

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE QUANTITATIVE DE L'OXYDATION RADICALAIRE DE
MATÉRIAUX ORGANIQUES: ÉTUDE CINÉTIQUE ET THÉORIQUE DE
L'OXYDATION DES HYDROPEROXYDES

MÉMOIRE PAR ARTICLE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MÉLANIE SOLLIN

JANVIER 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Mathieu Frenette, pour m'avoir accompagné, conseillé et orienté tout au long de ma maîtrise. Sa patience, sa curiosité et son implication dans chaque projet donnent l'envie de toujours chercher plus loin.

Je tiens également à remercier tous mes collègues de laboratoire qui ont participé, de près ou de loin, à mes travaux recherche : Eshan Hosseininasab, Asma Boushih, Yohann Gagné, Antoine Juneau, Taylor Hope, Jason Malenfant et Mohamed El-Akhrass.

Je remercie aussi tout le personnel de l'UQAM qui continue de faire un travail remarquable malgré la situation actuelle actuelle.

Pour finir je tiens à remercier mes parents et mon frère qui m'ont supporté pendant toute la durée de mes études et qui ont rendu possible mes études au Canada.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	V
LISTE DES SCHÉMAS	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	XII
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	XIV
RÉSUMÉ.....	XV
INTRODUCTION.....	16
1.1 Les espèces réactives de l'oxygène	16
1.1.1 Activation de l'oxygène	16
1.1.2 Le stress oxydant.....	18
1.1.3 Les antioxydants.....	19
1.2 Les réactions radicalaires.....	22
1.2.1 Radicaux libres.....	22
1.2.2 Auto-oxydation des hydroperoxydes	28
1.2.3 Le radical hydroxyle	30
1.3 Méthodes expérimentales et théoriques utilisées.....	32
1.3.1 Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse et spectrophotométrie UV-Vis	32
1.3.2 Chimie computationnelle par Gaussian	35
1.3.3 Simulation d'un réseau de réactions chimiques	36
1.4 Projet de recherche – Mécanisme et mesures de l'oxydation de matériaux organiques et biologiques.....	37
1.4.1 Objectif du projet de recherche	37
1.4.2 Suivi de la formation des produits de l'oxydation	39
1.4.3 Modélisation cinétique de la réaction et calculs DFT	41

CHAPITRE II. ARTICLE : OXIDATION OF SECONDARY HYDROPEROXYDES VIA α -C-H ABSTRACTION TO GENERATE HYDROXYL RADICALS: FLUORENE AS A MODEL SYSTEM	44
CONCLUSION	106
RÉFÉRENCES.....	107

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1. L'oxygène à l'état fondamental triplet, ${}^3\text{O}_2$, ne réagit pas directement avec les molécules organiques à l'état singulet (${}^1\text{RH}$, réaction (a)), mais cette molécule peut être activée de plusieurs façons : (b) par la réaction avec un radical R^\bullet pour former un radical peroxyde, (c) par réduction partielle pour former le superoxyde, $\text{O}_2^{\cdot-}$, ou (d) par transfert d'énergie par un photosensibilisateur (PS) excité pour former l'oxygène singulet, ${}^1\text{O}_2$	17
Figure 1.2. Structure chimique d'antioxydants communs.	20
Figure 1.3. Réactions principales entre les radicaux libres organiques (R^\bullet) et une molécule (M).....	23
Figure 1.4. Étapes de l'auto-oxydation d'une molécule RH_2 avec un initiateur In en présence d'oxygène pour donner le produit hydroperoxyde RHOOH	25
Figure 1.5. Réaction de plusieurs composés avec le radical ROO^\bullet et leur constante de propagation. ¹ (Howard, Ingold, & Symonds, 1968), ² (Howard & Ingold, 1966), ³ (Howard & Ingold, 1965), ⁴ (Zielinski & Pratt, 2019), ⁵ et ⁷ (Pratt, Tallman, & Porter, 2011), ⁶ (Barclay, Xi, & Norris, 1997).....	27
Figure 1.6. L'oxydation des lipides polyinsaturés mène à la formation d'hydroperoxydes lipidiques qui peuvent s'oxyder à nouveau pour former des	

dérivés carbonylés électrophiles pouvant causer la modification covalente de biomolécules (Frenette & Scaiano, 2008).....	29
Figure 1.7. Mécanisme proposé pour expliquer la formation d'oxodiène (L=O) et de radicaux hydroxyles (HO [•]) lors de l'oxydation de lipides (Frenette & Scaiano, 2008).	30
Figure 1.8. Schéma d'un GC-MS (Hussain et Maqbool 2014).....	34
Figure 1.9. Schéma du fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Vis (Ider, 2017)	35
Figure 1.10. Mécanisme proposé pour l'auto-oxydation du fluorène, oxydation primaire (gauche) et secondaire (droite).	38
Figure 1.11. Détection de la formation du radical hydroxyle. La réaction du solvant benzène avec le radical hydroxyle en présence d'oxygène va générer le phénol qui peut être quantifié par GC-MS.....	39
Figure 1.12. Réactions d'initiations d'un hydroperoxyde avec une molécule M.	40
Figure 1.13. Action antioxydante du BHT contre les radicaux peroxydes ROO [•] (Barclay et al., 1997).....	41
Figure 1.14. Réactions utilisées dans la modélisation cinétique telle qu'implémentée par le logiciel Copasi.....	42

Figure 2.1. Experimental data and global kinetic fitting (dashed lines) for the concentration of FHOOH (black squares, measured as FHOH after Ph₃P reduction), FO (blue circles, left y-axis) and PhOH (pink triangles, right y-axis) as a function of reaction time. Reaction conditions: 37°C under air in benzene, initial concentrations of FH₂ = 0.2 M and AIBN = 0.05 M. The kinetic fit of this data and 4 other unique experiments gave these values for the rate constants shown in Scheme 2.2: $k_p = 11.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_s \approx 25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_t = 2.69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 54

Figure 2.2. DFT-calculated H-abstraction pathway for FHOO[•] + FH₂ (primary oxidation, dashed line) and H-abstraction for FHOO[•] + FHOOH (secondary oxidation, solid line) using B3LYP/6-311++g(2d,2p)//CPCM(benzene). The graph and the black and bold numbers represent free energy (ΔG , 298K), while the gray numbers in parenthesis represent enthalpy (ΔH , 298K)..... 56

Figure 2.3. Graphical abstract 61

Figure 2.4. Photograph of samples undergoing autoxidation with needles that allow oxygenation of the reaction medium while preventing mass loss via evaporation. 63

Figure 2.5. Aliquots and dilutions for the quantification of all samples..... 65

Figure 2.6. Total ion chromatogram of *sample_1* after 7 hours at 37°C..... 67

Figure 2.7. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1 68

Figure 2.8. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1 68

Figure 2.9. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1	69
Figure 2.10. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2	70
Figure 2.11. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2	70
Figure 2.12. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2	71
Figure 2.13. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3	72
Figure 2.14. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3	72
Figure 2.15. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3	73
Figure 2.16. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4	74
Figure 2.17. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4	74
Figure 2.18. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4	75

Figure 2.19. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5	76
Figure 2.20. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5	76
Figure 2.21. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5	77
Figure 2.22. Calibration curve for FO (UV-vis), FHOH (GC-MS) and PhOH (GC-MS) used for quantification of experiments in Series 1 (Samples 2, 3 and 4).....	79
Figure 2.23. Calibration curve for FHOH (GC-MS) and PhOH (GC-MS) used for quantification of experiments in Series 2 (Samples 1 and 5).....	79
Figure 2.24. UV-Vis spectrum of FO in methanol at increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mM).....	80
Figure 2.25. Free energy profile of the reactions	83
Figure 2.26. Enthalpic profile of the reactions.....	84
Figure 2.27. Relative SCF energy.....	87
Figure 2.28. Geometries for FHOOH scan at the transition state (1.3 Å), and at minimum scan distance (1.15 Å) showing collapse of the O-O bond.	88

LISTE DES SCHÉMAS

Scheme 2.1. Autoxidation reactions of weak C-H bonds will yield hydroperoxides. If an alkyl hydroperoxide contains an α C-H bond (top reaction), a secondary oxidation can form a ketone and hydroxyl radical.....	49
Scheme 2.2. Mechanism for the autoxidation of fluorene (FH₂) in benzene under air initiated by AIBN . We were able to model the progression of the entire system using four rate constants; k_i , k_p , k_t and the rate constant for the proposed α C-H abstraction from FHOOH , k_s	52
Scheme 2.3. Simplified mechanistic model used for numerical fitting for the autoxidation of fluorene (FH₂) in benzene under air initiated by AIBN	53
Scheme 2.4. Ph ₃ P and BHT are added to the reaction mixture to prevent further oxidation reactions and to reduce hydroperoxides into alcohols that can be quantified by GC-MS.....	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Compilation de ROS, de leur réactivité et défenses contre ces réactions.	21
Table 2.1. Experimental design of fluorene oxidation.....	63
Table 2.2. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_1 for propagation, secondary oxydation and termination steps (kp, ks and kt, respectively).....	69
Table 2.3. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_2 for propagation, secondary oxydation and termination steps (kp, ks and kt, respectively).....	71
Table 2.4. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_3 for propagation, secondary oxydation and termination steps (kp, ks and kt, respectively).....	73
Table 2.5. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_4 for propagation, secondary oxydation and termination steps (kp, ks and kt, respectively).....	75
Table 2.6. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_5 for propagation, secondary oxydation and termination steps (kp, ks and kt, respectively).....	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

4-HNE	<i>trans</i> -4-hydroxy-2-nonenal
4-HPNE	<i>trans</i> -4-hydroperoxy-2-nonenal
4-ONE	<i>trans</i> -4-oxo-2-nonenal
ΔG	Changement d'énergie libre de Gibbs
ΔH	Changement d'enthalpie libre
ADN	Acide désoxyribonucléique
A-H	antioxydants piégeur de radicaux (<i>radical-trapping antioxidants</i>)
AIBN	2,2'-azo-bis-isobutyronitrile
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-méthylphénol (<i>Butylated hydroxytoluene</i>)
DFT	Density Functional Theory
FH ₂	Fluorène
FHOH	9-hydroxyfluorène

FHOOH	9-hydroperoxyfluorene
FO	9-Fluorénone
FHOO•	Radical 9-peroxyfluorène
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse
k_p	Constante de propagation (oxydation primaire)
k_s	Constante de l'oxydation secondaire (aussi appelée $k_{\alpha C-H}$)
k_t	Constante de vitesse bimoléculaire pour terminaison
MDA	Malonaldehyde
OH•	Radical hydroxyle
Ph ₃ P	Triphénylphosphine
PhOH	Phénol
ROS	Espèces réactives à l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
t_r	Temps de retention
UV-Vis	Spectroscopie d'absorption dans la région ultraviolet et visible

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

kcal	kilo Calorie
g	gramme
g/mol	gramme par mole
m/z	ratio masse/charge
nm	nanomètre
s	seconde

RÉSUMÉ

Les molécules organiques avec des liaisons C-H relativement faibles peuvent réagir avec l'oxygène via des réactions radicalaires appelées auto-oxydation. Les principaux produits d'oxydation de ces réactions induites par les radicaux peroxyde sont les hydroperoxydes, $R_2\text{CHOOH}$. Les constantes de vitesses pour ces réactions de peroxydation primaires sont bien documentées, principalement par Ingold et ses collègues. Une réaction peu décrite est l'oxydation secondaire de ces hydroperoxydes pour former des cétones, $R_2\text{C=O}$. Les travaux présentés démontrent qu'un produit non bénin de cette oxydation secondaire est le radical hydroxyle. Le radical hydroxyle fut observé indirectement en utilisant le benzène comme solvant dans ces réactions d'oxydation. Ce solvant réagit avec les radicaux hydroxyle pour former le phénol qui peut être quantifié. Suite à des travaux sur l'auto-oxydation des lipides, nous utilisons le fluorène comme système modèle pour étudier cette oxydation secondaire plus en détail.

La modélisation cinétique des résultats expérimentaux à l'aide du logiciel Copasi pour l'auto-oxydation du fluorène sous air, initiée par l'AIBN, a permis d'obtenir des informations sur la cinétique pour les réactions d'auto-oxydation primaire et secondaire. La modélisation DFT par Gaussian prédit également les énergies nécessaires pour l'auto-oxydation primaire et secondaire. Cette approche peut ouvrir la porte à l'étude d'autres substrats oxydables avec des liaisons C-H relativement faibles tels que les plastiques, la pétrochimie, les protéines ou les lipides.

Mots-clés : Auto-oxydation, fluorène, radical hydroxyle, hydroperoxydes

INTRODUCTION

1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

1.1.1 Activation de l'oxygène

L'oxydation des matériaux organiques et biologiques est une conséquence inévitable de vivre en présence d'oxygène (Apel & Hirt, 2004). Certainement, ces processus sont thermodynamiquement favorables, mais les réactions avec l'oxygène sont cinétiquement lentes (sauf dans le cas d'un feu, bien sûr). L'oxygène moléculaire est un triplet biradical dans son état électronique fondamental. Cette configuration électronique, ${}^3\text{O}_2$, ralentit sa réaction avec la majorité des composés organiques qui sont eux à l'état singulet. Les mécanismes par lesquels l'oxygène peut réagir avec les molécules sont complexes et continuent d'être un sujet de recherche fascinant.

En contexte biologique, les ROS sont générées en continu par réduction partielle de l'oxygène moléculaire lors de processus aérobiques (Gupta, 2010). Le superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ ainsi que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont formés quand l'oxygène moléculaire oxyde les espèces porteuses d'électrons par transfert d'électrons (Storz & Imlayt, 1999). Le superoxyde généré peut agir comme promoteur pour plusieurs processus d'oxydations (Apel & Hirt, 2004).

En présence de lumière et des photosensibilisants, il est aussi possible pour l'oxygène moléculaire d'être converti en ROS par transfert d'énergie, ce qui va entraîner la

formation de l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$ (Greer, 2006). Cette activation n'est pas commune dans les processus biologiques normaux, mais l'oxygène singulet est utilisé dans les traitements par photothérapie (Laubach et al., 2008).

Une grande partie des processus d'activation de l'oxygène moléculaire en ROS est la réaction de l'oxygène avec des radicaux libres, R^\bullet , pour former des radicaux peroxyles, ROO^\bullet . Cette réaction avec faible barrière énergétique est limitée par la diffusion pour la majorité des radicaux centrés au carbone (Maillard, Ingold, & Scaiano, 1983). Ces processus d'activation de l'oxygène sont résumés dans la Figure 1.1.

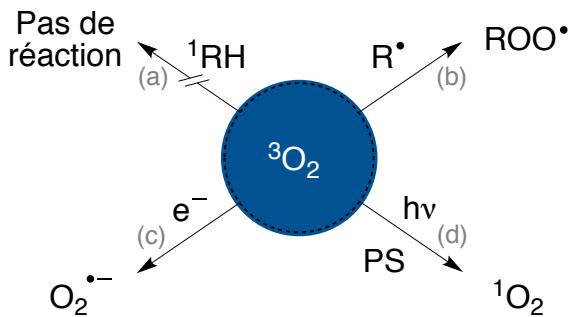


Figure 1.1. L'oxygène à l'état fondamental triplet, $^3\text{O}_2$, ne réagit pas directement avec les molécules organiques à l'état singulet (^1RH , réaction (a)), mais cette molécule peut être activée de plusieurs façons : (b) par la réaction avec un radical R^\bullet pour former un radical peroxyde, (c) par réduction partielle pour former le superoxyde, $\text{O}_2^{\bullet-}$, ou (d) par transfert d'énergie par un photosensibilisateur (PS) excité pour former l'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$.

Une fois activé, l'oxygène peut se transformer en plusieurs types de molécules appelées ROS qui peuvent causer des dommages oxydatifs aux protéines, à l'ADN ou encore aux lipides (Apel & Hirt, 2004), d'où l'importance de comprendre et de contrôler leur

formation. Les ROS peuvent être des espèces radicalaires ou non radicalaires, mais causent généralement des réactions d'oxydation avec les molécules environnantes.

1.1.2 Le stress oxydant

Les ROS sont responsables de la plupart du stress oxydant qui se produit dans les organismes vivants. On appelle stress oxydant un déséquilibre entre antioxydants et oxydants en faveur des oxydants (Sies, 1997). Le stress oxydant représente l'agression des cellules par les ROS ce qui peut engendrer le vieillissement de celles-ci. De nombreuses études démontrent qu'il y a une production accrue de ROS pour un bon nombre de maladies, mais il est encore incertain si la prévention de ces ROS ralentirait aussi l'apparition ou la progression de ces maladies (Halliwell & Gutteridge, 2015) (Papas, 2019).

Les cellules peuvent tolérer un niveau modéré de stress oxydant qui va entraîner une augmentation de processus d'antioxydants afin de pouvoir rééquilibrer la balance entre oxydant et antioxydants. Dans certains cas, un niveau modéré de stress oxydant peut permettre d'augmenter les défenses contre un niveau plus élevé de stress oxydant à venir (Halliwell & Gutteridge, 2015). Afin de se protéger contre le stress oxydant, la nature a développé plusieurs catégories d'antioxydants.

1.1.3 Les antioxydants

Les organismes aérobiques doivent être protégés du stress oxydant dû aux ROS par un ensemble de systèmes de défense. Il existe différents types d'antioxydants remplissant des fonctions variées et jouant un rôle majeur dans ces systèmes de défense. On trouve les antioxydants dits préventifs qui empêchent ou ralentissent la formation de radicaux libres et de ROS directement. Il existe également des antioxydants dits piégeurs (ici nommés A-H). Ils vont fournir un électron ou un atome d'hydrogène aux radicaux peroxydes pour empêcher le processus de dégradation. Ces antioxydants vont rompre la propagation de la chaîne de réaction. Comme les produits d'oxydations sont souvent des hydroperoxydes, soit ROOH ou HOOH, leurs réductions sont essentielles pour prévenir des réactions d'oxydation secondaires—la recherche présentée dans ce mémoire explique comment certains hydroperoxydes peuvent générer des électrophiles et le radical hydroxyle. Les enzymes responsables pour la réduction du ROOH et du HOOH sont la catalase et la glutathion peroxydase. (Wheeler, Salzman, Elsayed, Omaye, & Korte Jr, 1990). Lorsque des produits dérivés du stress oxydant sont détectés dans l'organisme, le système de défense antioxydant, soit moléculaire ou enzymatique, est régulé pour contre-balancer (Papas, 2019).

Le corps produit certains antioxydants tel que le glutathion et d'autres proviennent de l'alimentation tels que les fruits, les légumes et bien d'autres. On peut les retrouver sous forme de vitamines provenant de substances végétales ou minérales. Le glutathion, l'acide ascorbique (vitamine C) et l'alpha-tocopherol (vitamine E) sont des antioxydants essentiels tandis que le BHT est un antioxydant synthétique (Figure 1.2). Le glutathion est un tripeptide, composé de trois acides aminés : cystéine, acide glutamique et glycine. Le glutathion peut piéger les radicaux libres, mais dans la plupart des cas, va interagir avec des espèces toxiques électrophiles telles que les

produits d’oxydation et les cétones α,β -insaturées pour former des produits inoffensifs. La vitamine E (dont la forme d-alpha-tocophérol est la plus protectrice) quant à elle est essentielle pour la stabilisation des membranes biologiques et pour prévenir de l’oxydation des acides gras polyinsaturés. C’est une espèce liposoluble qui permet de piéger les radicaux libres, principalement les radicaux peroxyyles.

