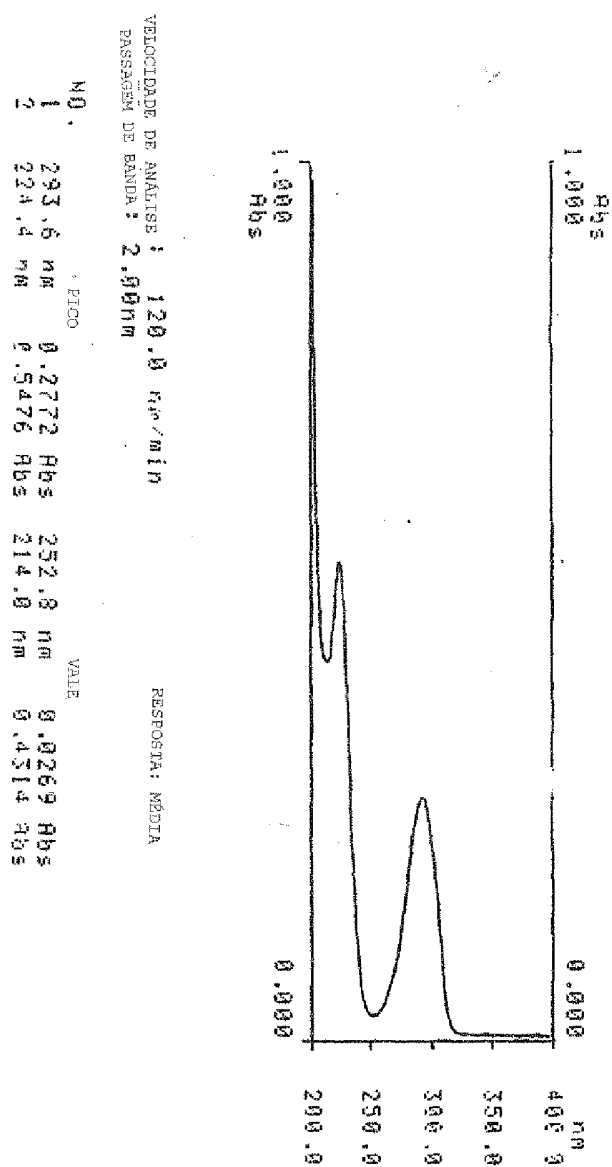


Fig.18 Perfil espectrofotométrico de UV do oxidante fc armazenado à temperatura ambiente, no escuro, durante 8 dias. Os dois máximos de absorção são a 293,6 nm e a 224,4 nm.