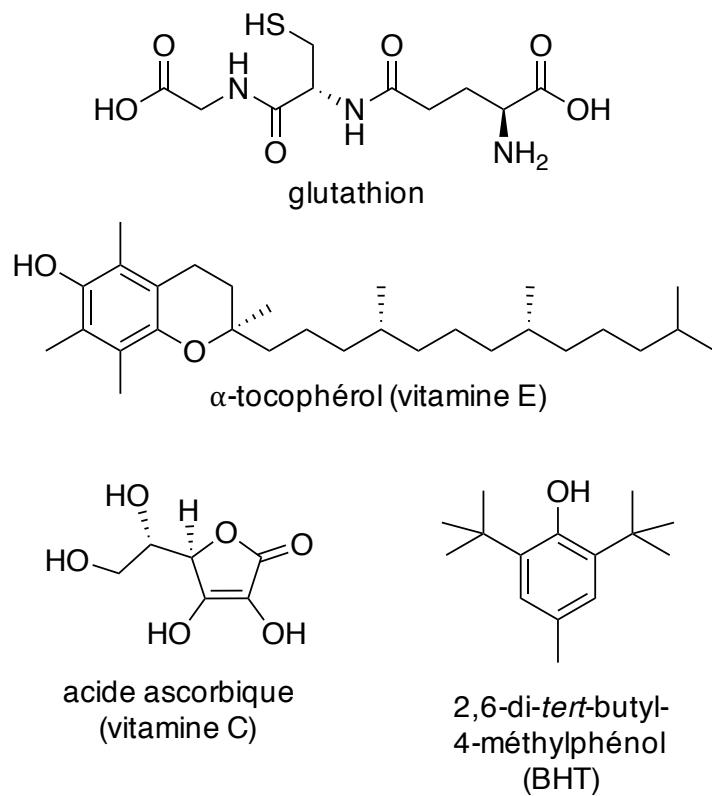
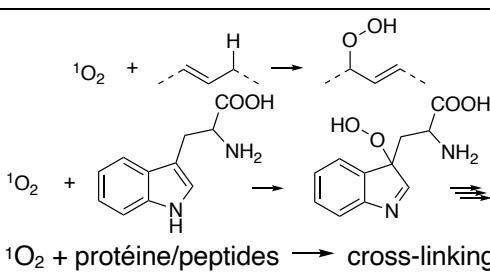


Figure 1.2. Structure chimique d’antioxydants communs.

Le Tableau 1 présente un résumé des espèces ROS en ordre croissant de réactivité ainsi que les principales réactions qu’elles peuvent effectuer dans le contexte d’oxydation et les méthodes de défenses possibles contre ces réactions.

Tableau 1.1 Compilation de ROS, de leur réactivité et défenses contre ces réactions.

ROS	Exemples de réactions d'oxydations	Défenses possibles
H ₂ O ₂	Catalyse de style Fenton (M = métal): $M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + HO^- + HO^\bullet$ $M^{(n+1)+} + H_2O_2 \rightarrow M^{n+} + H^+ + HOO^\bullet$	Enzymes (catalase, glutathion peroxydase) et chélation des métaux (ferretin, EDTA) ¹
ROOH	Catalyse de style Fenton (M = métal): $M^{n+} + ROOH \rightarrow M^{(n+1)+} + HO^- + RO^\bullet$ $M^{(n+1)+} + ROOH \rightarrow M^{n+} + H^+ + ROO^\bullet$	Enzymes (catalase, glutathion peroxydase) et chélation des métaux (ferritine, EDTA) ²
$O_2^\bullet \xrightleftharpoons{H^+} HOO^\bullet$	$2 O_2^\bullet + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $HOO^\bullet + R-H \rightarrow H_2O_2 + R^\bullet$ (si la liaison R-H est < 90 kcal/mol)	Superoxyde dismutase, acide ascorbique ³
1O_2	 $^1O_2 + \text{alpha-carotene} \rightarrow \text{oxidized alpha-carotene}$ $^1O_2 + \text{tryptophan} \rightarrow \text{tryptophan derivative}$ $^1O_2 + \text{protéine/peptides} \rightarrow \text{cross-linking}$	Réactivité assez élevée, mais la désactivation physique en milieu aqueux et le court temps de demi-vie ($\tau_{1/2} \sim 2 \mu s$) limite les réactions d'oxydation en milieu biologique. Le β -carotène protège contre 1O_2 (quenching). ⁴
ROO [•]	$ROO^\bullet + R-H \rightarrow ROOH + R^\bullet$ (si la liaison R-H est < 90 kcal/mol) $ROO^\bullet + CH_2=CHR \rightarrow ROO-CH_2-C^\bullet HR$ <i>(réaction proposée dans ce mémoire)</i> $ROO^\bullet + R_2CHOOH \rightarrow ROOH + R_2CO + HO^\bullet$	Réactivité sélective; plusieurs antioxydants (A-H) peuvent défendre par les réactions $ROO^\bullet + A-H \rightarrow ROOH + A^\bullet$ $A^\bullet + A^\bullet \rightarrow ROO-A$ Ex. de A-H = tocophérols, BHT, polyphénols phytochimiques ⁵
RO [•]	$RO^\bullet + R-H \rightarrow ROH + R^\bullet$ (si la liaison R-H est < 105 kcal/mol)	Réactivité très élevée; défense improbable ⁶
HO [•]	$HO^\bullet + Ar-H \rightarrow (HO)-Ar-H^\bullet$ $HO^\bullet + R-H \rightarrow ROH + R^\bullet$ (si la liaison R-H est < 119 kcal/mol)	Réactivité extrême; aucune défense possible ⁷

Réactivité Croissante

¹(Willekens et al., 1997), ²(Mannervik, 1985), ³(Aikens & Dix, 1991), ⁴(Nardello, Marti, Pierlot, & Aubry, 1999), ⁵(Burton & Ingold, 1981), ⁶(Wong, Griller, & Scaiano, 1982), ⁷ (Buxton, Greenstock, Helman, & Ross, 1988)

Au cours de ma maîtrise, une partie de mon temps fut concentrée sur le développement et la calibration d'une nouvelle méthode capable de quantifier les antioxydants. Cette méthode possède bien d'autres applications telles que la mesure de la demande chimique/biologique en oxygène (DCO ou DBO) ou la stabilité de produits agroalimentaires. La méthode repose sur la mesure de la consommation d'oxygène, ou l'évolution d'un autre gaz, par la mesure d'une variation de pression dans chaque puits d'une microplaqué. C'est une méthode simple, rapide et peu coûteuse qui est un avantage considérable en comparaison aux méthodes existantes. Un autre avantage majeur de cette méthode est la quantité d'échantillons analysables simultanément (jusqu'à 96 échantillons en parallèle) et pour de longues périodes de temps (plusieurs jours). Une demande de brevet pour cette méthode est en préparation et pour cette raison, plus de détails concernant le fonctionnement de la méthode ne peuvent être fournis.

1.2 Les réactions radicalaires

1.2.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces ayant un ou plusieurs électrons non appariés ce qui va créer des orbitales semi-remplies. Ces espèces instables cherchent à remplir ces orbitales, soit par transfert d'électrons ou par réaction chimique. Même si leurs concentrations absolues sont petites, les réactions chimiques avec des espèces

radicalaires ont souvent de barrières cinétiques faibles ce qui accélère les processus qui les impliquent.

Les radicaux libres peuvent interagir de différentes façons (Halliwell & Gutteridge, 2015). Deux radicaux libres peuvent réagir l'un avec l'autre : leurs électrons célibataires forment alors une liaison covalente et en résulte une espèce non radicalaire. Un radical organique peut aussi réagir avec une moléculaire non radicalaire d'une de 4 façons principales : (i) le radical peut former une liaison covalente sur une autre molécule et le produit d'addition formé aura toujours un électron célibataire, (ii) le radical peut agir comme un agent de réduction en donnant un électron à une espèce à son environnement, (iii) le radical peut agir comme un agent oxydant en enlevant un électron à une espèce dans son environnement, ou encore (iv) le radical peut faire une abstraction d'un atome d'hydrogène, typiquement provenant de liaisons C-H, O-H ou N-H (Halliwell & Gutteridge, 2015). Les différentes réactions sont résumées dans la Figure 1.3.

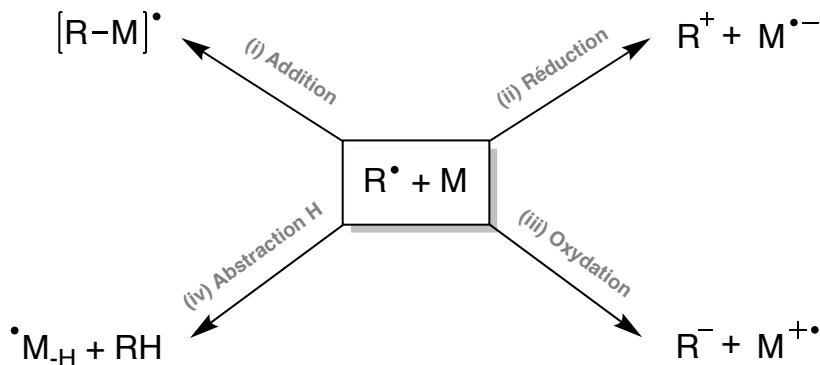


Figure 1.3. Réactions principales entre les radicaux libres organiques (R^\bullet) et une molécule (M).

Les réactions radicalaires en présence d'oxygène et de matériel organique impliquent généralement une chaîne de radicaux libres qui suivent le même mécanisme fondamental comme présenté sur la Figure 1.4 : l'initiation, la propagation et la terminaison (Ingold & Pratt, 2014). La première étape (1) est l'initiation. Dans cette étape un initiateur In va former un radical $In\cdot$ (soit par un processus chimique ou photochimique ou même par radioactivité ionisante). Par la suite cet initiateur va former un radical peroxyde $InOO\cdot$, à condition que cette initiateur forme au préalable rapidement un radical carboné.

L'étape de propagation va mener à la formation du radical peroxyde dérivé du substrat RH_2 . Cette étape est une réaction en chaîne et elle est responsable pour majorité de la formation d'hydroperoxydes pendant l'auto-oxydation. La propagation se divise en deux étapes (réactions 2 et 3 sur la Figure 1.4). Cela signifie que la concentration à l'équilibre de $RHOO\cdot$ va être beaucoup plus élevée que celle du $RH\cdot$. Dans la réaction 2, l'oxygène s'ajoute rapidement au radical alkyle du substrat $RH\cdot$ pour former le radical peroxyde $RHOO\cdot$. Dans la réaction 3, le radical formé va faire une abstraction de l'atome d'hydrogène d'une molécule du substrat RH_2 pour former l'hydroperoxyde $RHOOH$ ainsi qu'un radical alkyle $RH\cdot$ dérivé du substrat RH_2 . Dans des conditions de pression normale, la réaction 2 va être beaucoup plus rapide que la réaction 3. La constante de vitesse (d'ordre 2) k_p de la réaction 3 est dépendante de l'enthalpie de dissociation de la liaison C-H. Un résumé de réactions entre un radical peroxyde et quelques molécules souvent étudiés dans le contexte de réactions d'autoxidation est présenté dans la Figure 1.4.

En absence d'antioxydants, les réactions de propagation se poursuivent jusqu'à ce que deux radicaux réagissent ensemble. Cette réaction de terminaison (étape 4) génère des produits non-radicalaires qui arrêtent la propagation des radicaux. Si les radicaux peroxydes contiennent des liaisons α C-H, comme c'est le cas dans l'exemple donné en

Figure 1.4, la terminaison de deux RHOO^\bullet suivra le mécanisme de Russell pour former un alcool, RHOH , et une cétone, RO (Howard & Ingold, 1968).

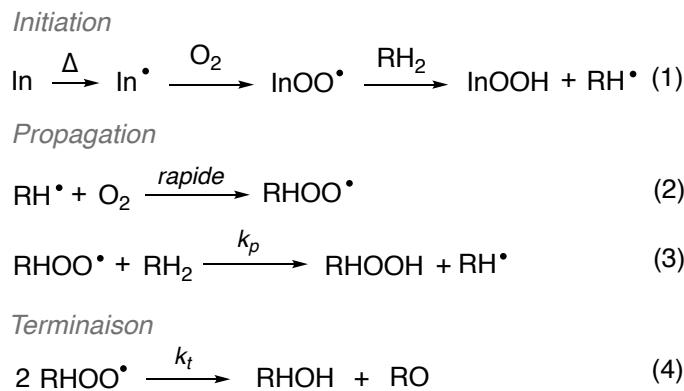


Figure 1.4. Étapes de l'auto-oxydation d'une molécule RH_2 avec un initiateur In en présence d'oxygène pour donner le produit hydroperoxyde RHOH .

Pour le mécanisme de réaction radicalaire tel que défini dans la Figure 1.4, il est possible de prédire la vitesse de la réaction globale par l'équation différentielle :

$$\frac{d[\text{RHOH}]}{dt} = -\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \frac{k_p}{(2k_t)^{1/2}} \cdot [\text{RH}_2] \cdot R_i^{1/2}$$

La cinétique d'oxydation de molécules organiques est principalement dictée par les constantes de vitesses k_p et k_t . La valeur de la constante de vitesse de propagation (k_p) est plus rapide pour les molécules qui forment des radicaux stabilisés (voir Figure 1.5 pour plusieurs exemples). Les valeurs de k_t sont rapides, mais sont approximativement $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour les radicaux peroxyls tertiaires (R_3COOH),

secondaires ($R_2\text{CHOOH}$) ou primaires (RCH_2OOH), respectivement (Howard, Schwalm, & Ingold, 1968).

Certaines molécules avec une réactivité très élevée avec les radicaux peroxyls peuvent prévenir les réactions d'oxydations par chaîne radicalaire. C'est le cas pour le BHT et la vitamine E (alpha-tocopherol) qui réagissent environ 300x et 50000x plus rapidement avec les radicaux peroxyles que la même réaction avec des lipides polyinsaturés (Figure 5).

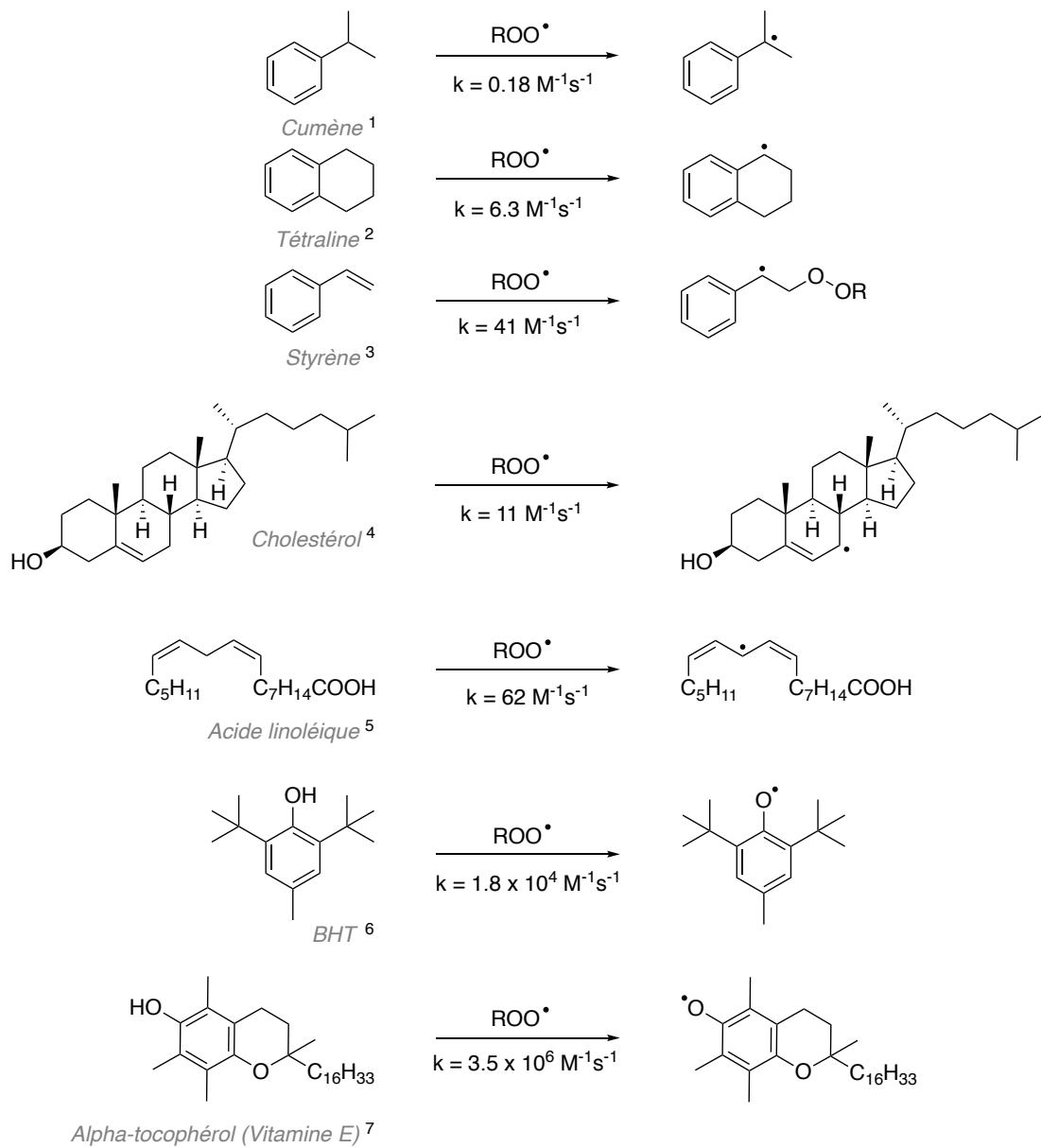


Figure 1.5. Réaction de plusieurs composés avec le radical ROO^\bullet et leur constante de propagation. ¹(Howard, Ingold, & Symonds, 1968), ²(Howard & Ingold, 1966), ³(Howard & Ingold, 1965), ⁴(Zielinski & Pratt, 2019), ⁵ et ⁷(Pratt, Tallman, & Porter, 2011), ⁶(Barclay, Xi, & Norris, 1997)

1.2.2 Auto-oxydation des hydroperoxydes

Le mécanisme d'auto-oxydation (ou autoxydation) représente l'oxydation radicalaire en chaîne de molécules organiques par l'oxygène moléculaire. L'oxydation repose sur un échange d'électron entre une espèce oxydante et une réductrice. Ce mécanisme se divise en trois étapes : initiation, transfert de chaîne - propagation et terminaison. L'oxygène réagit rapidement avec les radicaux à cause du caractère triplet de l'oxygène moléculaire. Une molécule est plus apte à faire une auto-oxydation si son atome d'hydrogène est facile à arracher (Carey & Sundberg, 1996). Le processus d'auto-oxydation mène à la formation de produits primaires tels que les peroxydes et peut mener à la formation de produits secondaires (si oxydation prolongée) tels que des cétones, des aldéhydes ou encore des alcools (Hermans, Peeters, & Jacobs, 2008) comme présentés dans la partie 1.2.1.

Une des cibles principales de l'oxydation induite par les radicaux libres est les lipides polyinsaturés. Durant l'oxydation, la réaction la plus à même de se produire entre les radicaux peroxyles et les hydroperoxydes est l'abstraction de l'atome d'hydrogène. Au cours de la peroxydation lipidique, présentée sur la Figure 1.6, des cétones, des aldéhydes sont formés comme produits de cette oxydation.

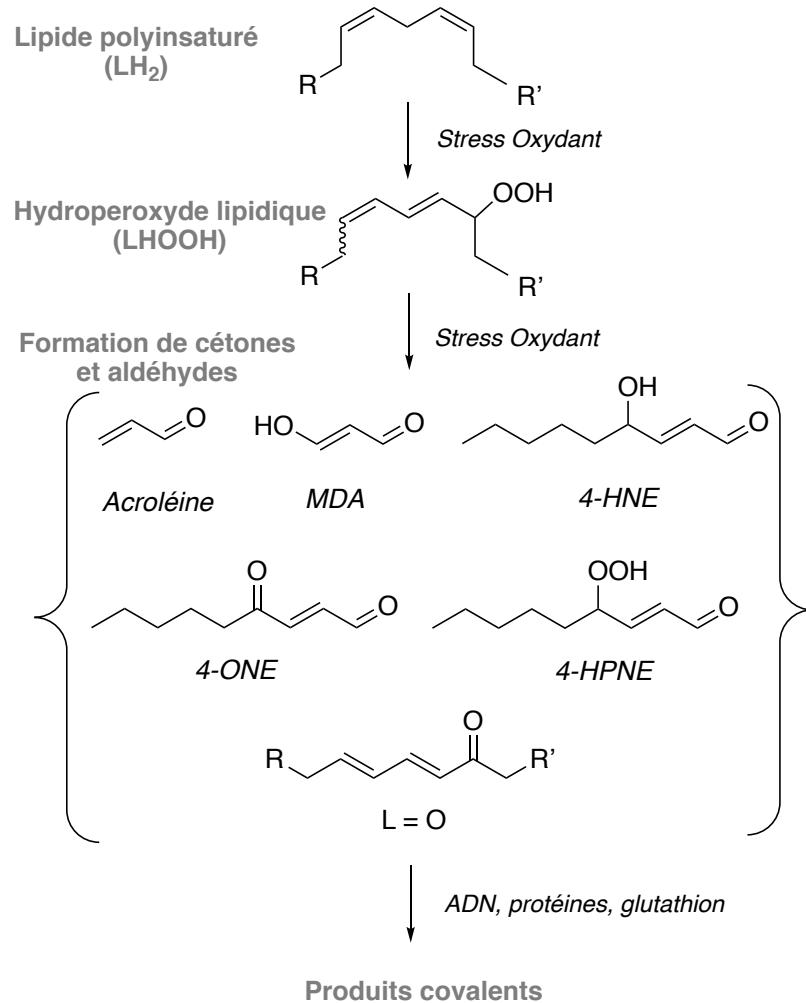


Figure 1.6. L’oxydation des lipides polyinsaturés mène à la formation d’hydroperoxydes lipidiques qui peuvent s’oxyder à nouveau pour former des dérivés carbonylés électrophiles pouvant causer la modification covalente de biomolécules (Frenette & Scaiano, 2008).

La formation et la réactivité des produits électrophiles dérivés à partir d’hydroperoxydes lipidiques ($LHOOH$) sont un sujet de recherche actif. Un mécanisme

fut proposé (Frenette & Scaiano, 2008) pour la formation des lipides oxodiènes ($L=O$) et celui-ci explique la formation d'un radical hydroxyle ($HO\cdot$) (Figure 1.7). Quoique l'espèce $HO\cdot$ soit très réactive, cette réaction est globalement très favorable dû au fait que la rupture de la liaison faible O-O du peroxyde va être compensée énergétiquement par la formation de cétones (Frenette & Scaiano, 2008).

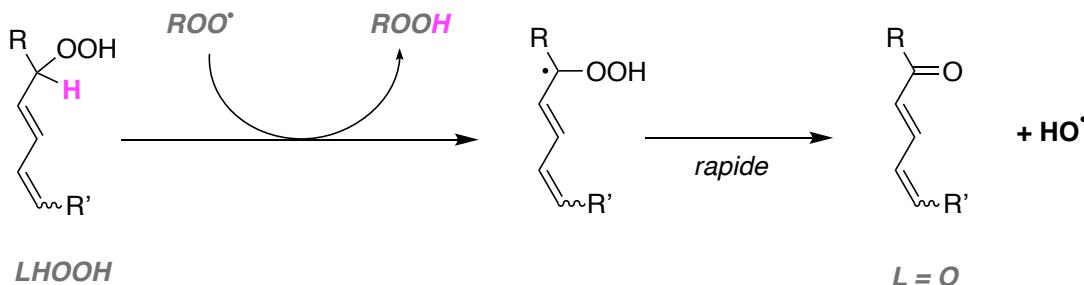


Figure 1.7. Mécanisme proposé pour expliquer la formation d'oxodiène ($L=O$) et de radicaux hydroxyles ($HO\cdot$) lors de l'oxydation de lipides (Frenette & Scaiano, 2008).

1.2.3 Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est une des ROS des plus réactives. Il est considéré comme un des oxydants les plus puissants dans les systèmes biologique. Le $OH\cdot$ peut réagir facilement avec un grand nombre de molécules de façon presque aléatoire. Sa détection directe dans un système biologique est impensable dû à son temps de vie très court (10^{-9} s). (Yu, 1994) De plus, la détection de ses produits de réaction est aussi complexe puisqu'elles donnent lieu à un mélange de produits qui seraient très diversifiés—en théorie, il y a aurait plus de différents produits générés par les réactions du radical hydroxyle en milieu biologique qu'il y a de liaisons C-H distinctes dans la cellule !

Même si la détection de tous les produits de réaction avec les radicaux hydroxyles est impossible, il est postulé que cette espèce réactive est importante dans les stress oxydants. Il est donc important de comprendre les réactions qui peuvent générer les radicaux hydroxyles.

Il est proposé dans la littérature que les HO[•] sont principalement dérivés de la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton catalysée par le fer ou le cuivre :

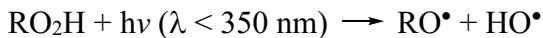
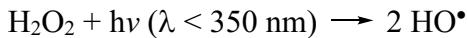


Cette réaction fut originalement découverte en 1876 en étudiant l'oxydation de l'acide tartrique par le peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferreux (Fenton, 1876). Elle est aussi possible avec les hydroperoxydes alkylés, mais dans ce cas, la formation de radicaux hydroxyles n'est pas prédictée :



Les métaux jouent donc un rôle important dans la génération de radical. C'est pour cela que les protéines telles que la ferritine ou la céroloplasmine, qui peuvent piéger les ions métalliques, sont des antioxydants importants (Papas, 2019).

Les peroxydes sont aussi sensibles à la lumière UV qui cause un clivage homolytique de la liaison O-O (Venkatadri & Peters, 1993). Ces réactions photochimiques sont une source de radicaux hydroxyles reconnue :



Dans ce mémoire, nous étudions la réaction des hydroperoxydes du type RHOOH qui peuvent générer des radicaux hydroxyles sans métaux ou lumière.

1.3 Méthodes expérimentales et théoriques utilisées

1.3.1 Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse et spectrophotométrie UV-Vis

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est une technique d'analyse de choix pour étudier des mélanges organiques et biologiques complexes. La partie GC (chromatographie en phase gazeuse) permet de séparer les composés d'un mélange, pour cela les molécules à séparer se volatilisent et se mélangent à un gaz qui constitue la phase mobile. Ce gaz est généralement l'hélium et dans certains cas l'hydrogène ou l'azote. Il est important de noter que les composés à analyser doivent être volatils et thermostables. Il est donc souvent nécessaire de dériver les composés non volatils ou non thermostable afin de pouvoir les analyser par GC-MS. Par la suite, à l'aide de ce gaz, les analytes passent à travers une colonne

imprégnée ou greffée avec la phase stationnaire. Les molécules à séparer migrent à différentes vitesses dans la colonne ce qui va permettre la séparation des composés en fonction du temps. Le temps de migration des composés, temps entre l'injection et l'arrivée au détecteur, est appelé temps de rétention (t_r). t_r dépend de la volatilité du composé et de l'affinité de ce composé avec la phase stationnaire.

À la sortie de la colonne, les analytes sont détectés par un spectromètre de masse. La partie MS (spectrométrie de masse) permet l'identification et la quantification des composés en fonction de leur rapport m/z. La molécule est ionisée et cette ionisation forme un ion moléculaire qui va être fragmenté. Les fragments sont ensuite triés par masse. Ces fragments peuvent servir pour l'identification d'une molécule à l'aide d'une base de données de spectres de molécules organiques. La source d'ionisation peut être à ionisation électronique EI ou à ionisation chimique CI. L'ionisation électronique, très énergétique, consiste à bombarder les molécules par un faisceau d'électrons rapides de haute énergie. Cette ionisation donne principalement des radicaux positifs avec une seule charge. C'est une ionisation ayant une bonne sensibilité et produisant des courants d'ions élevés. La GC-MS est un outil efficace qui permet de séparer (par GC) et identifier (par MS) les différents composés d'un mélange complexe (Bouchonnet, 2013).

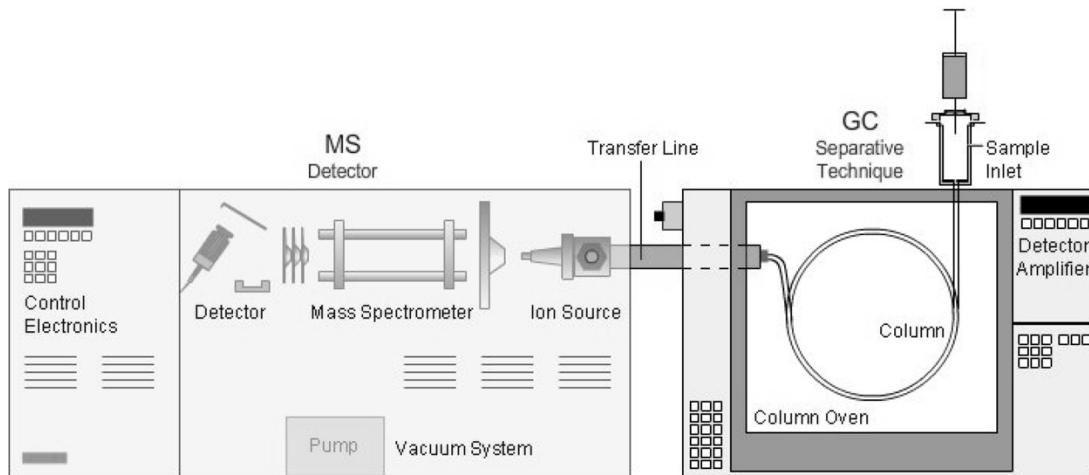


Figure 1.8. Schéma d'un GC-MS (Hussain et Maqbool 2014)

La spectroscopie UV-Vis est une méthode basée sur la mesure de l'absorbance d'un échantillon dans le domaine de la lumière visible (entre 400 et 800 nm) ainsi que le domaine de l'ultraviolet (entre 190 et 400 nm). Cette technique peut être utilisée pour quantifier un analyte ou encore étudier les transformations d'une molécule. En effet l'absorbance est proportionnellement reliée à la concentration par la loi de Beer-Lambert : $A_\lambda = - \log (I / I_0) = \log (100 / T) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C$ où I_0 représente l'intensité de la lumière incidente à la longueur d'onde λ , I représente l'intensité de la lumière transmise de l'échantillon à la longueur d'onde λ ($I < I_0$), T représente la transmittance (exprimée en %), ε représente le coefficient d'atténuation molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), l représente la longueur du trajet de la lumière dans le milieu considéré (en cm) et C représente la concentration de l'analyte (en $mol \cdot L^{-1}$) (Perkampus, 2013).

Un spectrophotomètre est capable de mesurer la quantité de lumière que l'échantillon absorbe. Cet appareil va ensuite envoyer un faisceau de lumière (flux de photons) à

travers l'échantillon et mesurer l'intensité de la lumière après avoir traversé l'échantillon à l'aide d'un détecteur comme présenté dans la Figure 1.9 (Nair, 2008).

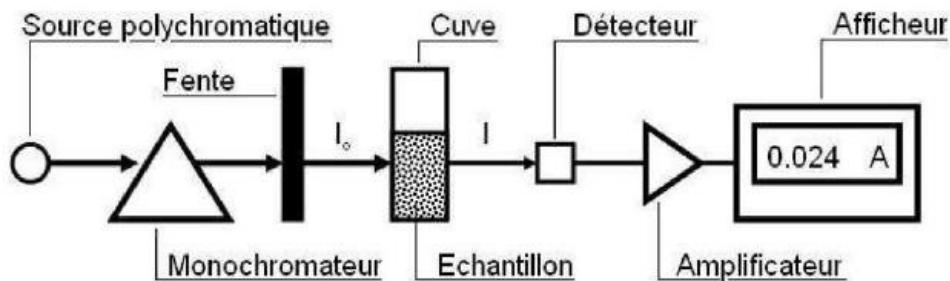


Figure 1.9. Schéma du fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Vis (Ider, 2017)

1.3.2 Chimie computationnelle par Gaussian

La chimie computationnelle (aussi appelée chimie numérique) est un véritable atout pour la recherche.

Gaussian 16 (version 2016) est un logiciel de chimie computationnelle très utilisé par la communauté scientifique. Ce logiciel permet la modélisation à un niveau des plus avancés. Avec Gaussian il est possible de prédire des énergies, des fréquences vibratoires, des structures moléculaires ainsi que des propriétés moléculaires des composés et des réactions dans une large gamme d'environnement chimique. Ce logiciel peut permettre l'étude de composés stables mais aussi l'étude d'espèces

difficile, voire impossible, à observer expérimentalement (comme des intermédiaires de courte durée). Les résultats des calculs sont présentés sous la forme de graphiques par GaussView pour permettre une bonne visualisation. Avec ce logiciel il est possible d'effectuer des calculs à différents niveaux de théorie, un des niveaux de théorie les plus utilisé est B3LYP (Becke 3-Paramètres Lee, Yang, Parr). Pour effectuer les calculs, la plupart des méthodes nécessitent d'entrer un ensemble de bases dans le logiciel. Gaussian est un logiciel aux nombreuses applications. En effet, à l'aide de Gaussian il est possible de prédire les spectres théoriques et faire l'attribution des pics afin de les comparer aux spectres expérimentaux. Le logiciel peut prédire une grande variété de spectres tels que IR, Raman, UV-Vis, RMN et bien d'autre (Frisch et al., 2016).

1.3.3 Simulation d'un réseau de réactions chimiques

Le logiciel Copasi permet de simuler et d'analyser des ensembles de réactions chimiques et leurs cinétiques. C'est un outil efficace pour le développement de modèles de cinétique de réaction, pour la simulation de leur comportement ainsi que l'analyse de leurs propriétés.

Ce logiciel convertit un réseau de réaction en un ensemble d'équations différentielles. Il offre de nombreuses fonctionnalités, par exemple, le nombre d'espèces et de réactions est illimité et il est également possible de sélectionner les vitesses de réaction à partir de fonctions prédefinies ou de les choisir manuellement. Le logiciel permet d'effectuer des balayages de paramètres et des répétitions de simulations. La simulation peut être au cours du temps ou pour des états stables. Il est possible d'obtenir une analyse stoechiométrique du réseau de réactions, une estimation des paramètres, une analyse du contrôle métabolique et bien d'autres. Pour finir, Copasi permet de visualiser les données sous différentes formes. Il est possible d'obtenir des

représentations graphiques de toutes les variables et paramètres du modèle (Hoops et al., 2006).

Les travaux de (Haidasz, Van Kessel, & Pratt, 2016) sur l'étude des réactions d'auto-oxydation des antioxydants piégeurs de radicaux (radical-trapping antioxidants RTA) illustrent bien l'utilisation du logiciel Copasi pour la modélisation de système de réactions radicalaires en chaîne.

1.4 Projet de recherche – Mécanisme et mesures de l'oxydation de matériaux organiques et biologiques

1.4.1 Objectif du projet de recherche

Ce projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes d'autoxydation secondaire des hydroperoxydes qui pendant de nombreuses années ont échappé à une explication satisfaisante. Nous avons décidé d'étudier le mécanisme d'oxydation secondaire des hydroperoxydes plus en détail en utilisant le fluorène comme système modèle pour cette réaction. Dans le mécanisme proposé sur la Figure 1.10, le radical hydroxyle apparaît comme produit de l'auto-oxydation secondaire. Il est important de comprendre la formation des OH[•] car, comme expliqué dans la partie 1.2.3, ce sont des radicaux très réactifs qui peuvent générer une multitude de produits aléatoires difficiles à quantifier dans les systèmes biologiques.

Le but ultime de cette recherche est d'expliquer le mécanisme d'autoxydation pour d'autres matériaux organiques et biologiques tels que les plastiques, caoutchoucs,

aliments, formulations pharmaceutiques, etc. Un exemple spécifique qui fut entamé, mais non présenté dans ce mémoire, est l'étude de l'oxydation du cholestérol. Les produits d'oxydation du cholestérol sont appelés oxystérols et, à la différence du cholestérol, possèdent un ou plusieurs groupes contenant de l'oxygène. Le moindre changement de la structure chimique du cholestérol, même mineur, va conduire à des changements importants dans les propriétés biophysiques des oxystérols qui eux vont entraîner un changement significatif des propriétés et la dynamique des bicouches lipidiques. C'est pour cela qu'il est d'une importance majeure de pouvoir comprendre en détail ces mécanismes d'oxydation (Kulig, Cwiklik, Jurkiewicz, Rog, & Vattulainen, 2016).

Pour notre système modèle d'auto-oxydation du fluorène, le mécanisme qui est étudié peut être résumé par la Figure 1.10. Quoique ce mécanisme semble spécifique à une molécule, les encadrés démontrent que toutes molécules de type RH_2 avec liaisons relativement faibles pourraient suivre ce mode réactionnel.