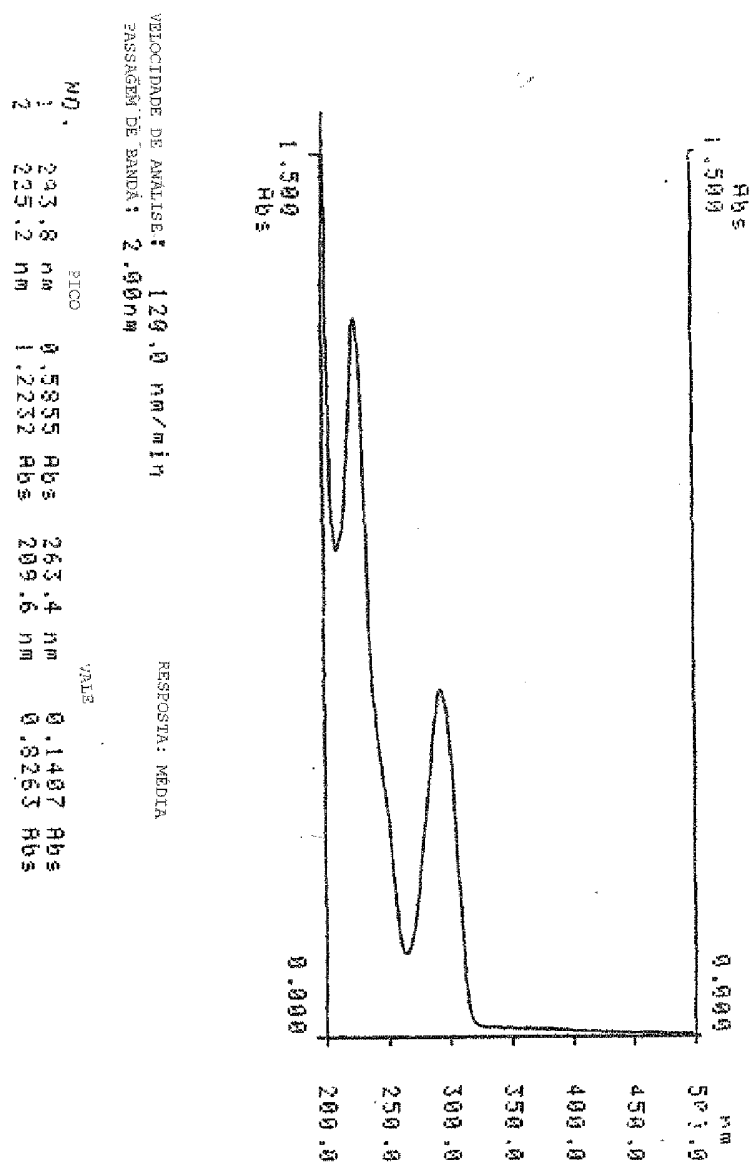


Fig.19 Perfil espectrofotométrico de UV de uma mistura equimolar de p-benzoquinona e hidroquinona em metanol. Há um ressalto próximo de 242 nm (o $\lambda_{\text{máx}}$ da p-benzoquinona).

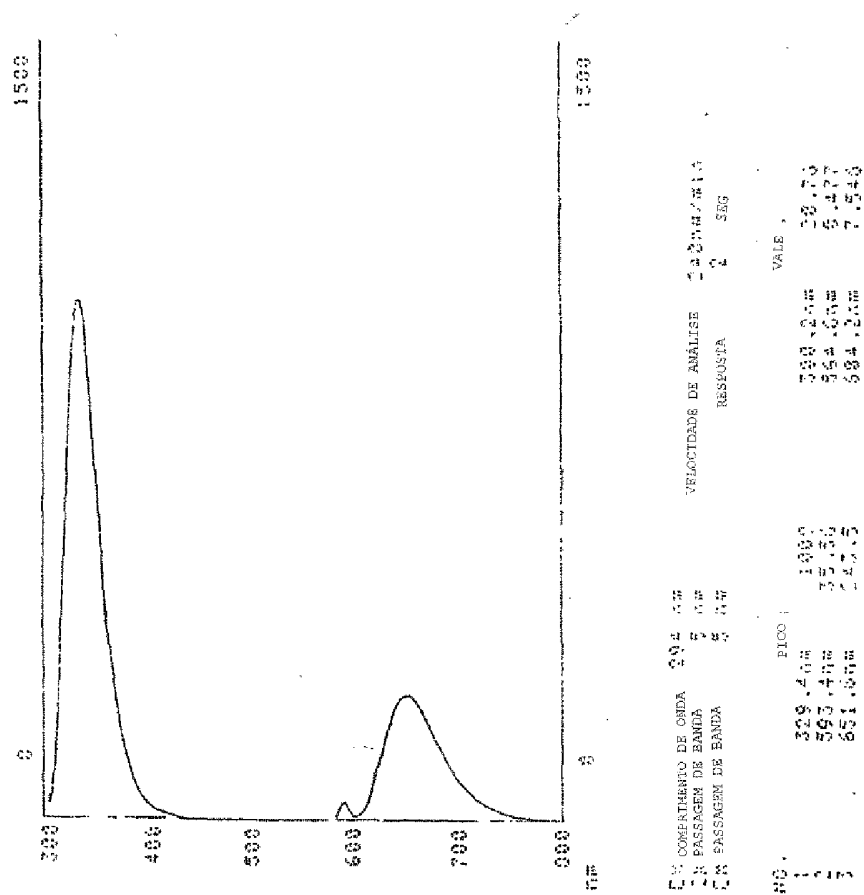


Fig.20 Perfil espectroscópico de fluorescência da hidroquinona em metanol. A excitação foi a 294 nm e a análise de emissão foi medida de 300 nm a 800 nm. Os máximos de emissão foram a 329,4 nm e a 651,6 nm.

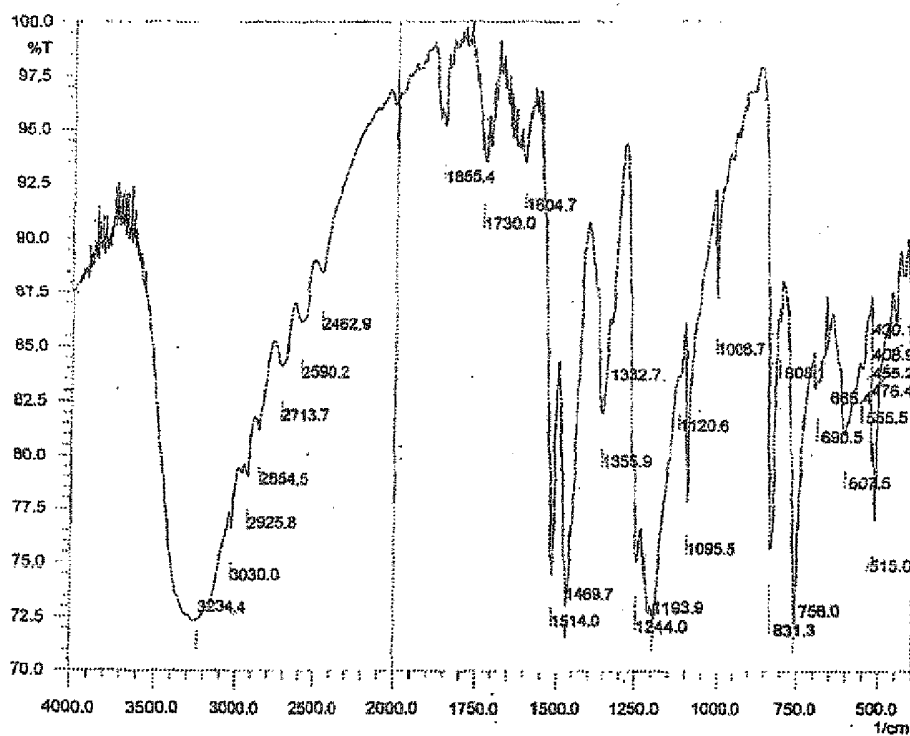


Fig.21 Perfil espectroscópico de FTIR do oxidante fc.

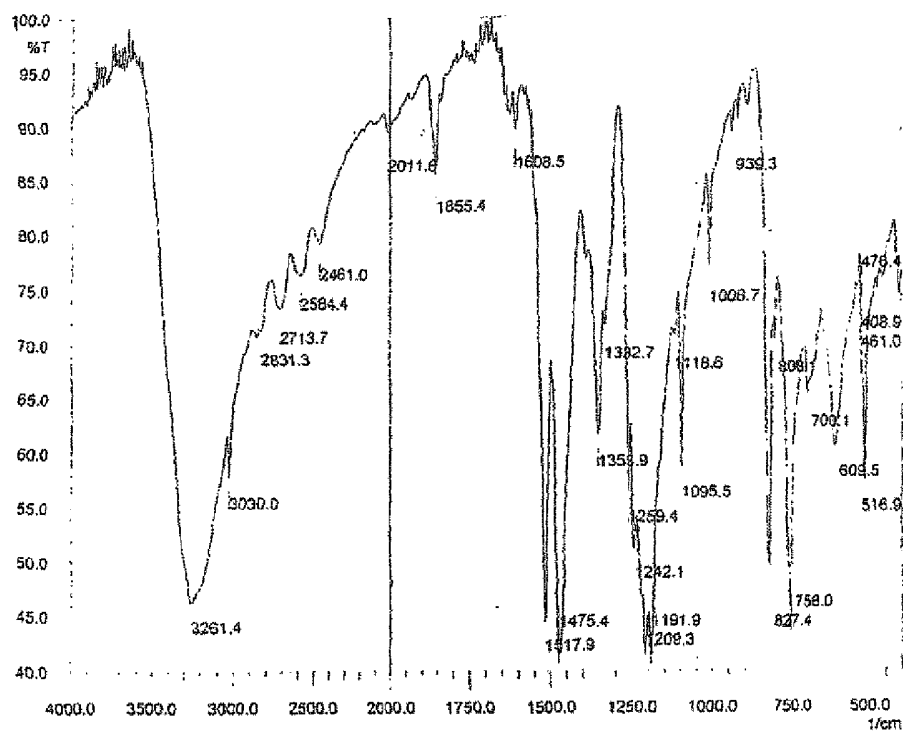
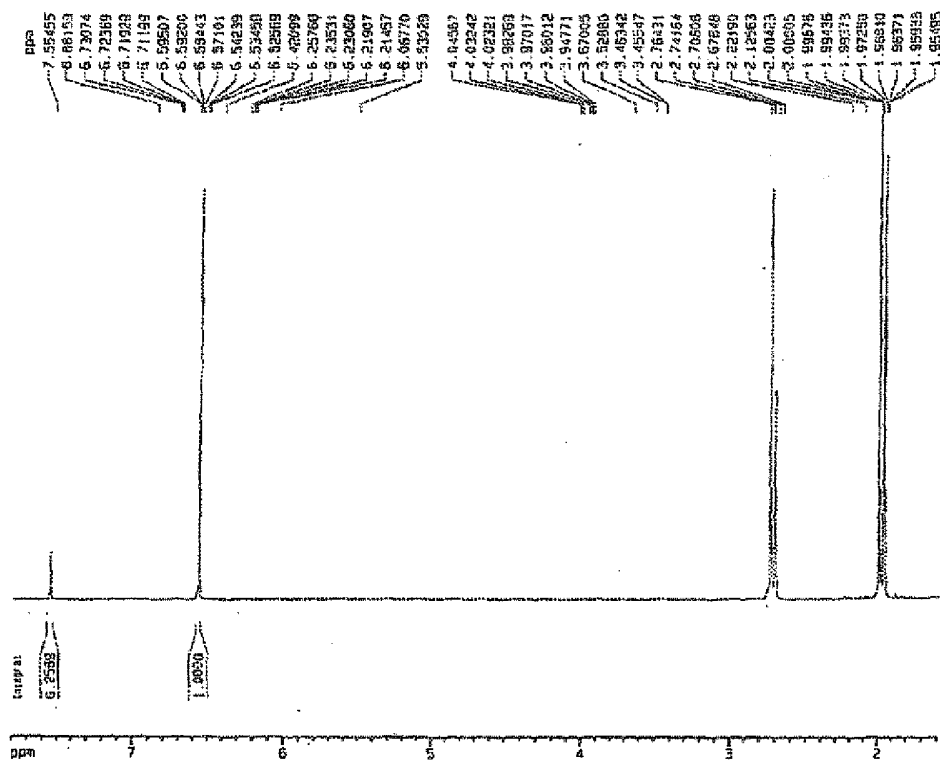
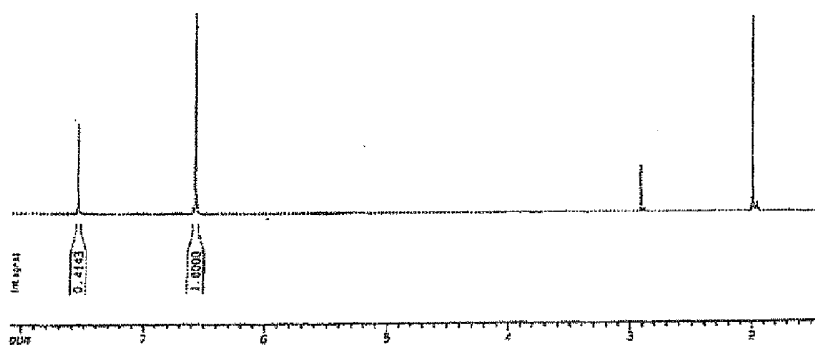