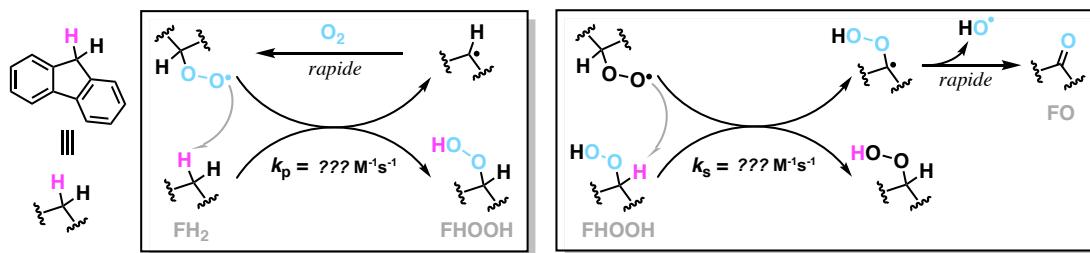


Figure 1.10. Mécanisme proposé pour l'auto-oxydation du fluorène, oxydation primaire (gauche) et secondaire (droite).

1.4.2 Suivi de la formation des produits de l'oxydation

Pour faire l'étude du mécanisme proposé, la formation des espèces OH[•], FO et FHOOH est suivi par GC-MS et UV-vis au cours du temps. Afin de pouvoir suivre la concentration de ces espèces, une expérience a été mise au point, répondant aux difficultés rencontrées. La réaction se produit à 37° et sous agitation pendant 100h.

La première difficulté rencontrée dans cette expérience est le fait que les radicaux hydroxyles ne sont pas observables par GC-MS, c'est pour cela que le choix du solvant a été très important. Le benzène est un solvant qui est inerte à la plupart des radicaux libres, y compris les radicaux peroxydes, mais il n'est pas inerte au radical hydroxyle (Frenette, 2008). Le benzène est donc utilisé comme solvant pour la réaction d'oxydation. En effet le radical hydroxyle va réagir avec le benzène, présenté dans la Figure 1.11, pour former le phénol. C'est donc la formation du phénol qui va être observée et quantifiée par GC-MS.

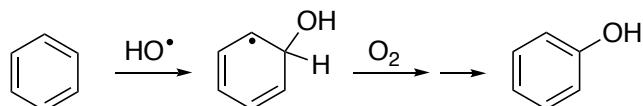


Figure 1.11. Détection de la formation du radical hydroxyle. La réaction du solvant benzène avec le radical hydroxyle en présence d'oxygène va générer le phénol qui peut être quantifié par GC-MS.

Un autre des produits à étudier, le FHOOH, n'est pas stable aux températures élevées du GC-MS. Pour parer à cela, Ph₃P a été ajouté aux échantillons avant l'analyse. Cette

espèce fut ajoutée pour deux raisons. Tout d'abord Ph_3P va réagir avec FHOOH pour former FHOH qui lui est stable durant l'analyse par GC-MS. Pour suivre la concentration de FHOOH il suffit donc de suivre la concentration de FHOH. De plus le Ph_3P va permettre de stopper les réactions d'initiations qui partent de l'espèce hydroperoxyde telle que celle décrite ici dans la Figure 1.12.

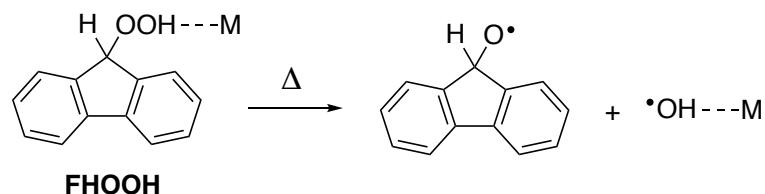


Figure 1.12. Réactions d'initiations d'un hydroperoxyde avec une molécule M.

Le BHT est également ajouté à la réaction, jouant le rôle d'antioxydant et empêchant la réaction suivante de se produire : $\text{FHOO}^\bullet + \text{FH}_2 \rightarrow \text{FHOH} + \text{FH}^\bullet$

Le BHT va réagir avec le radical hydroperoxyde, Figure 1.13. Ainsi la quantité de FHOOH détectée correspond aux produits de la réaction principale avec un contrôle du temps.

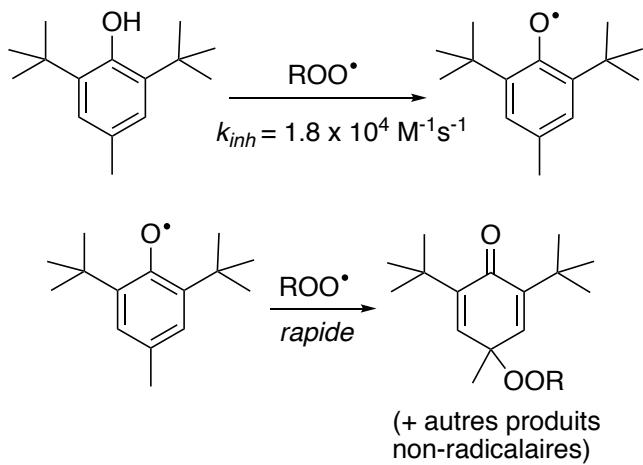


Figure 1.13. Action antioxydante du BHT contre les radicaux peroxyles ROO^\bullet
(Barclay et al., 1997)

1.4.3 Modélisation cinétique de la réaction et calculs DFT

À l'aide du logiciel de modélisation Copasi (copasi.org, (Hoops et al., 2006) la modélisation cinétique du mécanisme proposé a été obtenue à partir des réactions présentées sur la Figure 1.14. L'estimation des paramètres entrés dans le logiciel est la suivante : la constante de vitesse d'initiation (éq 1) a été fixée à $3.12 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, (Van Hook & Tobolsky, 1958) tandis que les constantes de propagation (éq 2) est permise de prendre les valeurs entre 1 et $41 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la constante pour l'oxydation secondaire (éq 3) peut prendre les valeurs entre 1 et $100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et pour finir la constante de terminaison (éq 4) peut prendre les valeurs de $(2$ à $4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

# ^	Name	Reaction	Rate Law
1	Initiation 1	AIBN -> 1.3 * FHOO	Mass action (irreversible)
2	Propagation	FHOO + FH2 -> FHOOH + FHOO	Mass action (irreversible)
3	Secondary Oxidation	FHOO + FHOOH -> FHOOH + FO + 0.2 * PhOH + FHOO	Mass action (irreversible)
4	Termination	2 * FHOO -> FHOOH + FO	Mass action (irreversible)

Figure 1.14. Réactions utilisées dans la modélisation cinétique telle qu’implémentée par le logiciel Copasi.

Par la suite, les données expérimentales, recueillies par le GC-MS ainsi que par le spectrophotomètre UV-Vis, ont été entrées dans le logiciel afin d’obtenir un graphique présentant les données expérimentales pour chaque espèce à étudier accompagnées de leur fitting théorique.

Les constantes de vitesse k_p , k_s et k_t (correspondant aux étapes 2, 3 et 4 dans le modèle de la Figure 1.14) ont également été déterminées à l’aide du logiciel.

Les barrières d’énergies nécessaires pour l’oxydation primaire et secondaire ont été calculées à l’aide de modèles de chimie quantique avec le logiciel Gaussian 16 (Frisch et al., 2016). Les calculs ont été effectués au niveau de théorie B3LYP/6-311+G(2d,2p) avec une approximation CPCM pour le solvant benzène. Ces calculs ont permis d’obtenir la géométrie optimale, d’énergie la plus basse, de toutes les molécules impliquées dans le mécanisme ainsi que leur énergie libre de Gibbs totale et leur enthalpie totale. Ces calculs ont également permis de déterminer la spontanéité des réactions, en effet on sait que si le ΔG (différence d’énergie libre entre les produits et les réactifs) est négatif alors la réaction sera spontanée. La cinétique d’une réaction est liée à la barrière énergétique, ΔG^\ddagger , par l’équation d’Eyring : $k \approx k_b T/h \exp(-\Delta G^\ddagger/RT)$. Il est possible d’expliquer la différence en réactivité pour deux réactions en comparant

leurs valeurs de ΔG^\ddagger . Une plus petite barrière énergétique prédit une constante de vitesse plus rapide. Comme l'expression d'Eyring implique la valeur de ΔG^\ddagger dans son exposant, une petite différence d'énergie d'activation entre deux réactions peut se traduire comme une différence importante dans la distribution des produits observés. Dans ce mémoire, comme dans la littérature, la chimie théorique permet d'expliquer avec plus de certitude beaucoup de mécanismes moléculaires.

CHAPITRE II. ARTICLE :

OXIDATION OF SECONDARY HYDROPEROXYDES VIA α -C-H
ABSTRACTION TO GENERATE HYDROXYL RADICALS: FLUORENE AS A
MODEL SYSTEM

Article soumis au *European Journal of Organic Chemistry*, EJOC-S-20-0172

CONTRIBUTION DE L'AUTEURE PRINCIPALE ET DES COAUTEURS

Mélanie Sollin: Réalisation des expériences, analyse des données, rédaction de l'article

Seyedehsan Hosseiniinasab: Réalisation des expériences, analyse des données préliminaires

Jason Malenfant: Calculs Gaussian

Amaia Lopez de Arbina et Alicia Montulet : Expériences et calculs préliminaires

Mathieu Frenette: Directeur de recherche, conception de l'étude, analyse de données et rédaction de l'article

Résumé

Les molécules organiques avec des liaisons C-H relativement faibles peuvent réagir avec l' O_2 via une réaction radicalaire appelée autoxydation. Les principaux produits de ces réactions induites par les radicaux peroxydes sont les hydroperoxydes, $R_2\text{CHOOH}$. Si l'autoxydation se poursuit, l'oxydation secondaire des hydroperoxydes est connue pour former des cétones, $R_2\text{C=O}$, mais ce mécanisme n'est pas bien caractérisé. Surtout, nous constatons que la formation de cétones produit parallèlement un radical hydroxyle hautement réactif, $\text{HO}\cdot$. Nous pouvons piéger $\text{HO}\cdot$ en utilisant le benzène comme solvant pour former des quantités quantifiables de phénol. Le fluorène a été choisi comme système modèle pour étudier cette oxydation secondaire en détail. La modélisation cinétique a permis de mesurer des constantes de vitesse pour les réactions d'autoxydation primaire et secondaire comme $11,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivement. La modélisation DFT prédit également une oxydation plus rapide pour l'autoxydation secondaire. Cette approche de mesure cinétique et de modélisation pourrait être utilisée pour étudier l'autoxydation des plastiques, des produits pétrochimiques ou des lipides.

Oxidation of Secondary Hydroperoxides via α C-H Abstraction to Form Ketones and Hydroxyl Radicals: Fluorene Autoxidation as a Model System

Mélanie Sollin,^[a] Seyedehsan Hosseininasab,^[a] Jason Malenfant,^[a] Amaia Lopez de Arbina,^[a] Alicia Montulet,^[a] and Mathieu Frenette*^[a]

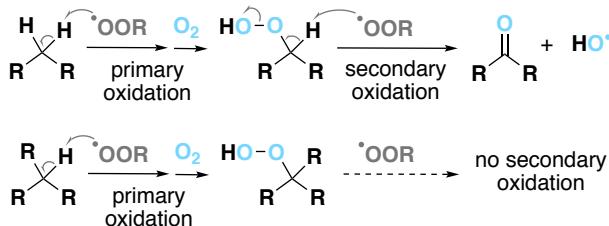
^[a] Department of Chemistry and NanoQAM
Université du Québec à Montréal
Case Postale 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8 Canada
E-mail: frenette.mathieu@uqam.ca

Abstract: Organic and biological molecules with relatively weak C-H bonds can react with O₂ via a free-radical reaction called autoxidation. The primary products of these peroxy radical-driven reactions are hydroperoxides, R₂CHOOH. If autoxidation continues, the secondary oxidation of hydroperoxides is known to form ketones, R₂C=O, but this mechanism is not well characterized. Importantly, we find that ketone formation produces a highly reactive hydroxyl radical, HO[•]. We can trap HO[•] using benzene as a solvent to form quantifiable amounts of phenol. Fluorene was chosen as a model system to study this secondary oxidation in great detail. Kinetic modeling allowed the measurement of rate constants for the primary and secondary autoxidation reactions as 11.3 M⁻¹s⁻¹ and 25 M⁻¹s⁻¹, respectively. DFT modeling likewise predicts a faster oxidation for the secondary autoxidation. This kinetic measurement and modeling approach could be used to study the autoxidation of plastics, petrochemicals, or lipids.

Introduction

Given the opportunity, oxygen gas will favorably oxidize most organic compounds. This initial opportunity can be a free radical chain reaction in which weak C-H bonds transform into hydroperoxides (ROOH).¹ Peroxidation of this type is conducted on megaton scale per year with cumene, cyclohexane and ethyl benzene as reagents.² In biological systems, the activation of oxygen via free radical chain reactions also takes place, however, the net chemical change moves towards degradation products. Most notably, unsaturated lipids will undergo peroxidation reactions to form a variety of lipid-derived hydroperoxides. As the oxidation progresses, hydroperoxides are known to generate electrophilic ketones that can attach to proteins and DNA, however, the exact mechanism for their formation is still a subject of active research.³

The secondary oxidation of hydroperoxides into ketones can occur if an α C-H bond can be abstracted (Scheme 2.1). This explains why secondary hydroperoxides, such as those derived from alkyl ethers, can be explosive, whereas tertiary hydroperoxides that do not have this α C-H bond, such as tert-butyl hydroperoxide, are much more stable. To better understand the transformation of hydroperoxides into ketones, we developed a protocol to measure rate constants for the α C-H abstraction reaction and offer evidence for the evolution of hydroxyl radicals (HO•).



Scheme 2.1. Autoxidation reactions of weak C-H bonds will yield hydroperoxides. If an alkyl hydroperoxide contains an α C-H bond (top reaction), a secondary oxidation can form a ketone and hydroxyl radical.

We chose fluorene (**FH₂**) as a model system to study the oxidation of secondary hydroperoxides. Fluorene-based compounds find applications in electronic devices, conductive and responsive polymers, photochemical sensors⁴ and their autoxidation is of concern in the stability of devices. This motivated us to understand the mechanism of fluorene oxidation reactions and the products formed. The autoxidation product, the 9-fluorenone (**FO**), also found applications in solar cells and thin film transistor due to its planar structure, high thermal stability and good electron-transport.⁵ Fluorene was also chosen since it is a well-behaved system that will not undergo further oxidation reactions beyond these two steps: peroxidation and α C-H abstraction.⁶

The α C-H abstraction mechanism was previously used to explain the formation of ketones in lipid peroxidation reactions, however rate constants were not obtained in this previous study.¹⁰ We believe this type of reaction will be important to explain the formation of ketones in the autoxidation of unsaturated lipids, pharmaceutical formulations, plastics, paint, rubbers, and many secondary carbons with relatively weak C-H bonds.

Results and Discussion

Free radical chemistry, in particular, benefits from the knowledge of rate constants for individual steps in a mechanism. We devised a simple method to obtain rate constants for systems that will undergo primary and secondary autoxidation reactions. While the system under investigation is simple—fluorene (**FH₂**) is autoxidized under air by the well-known radical initiator (**AIBN**)—the overall oxidation reactions are quite complex, as seen in Scheme 2.2. Overall, the reaction progression can be fully explained with the knowledge of 4 rate constants: the azo-initiator rate constant for initiation (k_i), the propagation rate constant for the reaction of a peroxy radical with fluorene (k_p), the rate constant for the α C-H abstraction (k_s) and the termination rate constant where two peroxy radicals recombine to non-radical products (k_t). Howard and Ingold measured values of k_p and k_t for the autoxidation of several hydrocarbons in organic solvents;⁷ for fluorene, their data could establish the ratio of $k_p/(2k_t)^{0.5}$ at 65°C but not their absolute values.⁸ Our experimental design and subsequent kinetic fitting could estimate three rate constants (k_p , k_s and k_t) with k_i fixed to a literature value (*vida infra*).

Our mechanistic studies were significantly enhanced by performing these reactions in benzene as the solvent. Benzene does not react with peroxyradicals (ROO•) but it does react with hydroxyl radicals to form phenol (**PhOH**) in the presence of oxygen.⁹ It then becomes possible to quantify the formation of a highly reactive intermediate, HO•, by simple GC-MS quantification of PhOH. This hydroxyl radical probe was helpful to obtain reliable kinetics for the entire system.

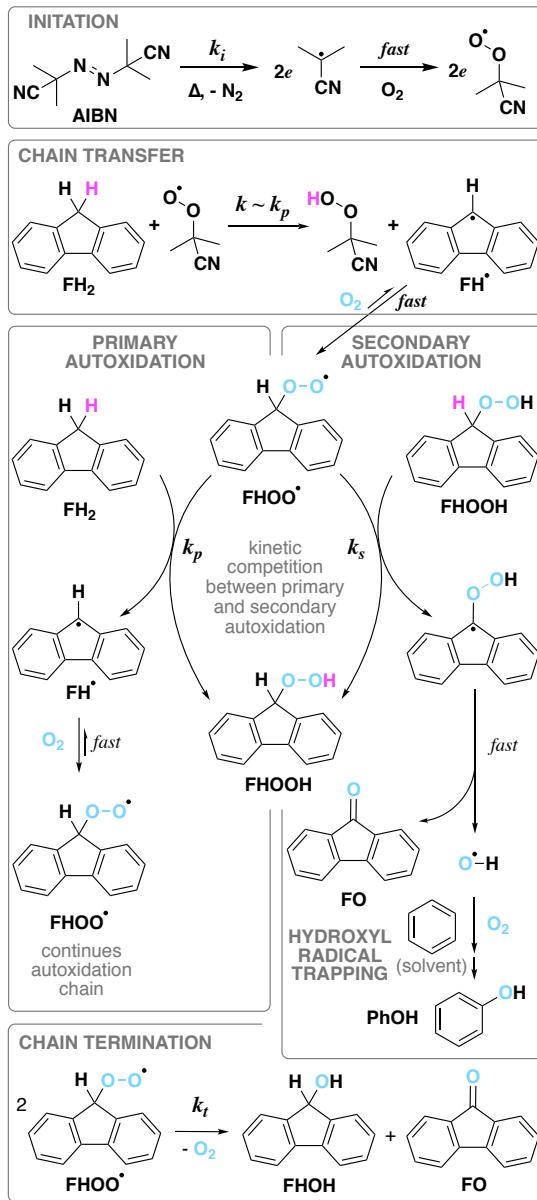
The rate constants could be obtained from a numerically fit kinetic model of 5 independent experiments with varying **FH₂** starting concentrations. The kinetic data was fit with a frozen value of k_i that can be used to estimate the rate of initiation as R_i

$= 2 e k_i$ [AIBN], where the efficiency of radical escape, e , is 0.65¹¹ and k_i can be estimated using $k_i = 1.58 \times 10^{15} \exp(-30.9 \text{ kcal/mol}/RT)$.¹² At 37°C, the value of k_i is therefore $3.12 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

We use the software COPASI which is a numerical solver that can extract rate constants from the time-course evolution of reactant's and/or product's concentrations for a given mechanism.¹³ Based on the working mechanism presented in Scheme 2.2, we could fit the experimental data with three floating variables, k_p , k_s and k_t , for the simplified reactions as listed in Scheme 2.3. This condensed format was used as input for the numerical fitting algorithm.