Fig.22 Perfil espectroscópico de FTIR da hidroquinona.

Fig.23 Perfil espectroscópico de RMN do H do oxidante fc em CD_3COCD_3 .Fig.24 Perfil espectroscópico de RMN do H da hidroquinona em CD_3COCD_3 .

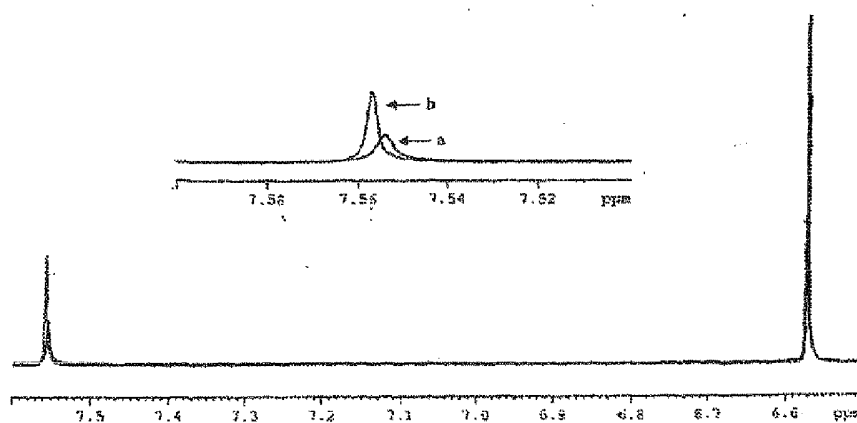


Fig.25 Perfis espectroscópicos comparativos de RMN do H de (a) oxidante fc e (b) hidroquinona.

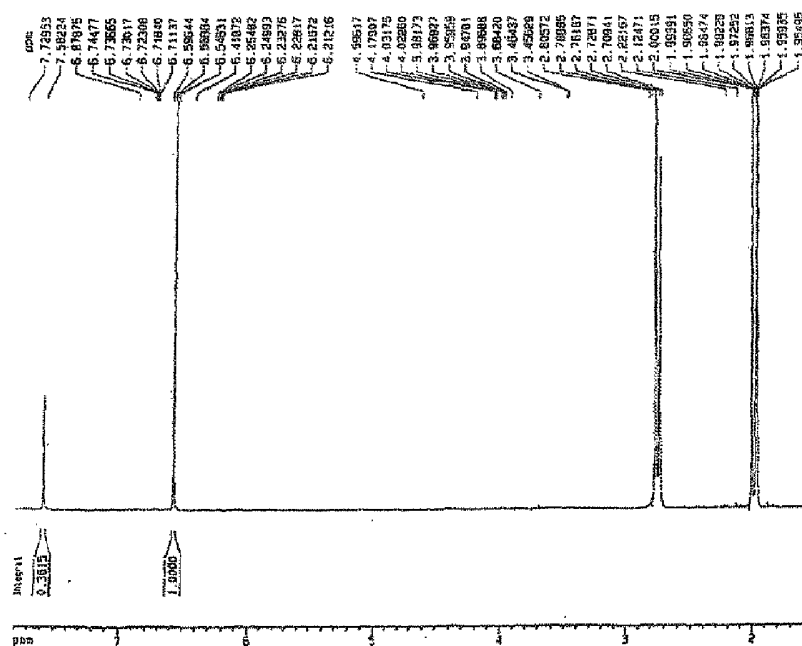
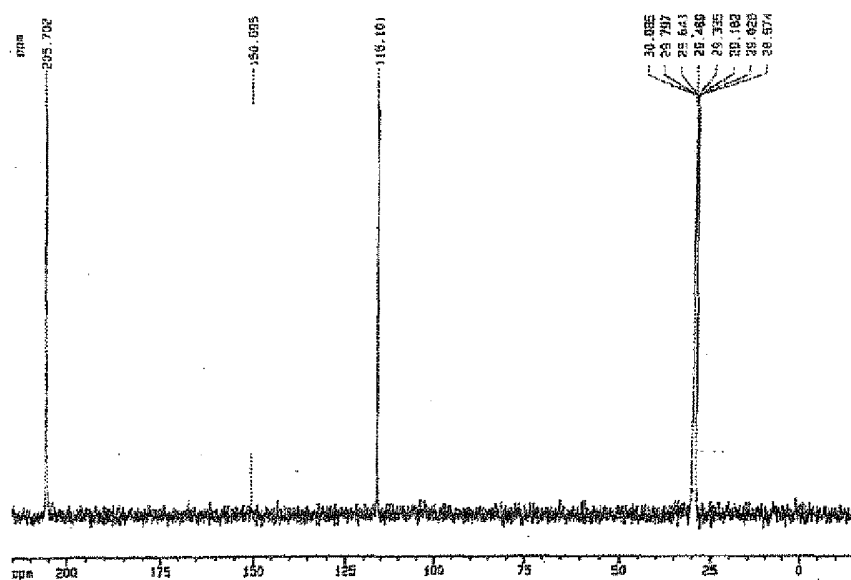
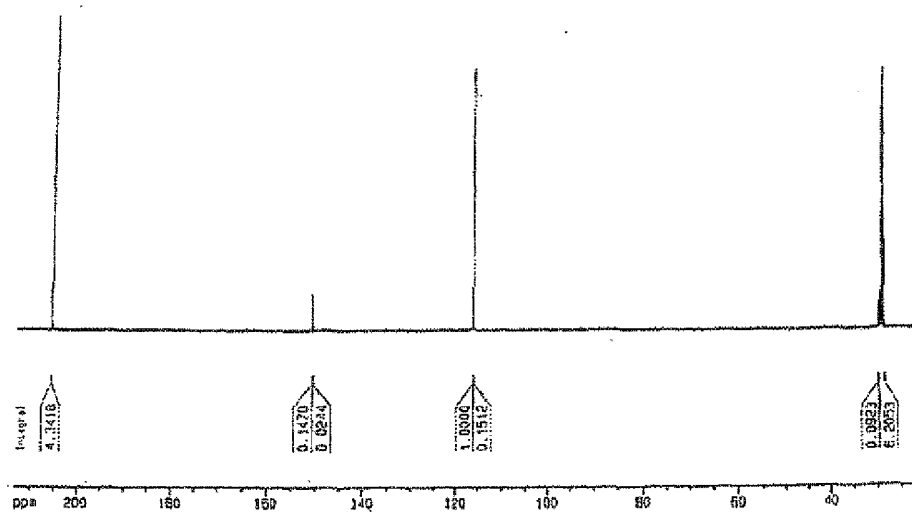


Fig.26 Perfil espectroscópico de RMN do ^1H do oxidante fc após redução com ditionito de sódio.