It should be noted that in our quantification, the hydroperoxide **FHOOH** were reduced to the corresponding alcohol **FHOH** by Ph₃P. Our model will therefore not distinguish between **FHOOH** and **FHOH** as both are quantified as the **FHOH** following reduction. In their studies of cyclohexane and ethyl benzene autoxidation,¹⁴ Hermans et al. chose to inject samples before and after phosphene reduction to quantify the alcohol and hydroperoxide concentrations, however, hydroperoxides can cleave their O-O bond in the GC-MS injector held at 250°C and give compound distributions that do not reflect the sample composition prior to analysis. For this reason, the concentration of **FHOOH** and **FHOH** are not separated in this study.

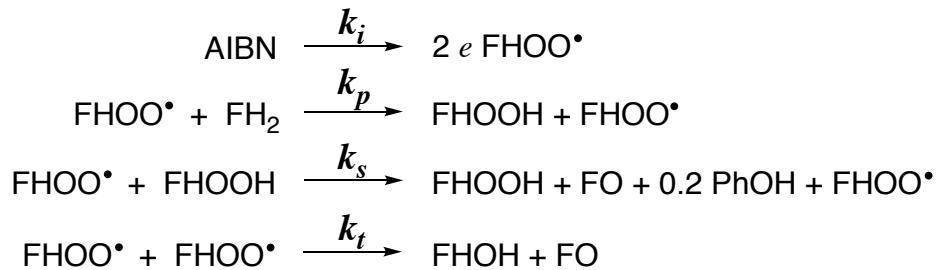
Using pulse radiolysis experiments, the generation of hydroxyl radicals in benzene was estimated to yield phenol at a yield of ~50%,⁹ however, we found it necessary to lower this yield to 20% in our data fitting. The lower yield of phenol per hydroxyl radical generated is likely due to the reaction of HO[·] with **FH₂** or **FHOOH** rather than benzene. The relatively high concentration of **FH₂** will compete with the phenol production pathway. While it is not explicitly shown in the mechanism of Scheme 2.2, there constant k_s . To account for the fact that this step is not a termination step, “+ FHO[·]” was added to the products in the secondary oxidation step corresponding to k_s (Scheme 2.3).



Scheme 2.2. Mechanism for the autoxidation of fluorene (FH_2) in benzene under air initiated by **AIBN**. We were able to model the progression of the entire system using

four rate constants; k_i , k_p , k_t and the rate constant for the proposed α C-H abstraction from **FHOOH**, k_s .

The autoxidation reactions of 0.2 M, 0.35 M, and 0.5 M of **FH₂** were initiated by AIBN (0.05 M) at 37°C under air and the production of **FHOOH**, **FO** and **PhOH** were followed for 100 hours. The experimental data and the overall kinetic fit are presented in Figure 2.1 for initial concentrations of FH₂ of 0.2 M and AIBN of 0.05 M. Raw data, kinetic fit and extracted rate constants for 4 other independent experiments are presented in the supporting information.



Scheme 2.3. Simplified mechanistic model used for numerical fitting for the autoxidation of fluorene (**FH₂**) in benzene under air initiated by **AIBN**.

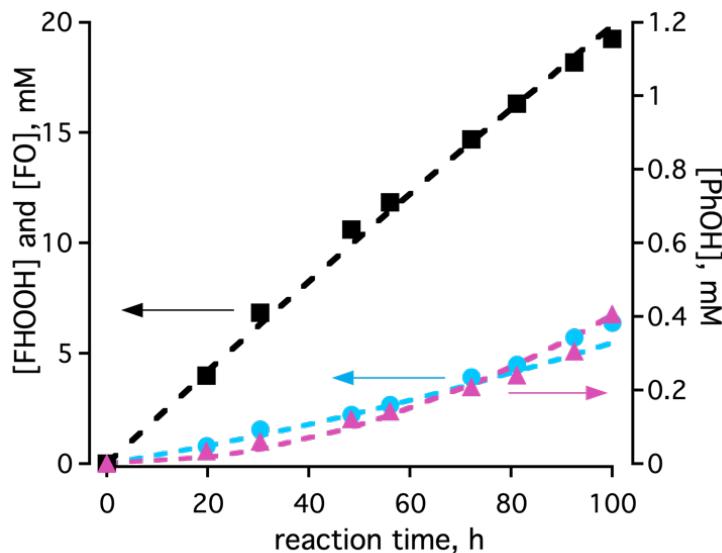


Figure 2.1. Experimental data and global kinetic fitting (dashed lines) for the concentration of FHOOH (black squares, measured as FHOH after Ph₃P reduction), FO (blue circles, left y-axis) and PhOH (pink triangles, right y-axis) as a function of reaction time. Reaction conditions: 37°C under air in benzene, initial concentrations of FH₂ = 0.2 M and AIBN = 0.05 M. The kinetic fit of this data and 4 other unique experiments gave these values for the rate constants shown in Scheme 2.2: k_p = 11.3 M⁻¹s⁻¹, k_s ≈ 25 M⁻¹s⁻¹ and k_t = 2.69 × 10⁷ M⁻¹s⁻¹.

Good fits were obtained for each individual experiment, but the kinetic modeling protocol is quite sensitive to small experimental variations. We could still obtain estimates for the three rate constants that define the entire autoxidation of fluorene under air. We found k_p to be 11.3 ± 1.5 M⁻¹s⁻¹, k_s to be about twice as fast, 25 ± 9 M⁻¹s⁻¹, and k_t to be (2.69 ± 0.07) × 10⁷ M⁻¹s⁻¹.

The chain length for the autoxidation of fluorene can be calculated as the number of products formed per radical initiated. The rate of radicals initiated can be obtained from 2e k_i [AIBN], while the rate of product formed is the slope for the growth of **FHOOH** vs time as shown in Figure 2.1. We obtain rather small values of chain lengths for this autoxidation reactions. For initial concentrations of **FH₂** of 0.2 M, 0.35 M and 0.5 M, the chain lengths were approximately 2.7, 3.4 and 4.3, respectively. The relatively high rate of initiation under our reaction conditions will force more termination reactions and lower the radical chain length. Longer chain lengths would be possible with higher initial concentrations of **FH₂**, but solubility can become an issue. If the chain lengths were long (>10), there would be a better overlap for the growth curves of **FO** and **PhOH** as we attempted to show in Figure 2.1 (blue and pink trace). With small chain lengths, some **FO** is created from radical termination reactions and not entirely from the αC-H abstraction. **PhOH** on the other hand is only created from the αC-H

abstraction and shows a more pronounced curvature; there will be less product created initially, but it will increase as more **FHOOH** is formed.

While substituted phenols are well known antioxidants, **PhOH** did not inhibit the peroxidation reactions in our system. Kinetic fitting to obtain k_p , k_s and k_t did not change whether **PhOH** was added as a peroxy radical trapping agent—the inhibition rate constant for the reaction between **PhOH** and ROO^\bullet is quite small ($< 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)¹⁵ and at the phenol concentrations in this system, this inhibition can be ignored. The numerical fitting values for rate constants k_p , k_s and k_t were not affected by the inclusion of an antioxidant inhibition step by phenol.

DFT Calculations

Density Functional Theory has been very useful to calculate reaction thermodynamics of a proposed mechanism, in particular in the study of autoxidation reactions.¹⁶ In Figure 2.2, we show the energy barriers for the two competing reactions in this study: the primary and secondary C-H abstraction from **FH₂** and **FHOOH** that correspond to rate constants k_p and k_s , respectively. As expected from the experimental values, the kinetic barrier for the primary oxidation is slightly higher than that of the secondary oxidation reaction: $\Delta G^\ddagger = 22.9$ and 22.3 kcal/mol for the primary and secondary oxidation reactions, respectively (Figure 2.2). These results were obtained using B3LYP/6-311++g(2d,2p) in a CPCM solvent model calibrated to resemble benzene. As was noted previously for the α C-H abstraction of hydroperoxides, the resulting carbon-centred radical will immediately cleave the O-O bond with a highly favorable production of HO^\bullet and **FO** ($\Delta G_{rx} = -44.1$ kcal/mol). The dissociation appears barrierless as can be seen from a distance scan of the breaking O-O bond (see SI).

From the experimental and theoretical data, we can confidently state that the primary H-abstraction reaction from **FH₂** is slower than the secondary H-abstraction (α C-H

abstraction) from **FHOOH**. It is also clear that the secondary oxidation of **FHOOH** explains the generation of hydroxyl radicals in these systems.

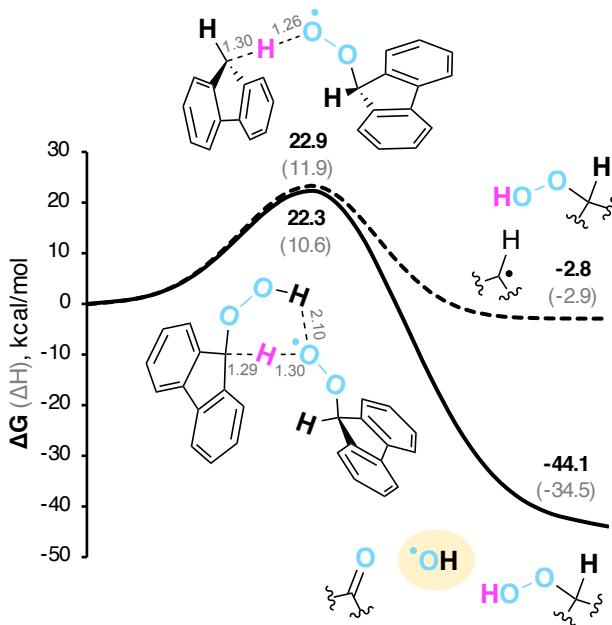


Figure 2.2. DFT-calculated H-abstraction pathway for $\text{FHOO}^\bullet + \text{FH}_2$ (primary oxidation, dashed line) and H-abstraction for $\text{FHOO}^\bullet + \text{FHOOH}$ (secondary oxidation, solid line) using B3LYP/6-311++g(2d,2p)//CPCM(benzene). The graph and the black and bold numbers represent free energy (ΔG , 298K), while the gray numbers in parenthesis represent enthalpy (ΔH , 298K).

Conclusion

Autoxidation reactions of compounds with relatively weak C-H bonds is of fundamental interest. The main product of this reaction, an alkyl hydroperoxide, can undergo secondary oxidation reactions if the hydroperoxide has an α C-H bond. We

studied both the primary and secondary oxidation reactions in great detail using fluorene as a model system. Importantly, we were able to trap the hydroxyl radical formed during this secondary oxidation step by using benzene as a solvent. Benzene is inert to peroxy radicals, but will react with hydroxyl radicals to form phenol which can be quantified by GC-MS. The bimolecular rate constant for the C-H abstraction of fluorene (**FH₂**) by a peroxy radical, k_p , is $11.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and the abstraction of the aC-H bond from **FHOOH** has a rate constant k_s of $\sim 25 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Quantum chemical calculations corroborated the faster secondary oxidation reaction as the transition state for this step was slightly lower. The ΔG^\ddagger for the primary and secondary oxidation were found to be 22.9 and 22.3 kcal/mol. The secondary oxidation reaction between a peroxy radical and the aC-H bond of a hydroperoxide will form a ketone and a hydroxyl radical and this reaction has a ΔG_{Rx} of -44.1 kcal/mol for the model system studied. The approach described herein can be used to measure rate constants for α C-H bond abstraction in several autoxidizing systems and will be useful to get a full picture of autoxidation reactions in general.

Experimental Section

Autoxidation. The autoxidation of fluorene was initiated by 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN, Sigma-Aldrich) at an initial concentration of 0.05 M. The initial concentrations for fluorene (Sigma-Aldrich, purified by recrystallization) were 0.2 M, 0.35 M or 0.5 M. Reactions were kept at 37°C and shaken at 160 rpm for 100 hours. To allow the oxygen to enter the reactor while limiting the evaporation, a long and thin needle was inserted in the plastic cap of the vial. The evaporation was less than 5 % weight loss under these conditions after 100 hours of reactions time. After the reaction was started, an aliquot was taken every $\sim 24\text{h}$ and stabilized/reduced by the

addition of 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol and Ph₃P. Until the analysis, the samples were kept frozen solid at -20°C.

We followed the evolution of three main products during fluorene autoxidation: the primary autoxidation hydroperoxide, measured as 9-hydroxyfluorene (**FHOH**), the secondary autoxidation product 9-fluorenone (**FO**) and the hydroxyl radical indicator, phenol (**PhOH**).

GC-MS. Phenol and 9-hydroxyfluorene were quantified on an Agilent 7890A Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS). Strangely, the retention time for both **FHOH** and **FO** are identical on our GC-MS. We could reliably quantify **FHOH** using the m/z peak at 165, however, **FO** has no unique m/z peaks—its concentration needed to be quantified using UV-vis absorption. Phenol was quantified via the extracted ion chromatogram at 94 m/z.

UV-vis Spectroscopy. 9-fluorenone (**FO**) was quantified by absorption spectroscopy. The sample taken as aliquots and stabilized by Ph₃P and BHT were diluted 14 times in MeOH before analysis. All the measurements were taken in a black cuvette (4 mm wide and 1 cm pathlength). The quantification was done using a molar absorption coefficient of 0.226 mM⁻¹cm⁻¹ at 400 nm.

Computational Chemistry. The reaction's free energies (ΔG) and the free enthalpy (ΔH) at 298.15K were calculated with using the Gaussian 09 or 16 software¹⁷ at the theory level B3LYP/6-311++G(2d,2p)¹⁸ in an approximation of the benzene solvent using the conductor-like polarizable continuum method (CPCM).

The kinetic study was obtained with the Copasi software (copasi.org), which allowed us to determine the rate constants k_p , k_s and k_t according to the suggested mechanism.

DFT results and structures as well as detailed experimental protocols, results and kinetic fittings are included in the supporting information.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge NSERC for funding in the form of a Discovery Grant to M.F. (RGPIN-2016-06773). We are also grateful to NanoQAM for GC-MS access and to Compute Canada and Gaussian for computational resources.

Keywords: C-H activation • radical reactions • autoxidation • kinetic modelling
• DFT calculations

- [1] Many molecules with C-H bonds weaker than ~90 kcal/mol will undergo free radical autoxidation in air since hydroperoxides have a ROO-H bond of similar strength. See: (a) K. U. Ingold, *Acct. Chem. Res.* 1969, 2, 1-9; (b) K. U. Ingold, D. A. Pratt, *Chem. Rev.* 2014, 114, 9022–9046.
- [2] (a) G. Franz, R.A. Sheldon, *Oxidation*, Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry. Wiley-VCH, Weinheim 2000; (b) S. Bhaduri, D. Mukesh, *Homogeneous catalysis: mechanisms and industrial applications*, John Wiley & Sons, 2014; (c) C. L. Hill, *Activation and functionalization of alkanes*, Wiley, 1989.
- [3] (a) H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free radic. Biol. Med.* 1991, 11, 81-128.; (b) J. Cillard, P. Cillard, *Oleagineux, corps gras, lipides* 2006, 13, 24-29. (c) M. Golizeh, T. Geib, L. Sleno, *Rapid Comm. Mass Spec*, 2016, 30, 1488-1494.
- [4] G. M. Ziarani, R. Moradi, N. Lashgari, H. G. Kruger, *Metal-free synthetic organic dyes*, Elsevier, 2018.
- [5] C. J. Lim, Y. Lei, B. Wu, L. Li, X. Liu, Y. Lu, F. Zhu, B. S. Ong, X. Hu, S.-C. Ng, *Tetrahedron Letters* 2016, 57, 1430-1434.
- [6] N. N. Opembe, Y. C. Son, T. Sriskandakumar, S. L. Suib, *ChemSusChem* 2008, 1, 182-185.

- [7] (a) J. Howard, K. Ingold, Can.J. Chem. 1966, 44, 1119-1130; (b) J. Howard, K. Ingold, Can. J.Chem. 1965, 43, 2729-2736; (c) J. Howard, K. Ingold, Can. J. Chem. 1967, 45, 793-802.
- [8] J. Howard, K. Ingold, Can. J. Chem. 1966, 44, 1119-1130.
- [9] M. N. Schuchmann, C. Sonntag, J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2 1993, 289-297.
- [10] M. Frenette, J. C. Scaiano, J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 9634-9635.
- [11] J. Howard, K. Ingold, Can. J. Chem. 1966, 44, 1119-1130.
- [12] J. Van Hook, A. Tobolsky, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 779-782.
- [13] S. Hoops, S. Sahle, R. Gauges, C. Lee, J. Pahle, N. Simus, M. Singhal, L. Xu, P. Mendes, U. Kummer, Bioinformatics 2006, 22, 3067-3074.
- [14] (a) I. Hermans, T. L. Nguyen, P. A. Jacobs, J. Peeters, ChemPhysChem 2005, 6, 637-645; (b) I. Hermans, J. Peeters, P. A. Jacobs, J. Org. Chem. 2007, 72, 3057-3064.
- [15] R. Amorati, S. Menichetti, E. Mileo, G. F. Pedulli, C. Viglianisi, Chem. Eur. J. 2009, 15, 4402-4410.
- [16] D. Pratt, J. H. Mills, N. A. Porter, J. Am. Chem. Soc. 2003 125, 5801-5810.
- [17] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H. et al., Gaussian 16 Rev. C.01, Wallingford, CT, 2016.
- [18] (a) A. D. Becke, J. Chem. Phys. 1992, 96, 2155-2160; (b) A. D. Becke, J. Chem. Phys. 1993, 98, 5648-5652; (c) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Phys. Rev. B 1998, 785-789.

Entry for the Table of Contents

Almost all organic matter *would* favorably be oxidized by O₂; fortunately, most *won't* because of kinetic barriers. Several compounds with weak C-H bonds readily react with O₂ via a free-radical chain reaction called autoxidation. Using a model system, we show

that the primary oxidation products, hydroperoxides, undergo a faster oxidation via α C-H abstraction to form a ketone and the highly reactive hydroxyl radical, which we trap using benzene.

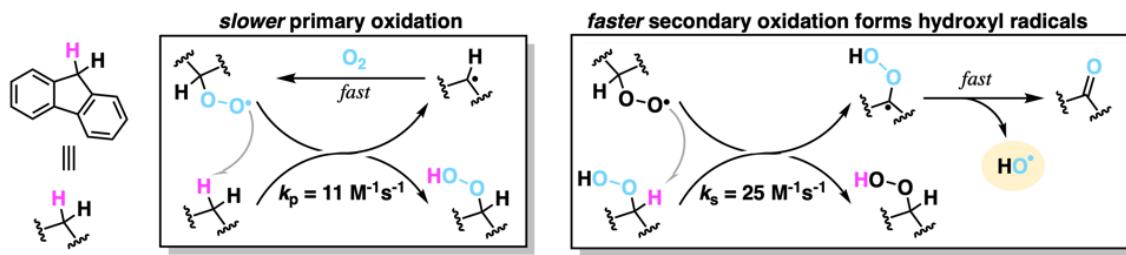


Figure 2.3. Graphical abstract

Institute and/or researcher Twitter usernames: @matfrenette, @thorium999

SUPPORTING INFORMATION**Oxidation of Secondary Hydroperoxides via aC-H Abstraction to Generate
Hydroxyl Radicals: Fluorene Autoxidation as a Model System**

**Mélanie Sollin, Seyedehsan Hosseiniinasab, Jason Malenfant, Amaia Lopez de
Arbina, Mathieu Frenette***

Department of Chemistry and NanoQAM, Université du Québec à Montréal,
Case Postale 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8 Canada
E-mail: frenette.mathieu@uqam.ca

Experimental Details.