Fig.27 Perfil espectroscópico de RMN do C do oxidante *fc* em CD_3COCD_3 .Fig.28 Perfil espectroscópico de RMN do C da hidroquinona em CD_3COCD_3 .

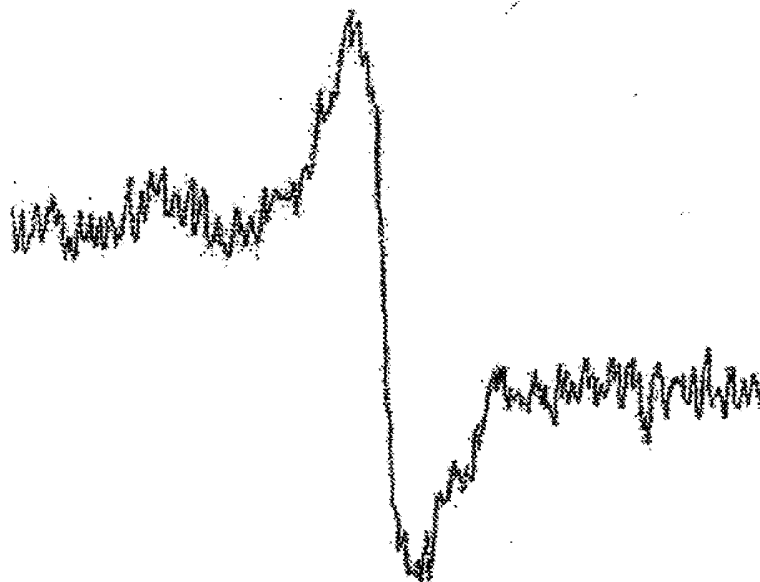


Fig.29 Espectro de ESR a temperatura ambiente do oxidante fc , recentemente preparado a partir de 100 cigarros. O espectro foi registado num espectrômetro ESR JES-REIX (Tóquio, Japão). Os parâmetros espectrais foram os seguintes: frequência de microondas, 9,435 GHz; potência, 2mW; amplitude de modulação de campo, 0,4 mT; frequência modulada, 100 kHz; constante de tempo, 0,3 seg; velocidade de varrimento, 2,5 mT/seg.

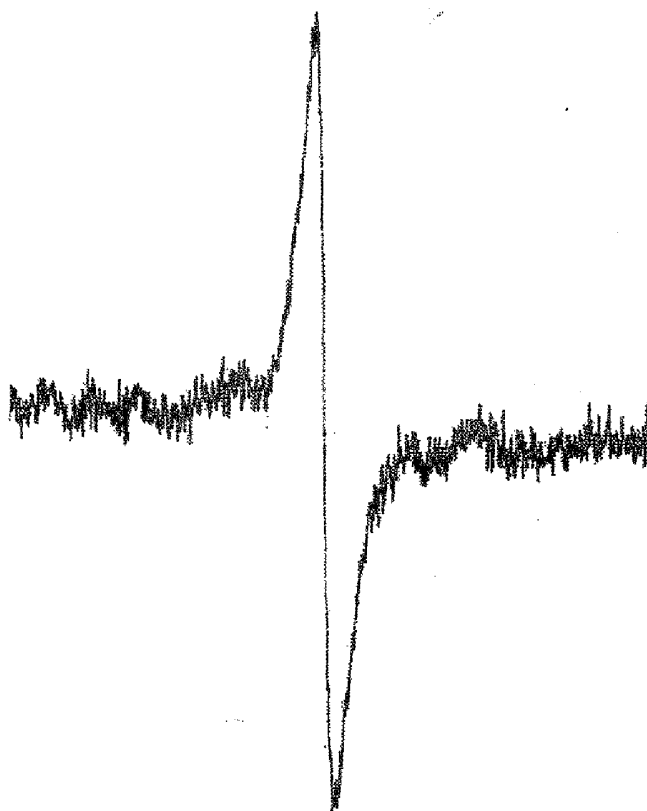


Fig.30 Espectro de ESR à temperatura ambiente do oxidante fc envelhecido (10 dias), preparado a partir de 400 cigarros.

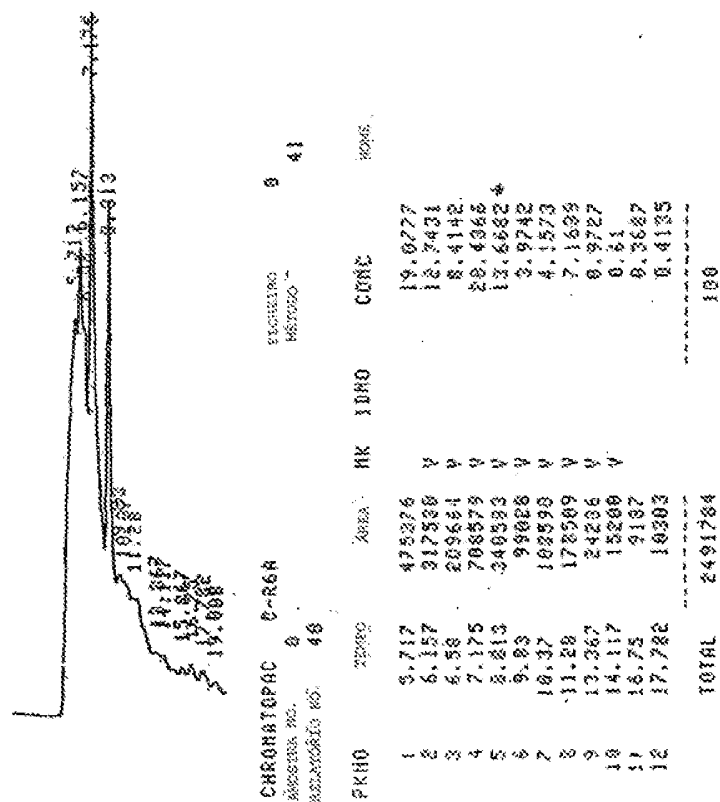


Fig.31 Perfil de HPLC da solução de todo o fc analisada na coluna de sílica (LiChrospher[®] Si 60, Merck)

* Indica o tempo de retenção, a área e a concentração (13,6682%) do oxidante fc.

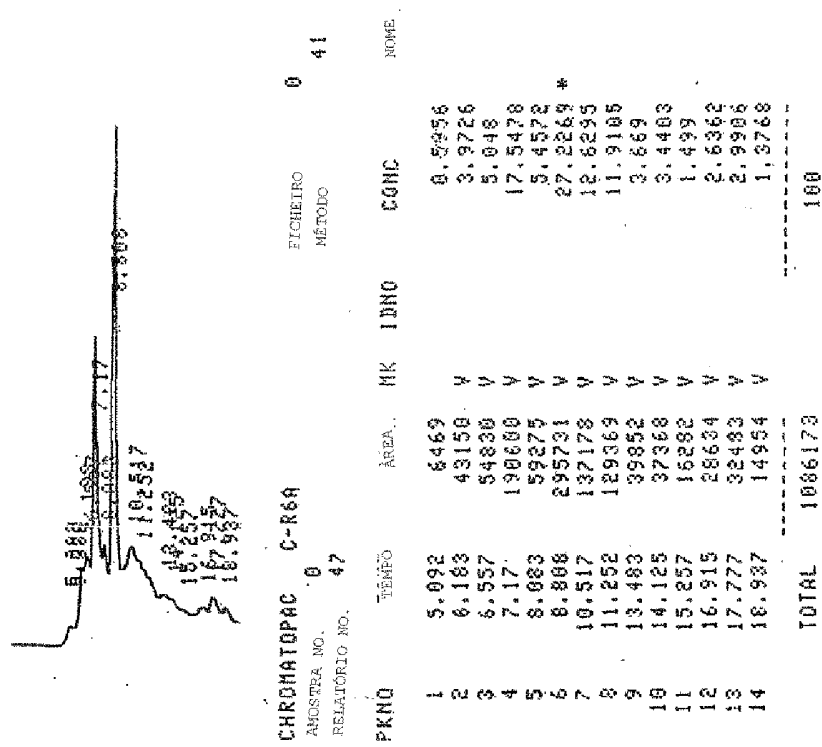


Fig.32 Perfil de HPLC do extracto aquoso da solução fc analisado na coluna de sílica (LiChrospher[®] Si 60, Merck).

* Indica o tempo de retenção, área e concentração (27,2269%) do oxidante fc.