The autoxidation of fluorene was done inside a 30 mL vial reactor in 10 mL of solution using HPLC-grade benzene. All autoxidations were initiated by 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) at an initial concentration of 0.05 M. The initial concentrations for fluorene were 0.2 M, 0.35 M and 0.5 M. Reactions were kept at 37°C and shaking at 160 rpm for 100 hours. Fluorene (98%, Sigma-Aldrich) was purified by recrystallization: fluorene and a magnetic stir bar were placed in a 250 mL Erlenmeyer flask with enough ethanol to cover ~ 1 cm above the powder. As the solution was stirred and heated, dichloromethane was added via Pasteur pipette until the solution was clear. As the solution cools and dichloromethane evaporates, fluorene crystals appear, and these were recovered by vacuum filtration.

Importantly, the vials were carefully sealed except for a long needle that protruded from a hard-plastic cap—this needle did not come into contact with the solution (see picture in Figure 2.4). Septa were found to absorb too much benzene and larger openings also caused evaporation that was unacceptably large. With these long needles, evaporation was less than 5 % wt. during the 100-hour experiment and oxygen was replenished during the reaction. The needles were 6-inch long with 20 gauge.

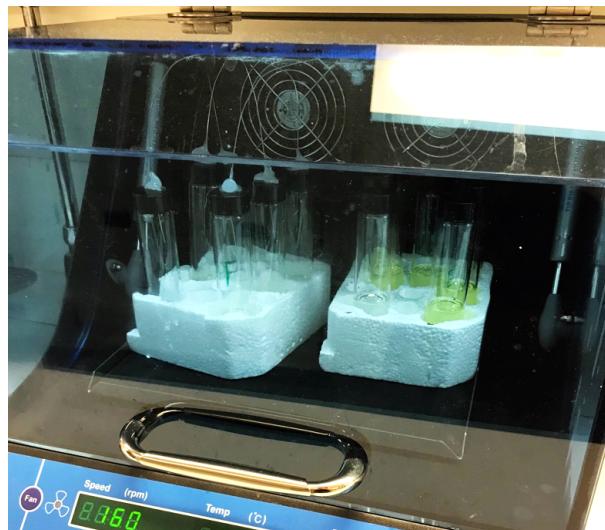


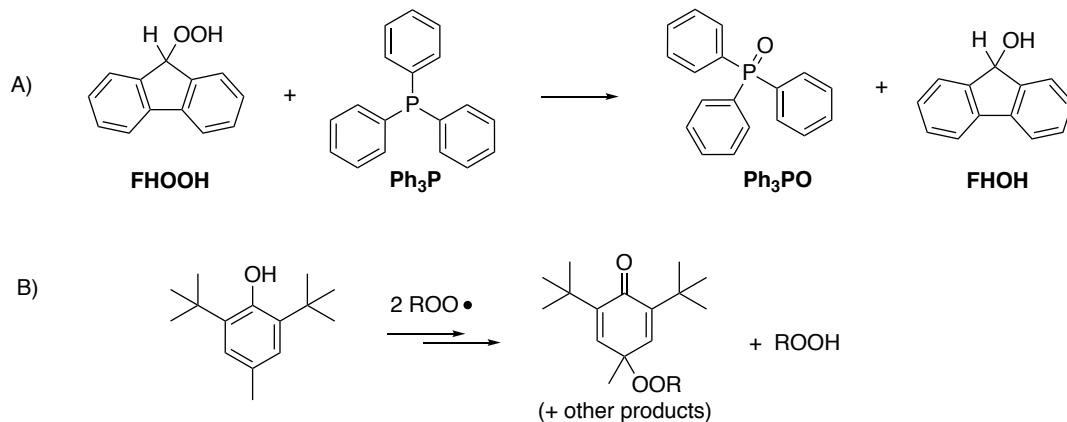
Figure 2.4. Photograph of samples undergoing autoxidation with needles that allow oxygenation of the reaction medium while preventing mass loss via evaporation.

Table 2.1. Experimental design of fluorene oxidation.

Sample	AIBN (M)	Fluorene (M)
<i>sample_1</i>	0.05	0.2
<i>sample_2</i>	0.05	0.2

<i>sample_3</i>	0.05	0.35
<i>sample_4</i>	0.05	0.35
<i>sample_5</i>	0.05	0.5

At various times during the reaction, aliquots of 250 µL from the reaction mixture were quenched with 100 µL of a solution of Ph₃P and 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (0.25 M and 0.2 M, respectively). The solutions were kept in GC-MS vials with insert and stored in a – 20°C freezer until analysis. The Ph₃P was used to quantitatively reduce hydroperoxides into alcohols (**FHOOH** → **FHOH**) according to reaction in Scheme 2.4 (A) and BHT is a chain-breaking antioxidant Scheme 2.4 (B) that will stop further autoxidation reactions. 9-fluorenol (**FHOH**) is quantifiable with GC-MS and in our model this compound was considered to be equal to **FHOOH**.



Scheme 2.4. Ph₃P and BHT are added to the reaction mixture to prevent further oxidation reactions and to reduce hydroperoxides into alcohols that can be quantified by GC-MS.

A key design in our experiment is the use of benzene as a solvent to detect hydroxyl radicals. Benzene will not react with peroxy radical such as FHO[•] but will react with hydroxyl radicals (HO[•]). The reaction of benzene and HO[•] is known to form phenol which can be detected *via* GC-MS.

GC-MS quantification

GC-MS signals were calibrated for the 9-hydroxyfluorene and phenol products according to Table 2 in which different concentrations were used for phenol and 9-hydroxyfluorene, respectively. The concentrations were chosen based on running a initial autoxidation test analysed by GC-MS. Before injecting the sample in the GC-MS the samples were diluted 1.4 times (taking into account the addition of solutions to stop the reaction and dilution with MeOH before injection).

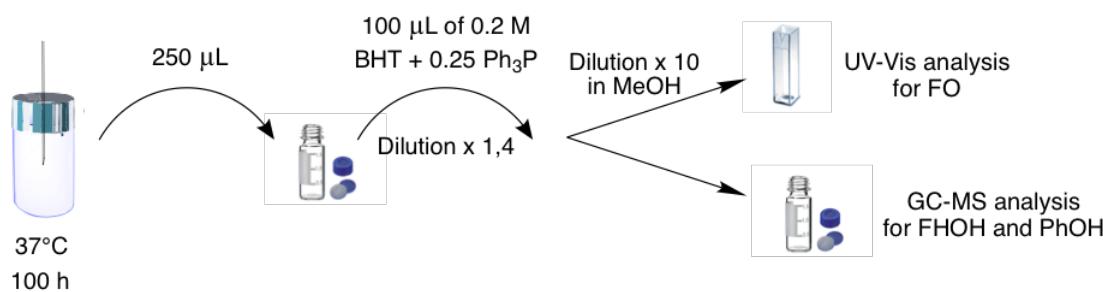


Figure 2.5. Aliquots and dilutions for the quantification of all samples.

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Agilent 7890A) equipped with a 30-meter polysiloxane column was used in order to quantify 9-hydroxyfluorene and

phenol products. For all of the quantifications, a splitless method was used in which the column temperature had an isotherm at 75 °C for 5 min. Further, the column temperature would increase linearly from 75 to 300 °C to reach a total analysis time of 60 min. Helium served in all the experiments as a carrier gas. In between each quantification, the column was cleaned from residual FHOH and other compounds with a blank sample of methanol twice. Benzophenone was initially added as an internal standard during sample dilutions but was not used in our final analysis as it was unfortunately obscured by a co-eluting product in certain samples. Some of the error in our data may be attributed to this omission, however, our calibration curves consistently gave excellent linear correlation in the concentration range studied.

To quantify phenol, we needed to inject concentrations of AIBN, Ph₃P and fluorene that were well beyond the typical concentrations recommended in GC-MS experiments. To limit damage to the MS detector, we only measured MS data after the solvent elution and before the first AIBN peak as well as the region that corresponded to FHOH elution, taking care to avoid FH₂ and Ph₃P. A dedicated injector port was used for our experiments to prevent the contamination of fluorene into the sample measurements that followed our experiments.

A typical GC-MS chromatogram is presented in Figure 2.6. Note that the mass detector was turned off before 4 minutes and between 12-12.5, 15-15.5 and 16-18 minutes to prevent over-saturation of the MS detector.

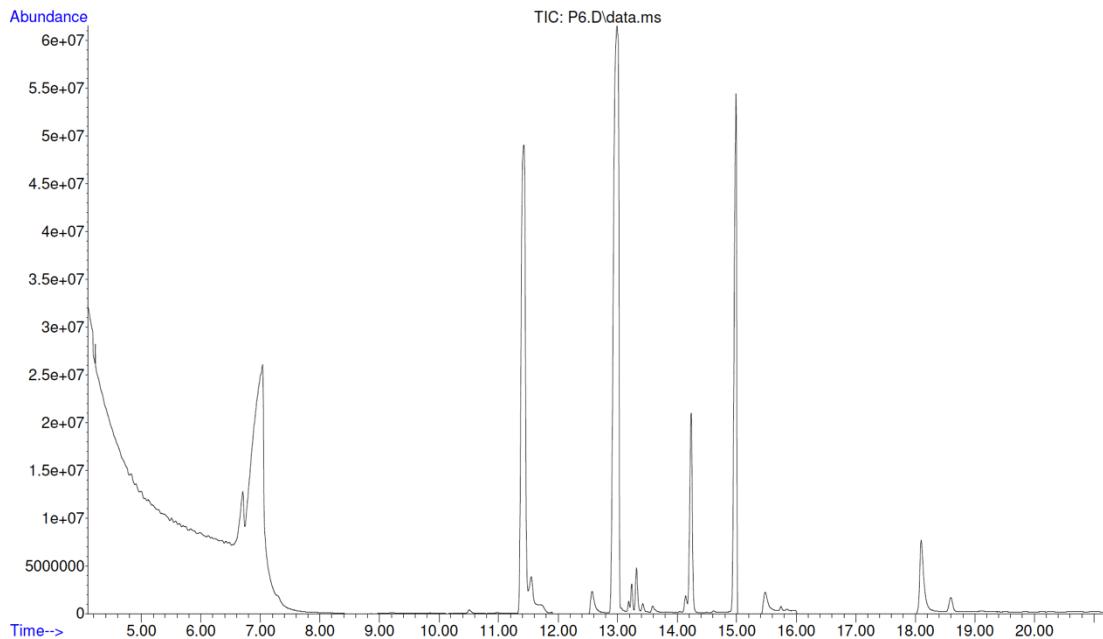


Figure 2.6. Total ion chromatogram of *sample_1* after 7 hours at 37°C.

In the following section, the raw experimental data for each sample are presented. For each sample the data are organized per species for the three studied species (**FO**, **FHOH** and **PhOH**). The experimental data are presented with the fitting obtain with the Copasi software. The rate constants k_p , k_s and k_t were also determined by Copasi.

Since we quantify **FHOOH** after reduction by Ph₃P, the measured concentration of **FHOH** will be the sum of **FHOOH** created during chain reactions and **FHOH** created during termination reactions. This causes a slight error in our kinetic estimates, but the uncertainty largely falls within the experiment-to-experiment variation.

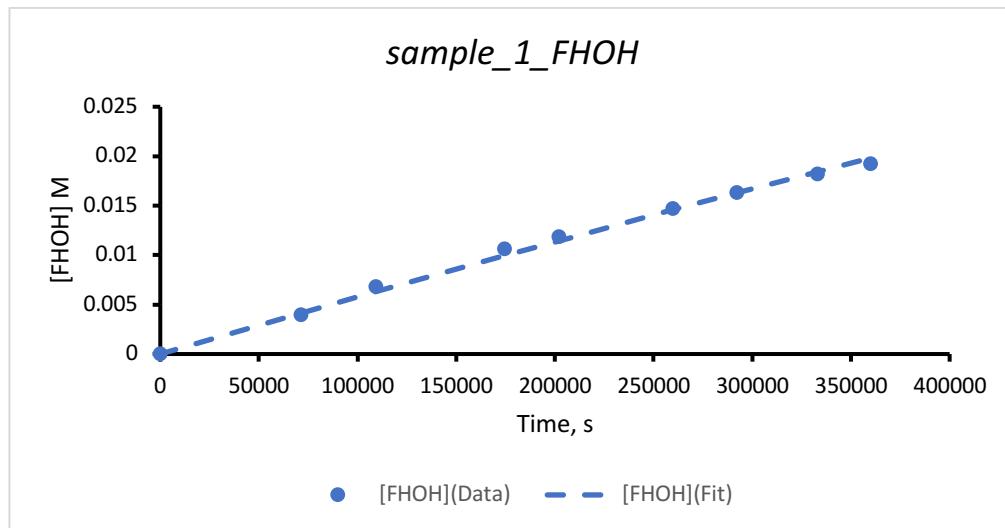
Sample_1:

Figure 2.7. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1

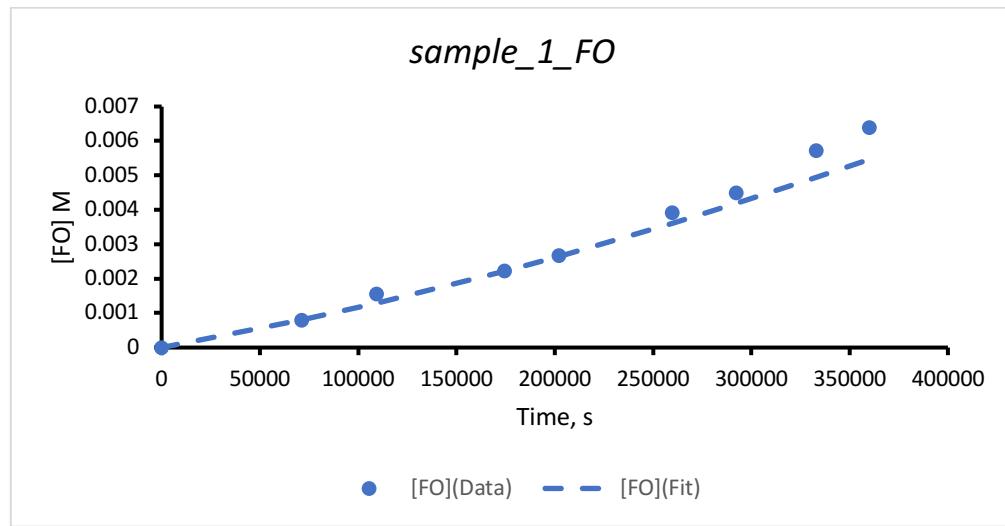


Figure 2.8. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1

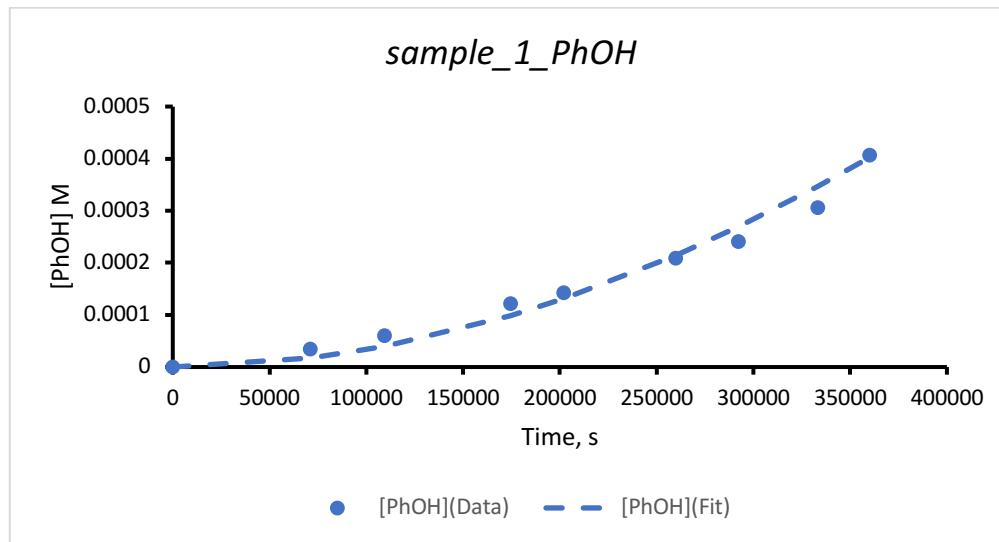


Figure 2.9. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_1

Table 2.2. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_1 for propagation, secondary oxydation and termination steps (k_p , k_s and k_t , respectively)

Rate constants obtained from the Copasi fit (in $M^{-1}s^{-1}$)

Initial concentration 0,2 M Fluorene and 0,05 M AIBN

k_p	k_s	k_t
12,6	29,5	$2,70 \times 10^7$

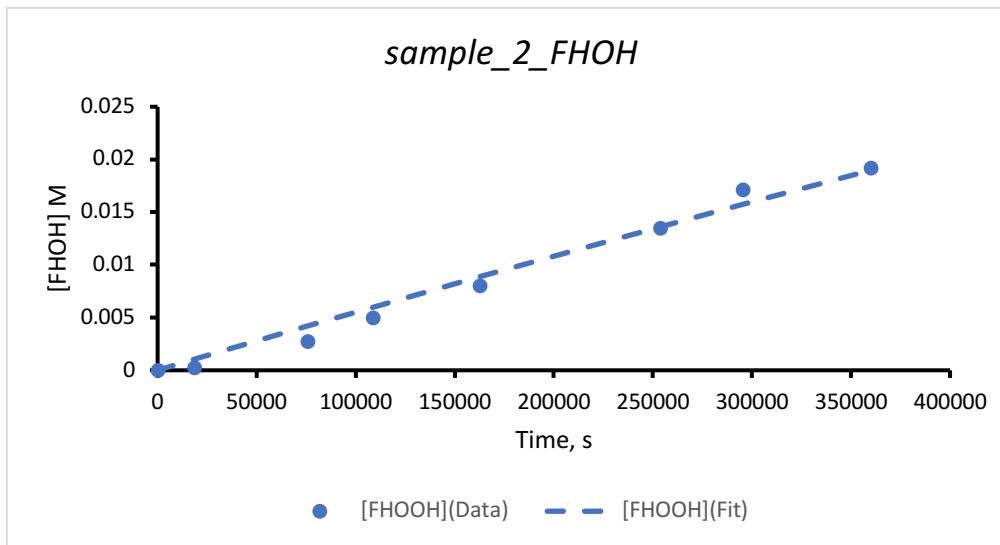
Sample_2:

Figure 2.10. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2

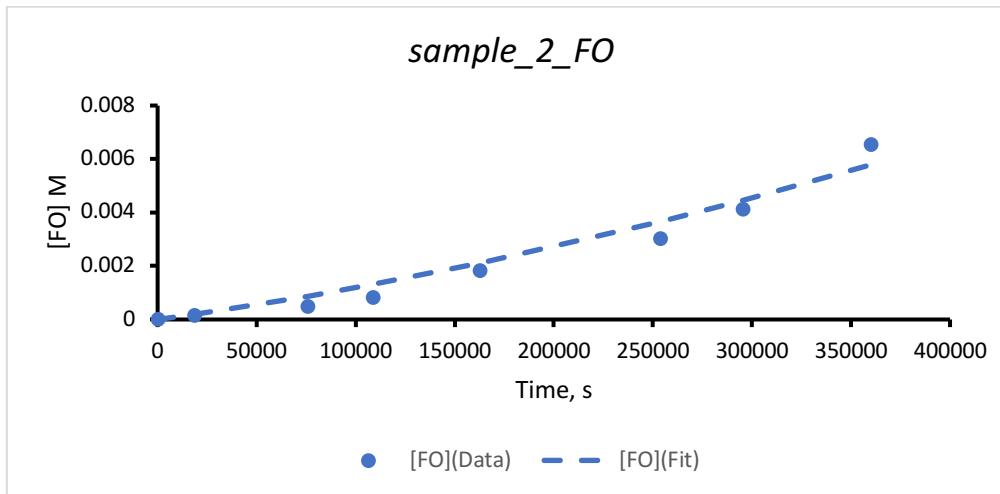


Figure 2.11. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2

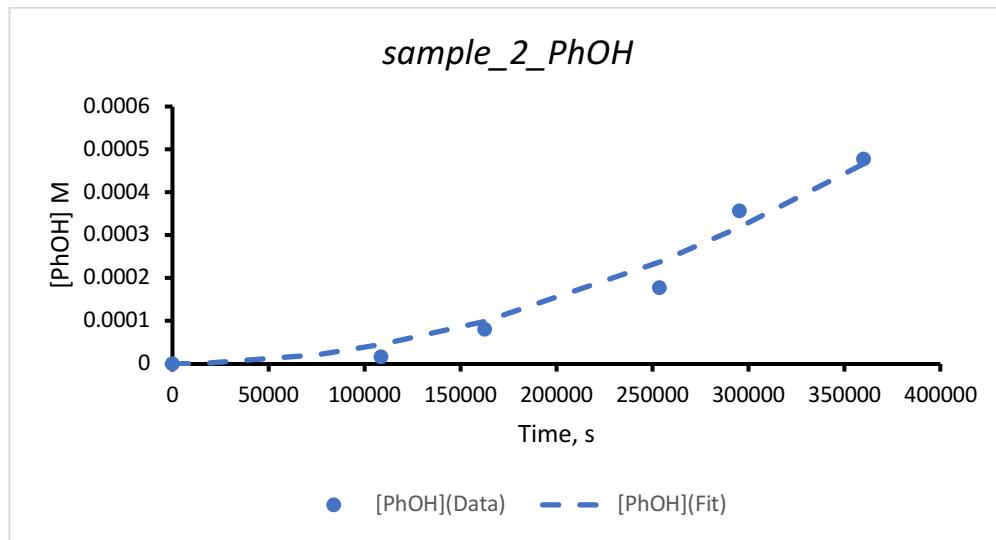


Figure 2.12. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_2

Table 2.3. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_2 for propagation, secondary oxydation and termination steps (k_p , k_s and k_t , respectively)

Rate constants obtained from the Copasi fit (in $M^{-1}s^{-1}$)		
Initial concentration 0,2 M Fluorene and 0,05 M AIBN		
k_p	k_s	k_t
11,9	35,8	$2,70 \times 10^7$

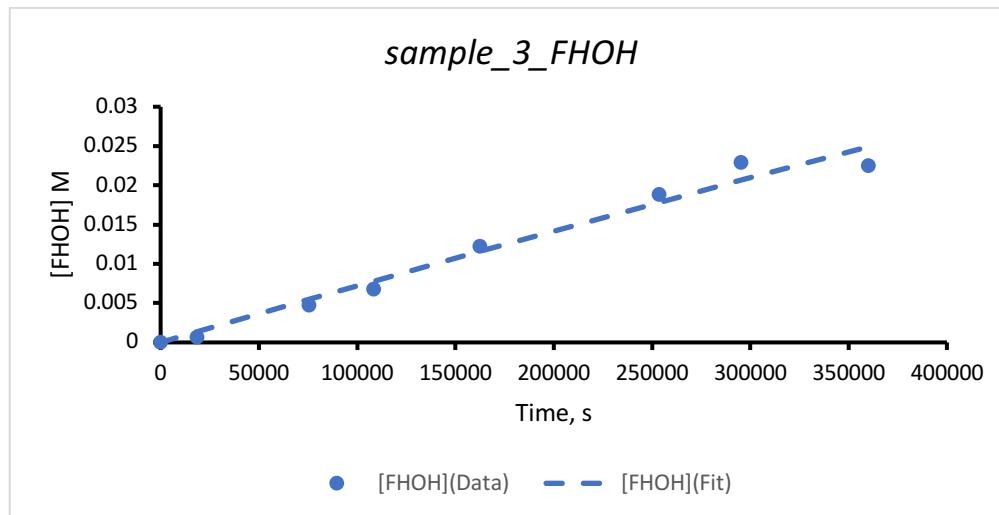
Sample_3:

Figure 2.13. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3

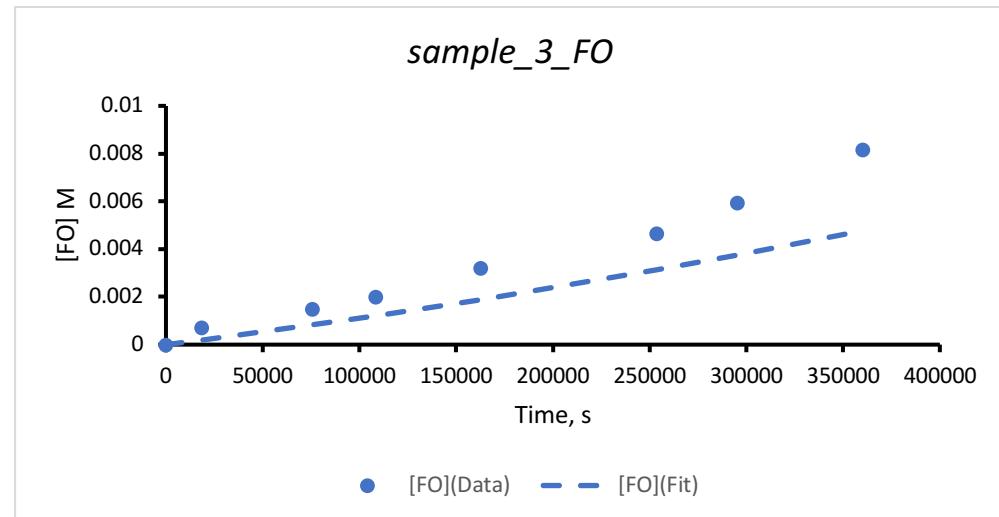


Figure 2.14. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3

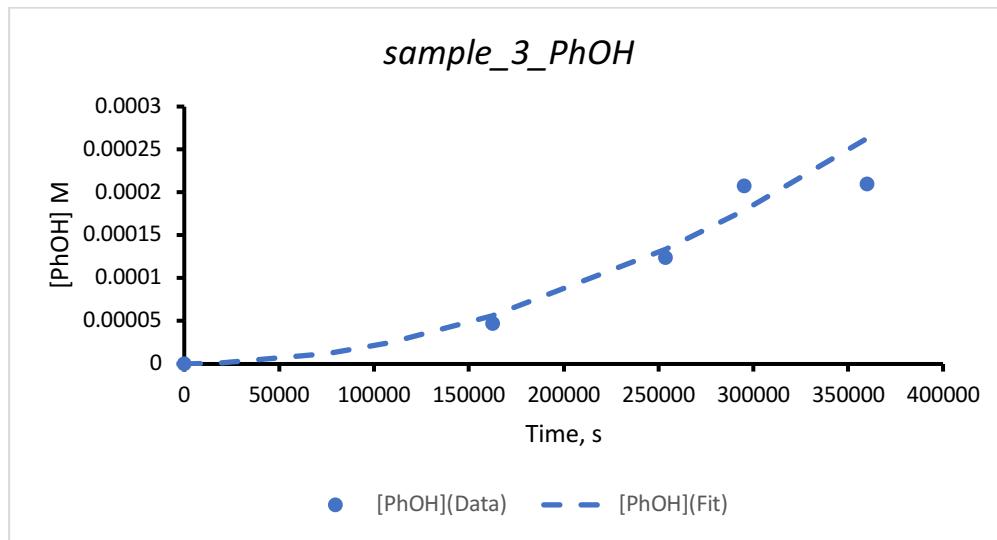


Figure 2.15. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_3

Table 2.4. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_3 for propagation, secondary oxydation and termination steps (k_p , k_s and k_t , respectively)

Rate constants obtained from the Copasi fit (in $M^{-1}s^{-1}$)

Initial concentration 0,35 M Fluorene and 0,05 M AIBN

k_p	k_s	k_t
9,1	15,0	$2,60 \times 10^7$

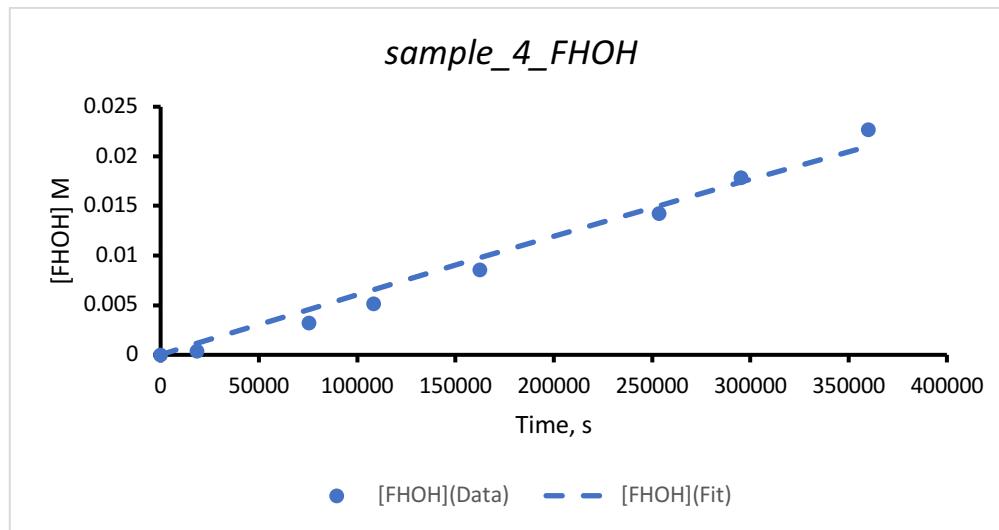
Sample_4:

Figure 2.16. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4

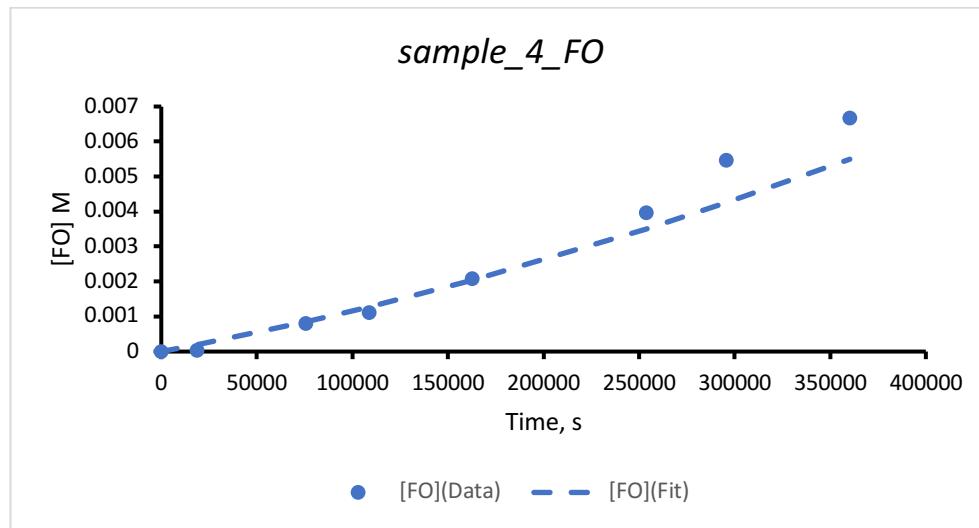


Figure 2.17. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4

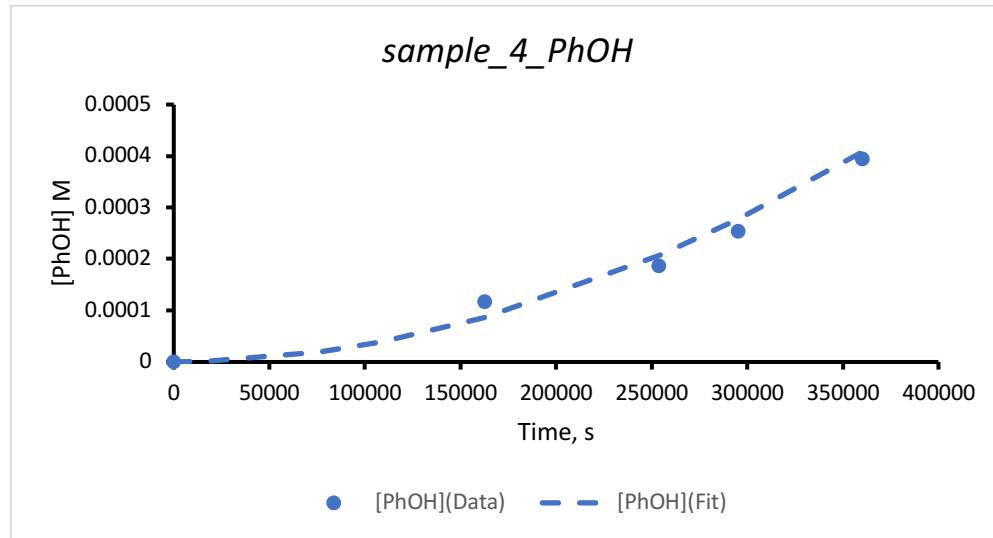


Figure 2.18. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_4

Table 2.5. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_4 for propagation, secondary oxydation and termination steps (k_p , k_s and k_t , respectively)

Rate constants obtained from the Copasi fit (in $M^{-1}s^{-1}$)		
Initial concentration 0,35 M Fluorene and 0,05 M AIBN		
k_p	k_s	k_t
8,1	30,2	$3,07 \times 10^7$

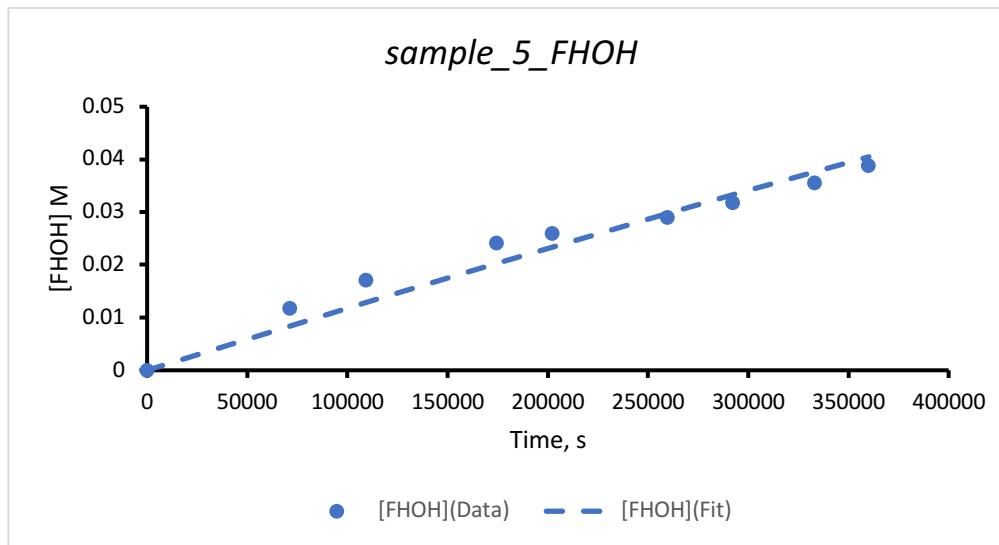
Sample_5:

Figure 2.19. Concentration of FHOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5

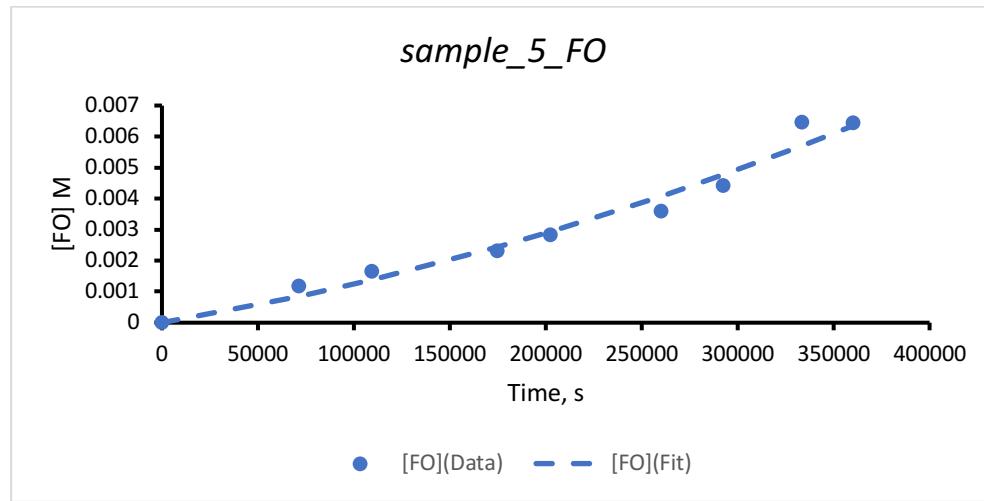


Figure 2.20. Concentration of FO (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5

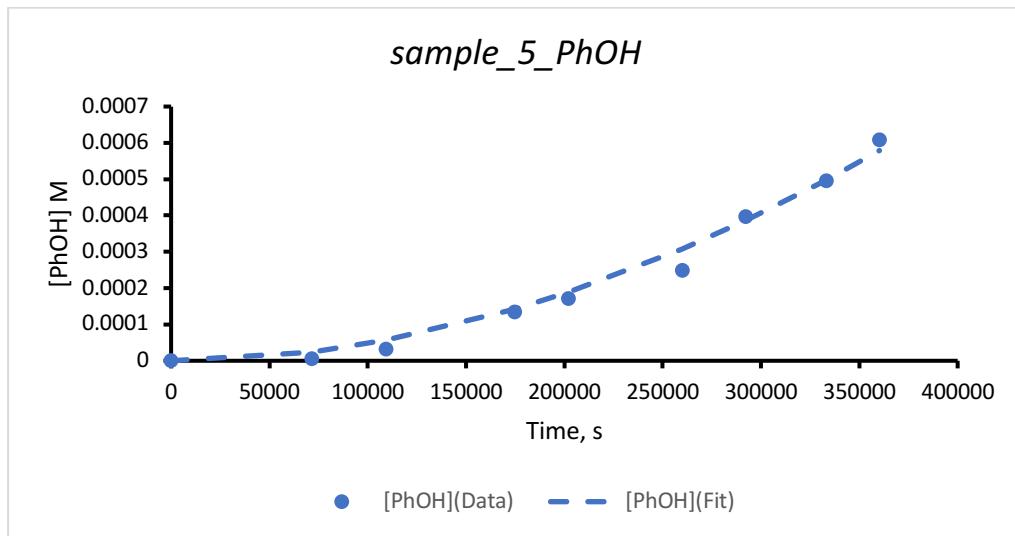


Figure 2.21. Concentration of PhOH (dots) and kinetic modelling (dashed line) as a function of reaction time for sample_5

Table 2.6. Rate constants obtained from the kinetic fitting of sample_5 for propagation, secondary oxydation and termination steps (k_p , k_s and k_t , respectively)

Rate constants obtained from the Copasi fit (in $M^{-1}s^{-1}$)		
Initial concentration 0,5 M Fluorene and 0,05 M AIBN		
k_p	k_s	k_t
11,5	21,1	$2,77 \times 10^7$

Calibration curve.