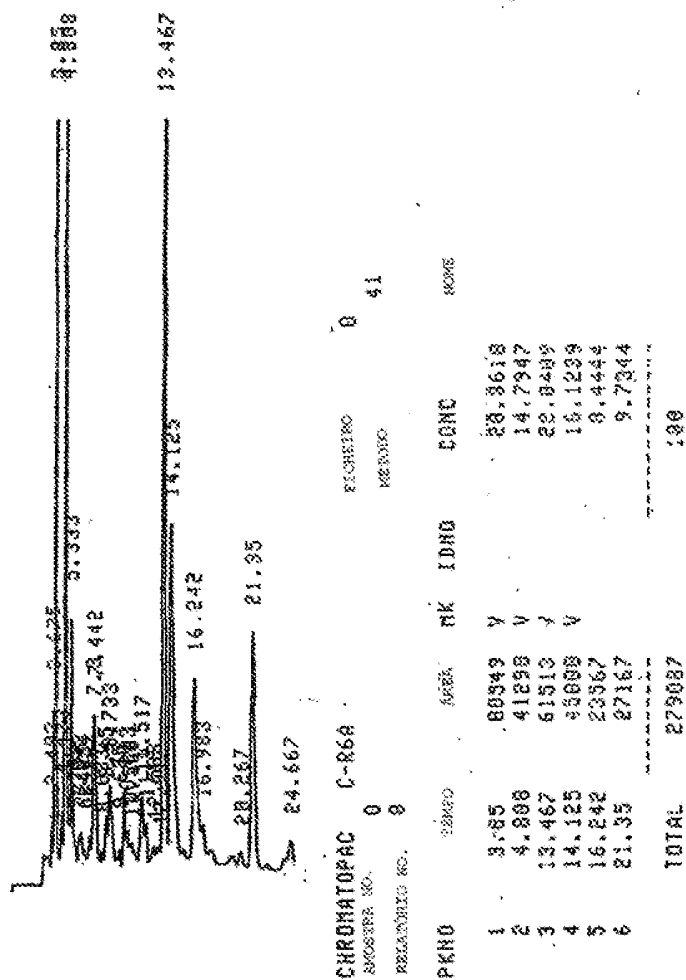


Fig.33 Perfil de HPLC da solução de todo o fe analisada na coluna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu). O oxidante fe eluiu a 13,467 min.

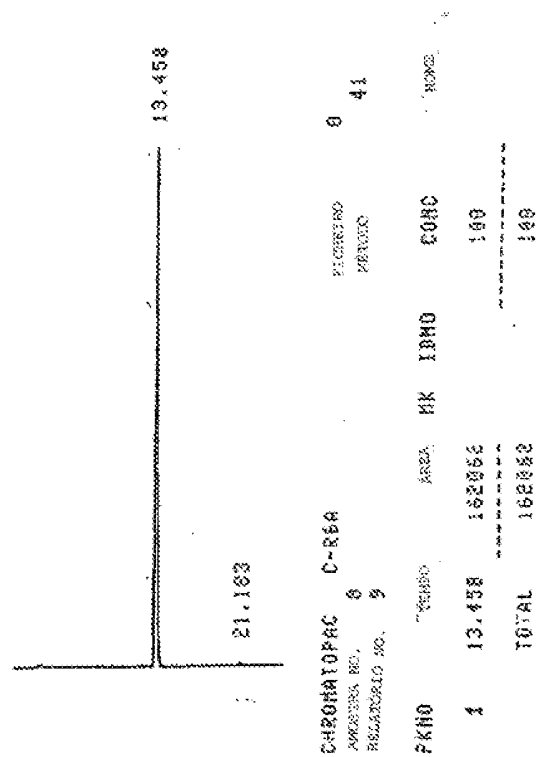


Fig.34 Perfil de HPLC do oxidante fo puro analisado na coluna ODS (Shim-pack CLC-ODS, Shimadzu) eluido ao tempo de retenção de 13,458 min.



Fig.35a SDS-PAGE das proteínas microsossomais de pulmão de cobaia tratadas com solução de todo o fc e o oxidante fc. Faixa 1, microsossomas não tratados; faixa 2, microsossomas tratados com 50 μ l de solução fc; faixa 3, microsossomas tratados com 100 μ l de solução fc; faixa 4, microsossomas tratados com 10 μ g de oxidante fc; faixa 5, microsossomas tratados com 20 μ g de oxidante fc.

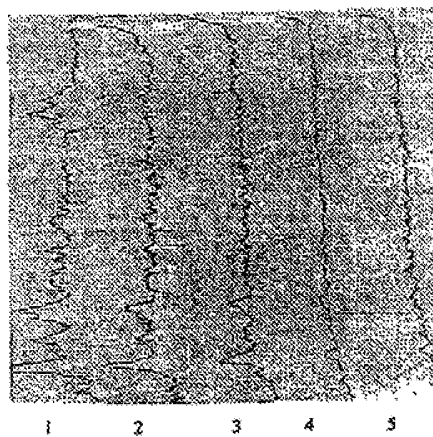


Fig.35b Análise densitométrica das bandas de proteínas de diferentes faixas da Fig.35a.