We followed the evolution of three main products during fluorene autoxidation: *(i)* the primary autoxidation hydroperoxide, measured as 9-hydroxyfluorene (**FHOH**) after Ph_3P reduction, *(ii)* the secondary autoxidation product 9-fluorenone (**FO**) and *(iii)* the hydroxyl radical indicator, phenol.

Phenol and 9-hydroxyfluorene calibration were obtained via Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) whereas 9-fluorenone (**FO**) had to be quantified by UV-visible spectroscopy. Strangely, compounds **FHOH** and **FO** co-eluted on our column. Their mass spectra were quite similar and only **FHOH** could be reliably quantified using the m/z peak at 165 amu.

First, we made a stock solution of 9-fluorenone, 9-hydroxyfluorene and phenol with concentrations of 7.143 mM, 71.428 mM, and 4.76 mM in methanol respectively. Calibration samples were prepared by using different volume fractions of these stock solutions (Figure 2.22 and 2.23). All of the stock solutions contained 71 mM Ph_3P and 57 mM BHT as did the actual samples.

Since two series of experiments were conducted at different times, a different GC-MS calibration curve had to be used for each series. The calibration curves were for series 1 (samples 2, 3, 4) and series 2 (samples 1 and 5) are shown below (Figure 2.23). The UV-vs calibration for **FO** could be reused for both series.

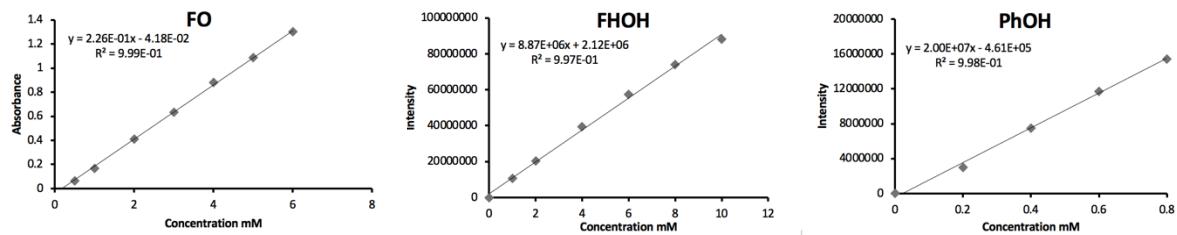


Figure 2.22. Calibration curve for FO (UV-vis), FHOH (GC-MS) and PhOH (GC-MS) used for quantification of experiments in Series 1 (Samples 2, 3 and 4).

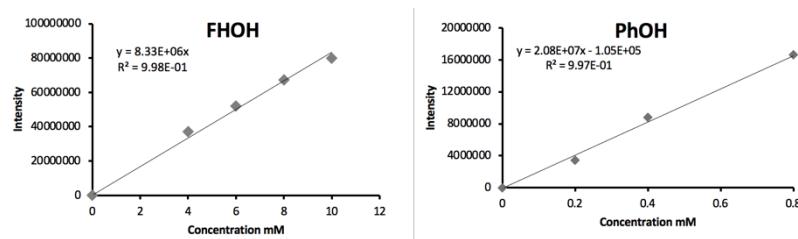


Figure 2.23. Calibration curve for FHOH (GC-MS) and PhOH (GC-MS) used for quantification of experiments in Series 2 (Samples 1 and 5).

UV-Vis.

Since FHOH and FO co-eluted in the GC chromatogram and FO does not have unique m/z peaks, fluorenone (FO) was detected and measured using an Agilent CARY 60 in a spectra range of 190-900 nm. All the measurements were performed in a black-walled cuvette (4 mm wide * 1 cm length) and monitored over time. The molar absorption coefficient epsilon used was $0,226 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ at 400nm as determined by the data in Figure 2.24. The total dilution of the sample for this analysis was 14.

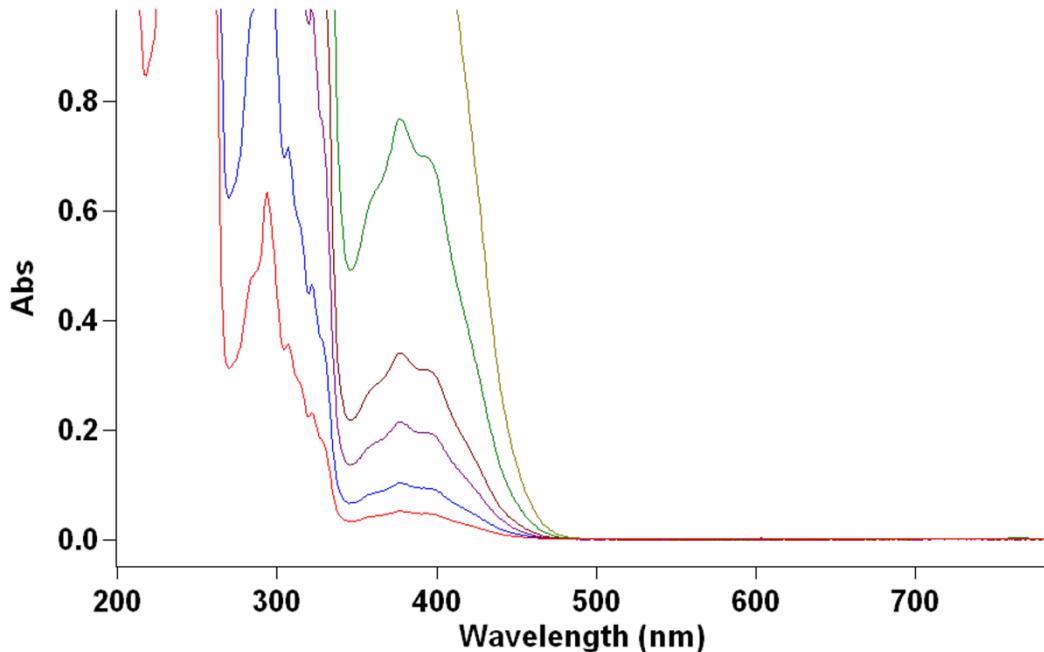


Figure 2.24. UV-Vis spectrum of FO in methanol at increasing concentrations (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mM).

Computational Chemistry.

Computational Methods

Density Functional Theory (DFT) calculations were performed using the Gaussian 09 software* at the B3LYP level of theory which uses Becke's 3-parameter exchange** and Lee, Yang and Parr's correlation function.*** All geometry optimization and frequency calculations used the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) to simulate the benzene solvent.

* Gaussian 09, Revision C.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

** Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J. Chem. Phys.* 1992, 96, 2155-2160; Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* 1993, 98, 5648-5652.

*** Lee, C.; Yang, W.; Parr. R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B.* 1998, 785-789.

Resulting outputs were verified for imaginary frequencies to ensure the optimized structures were local minima for ground states (no imaginary frequency) or saddle points for transition states (one imaginary frequency). Reaction free energies (ΔG) were calculated using the zero-point energy corrected Gibbs free energy at 298.15 K (Sum of Thermal and Free Energies in Gaussian Output), and free enthalpies (ΔH) were calculated using the zero-point energy corrected Enthalpy at 298.15K (Sum of

electronic and thermal Enthalpies in Gaussian Output). Both geometry and frequency calculations were conducted at the B3LYP/6-311++G(2d,2p) level of theory in “benzene solvent”, i.e., CPCM(benzene).

A template input for geometry optimization and frequency calculation for a transition state using B3LYP/6-311++g(2d,2p) is provided below. The initial guess geometry for the transition state is obtained from a relaxed geometry scan of the reaction coordinate. For larger systems, it is more time efficient to optimize at a lower level of theory, e.g., B3LYP/6-31+g(d,p) without CPCM, and use the output geometry as a starting point for the higher-level calculations.

```
%chk=filename.chk

#      opt=(TS,calcall)      freq      ub3lyp/6-31+g(d,p)
scrf=(cpcm,solvent=benzene) geom=connectivity
```

Title Card

[charge] [multiplicity = 1 for most neutral organic compounds (singlet) or 2 for radicals (doublet)]

[Atomic Coordinates from the highest point in a relaxed geometry scan]

[Bonding Information as generated from Gaussview]

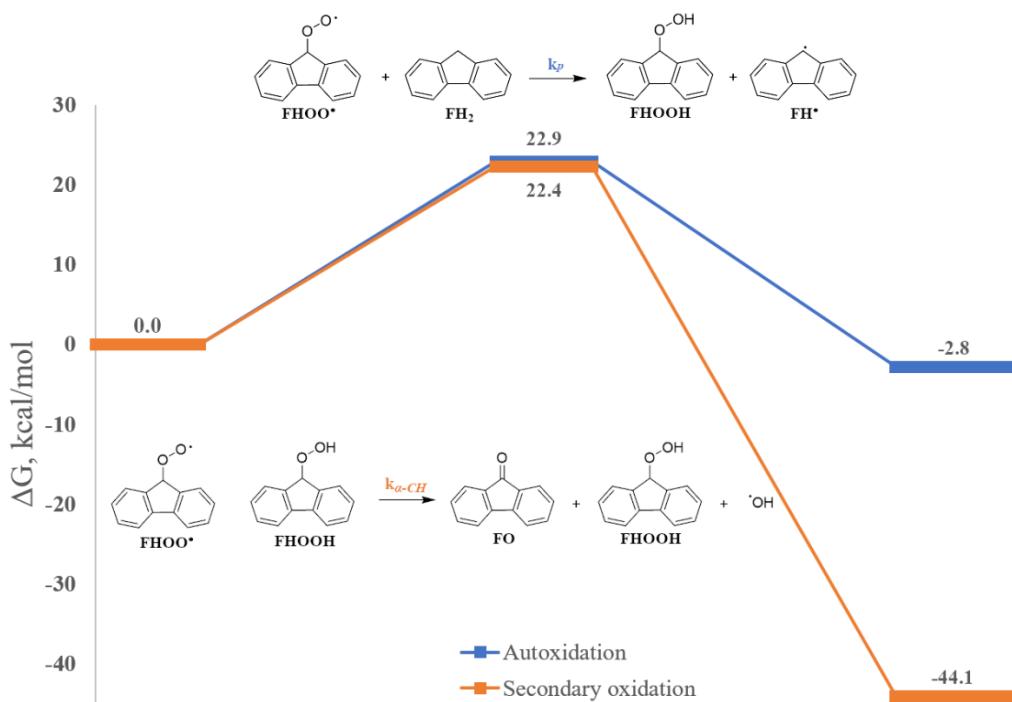


Figure 2.25. Free energy profile of the reactions

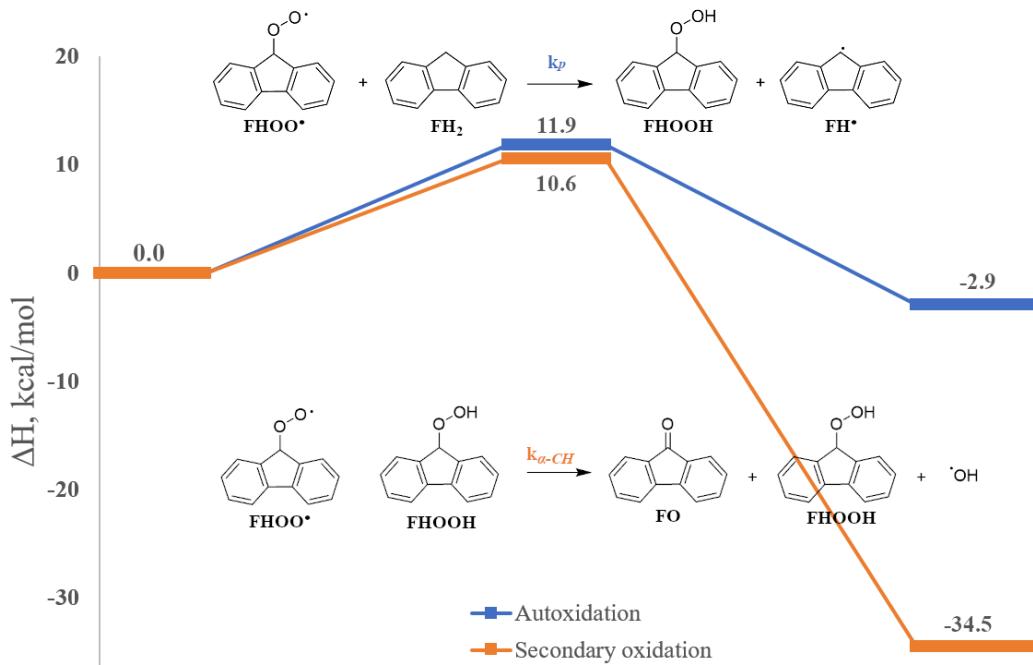
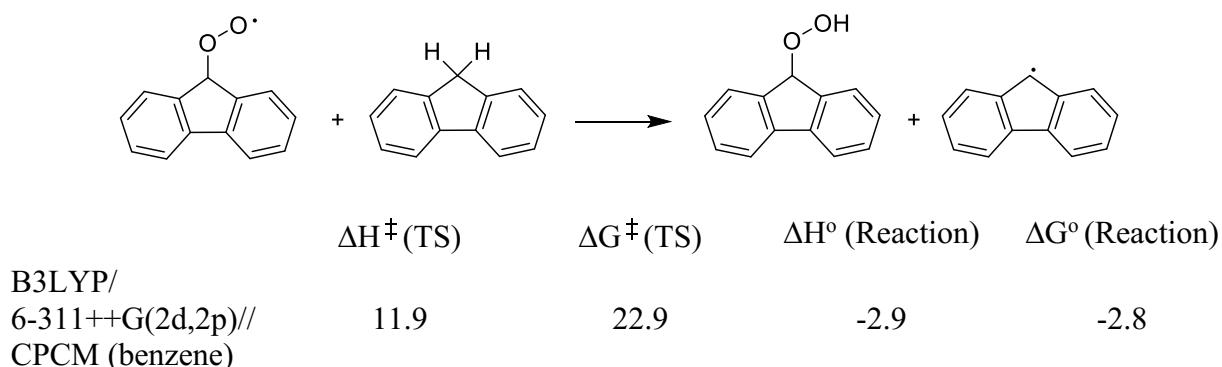
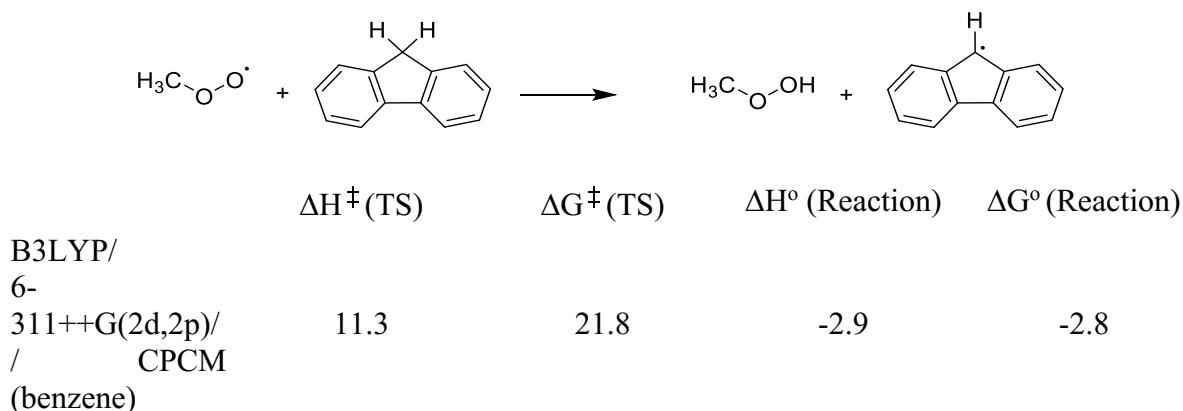


Figure 2.26. Enthalpic profile of the reactions.

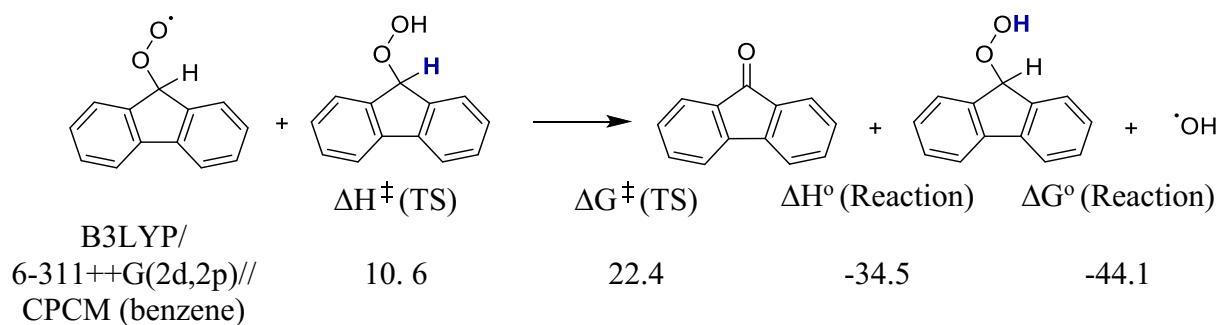
Thermochemical data in kcal/mol at 298 K obtained from B3LYP/6-311++G(2d,2p)//CPCM (benzene) calculations for the reaction **FHOO[•] + FH₂ → [TS] → FHOOH + FH[•]**.



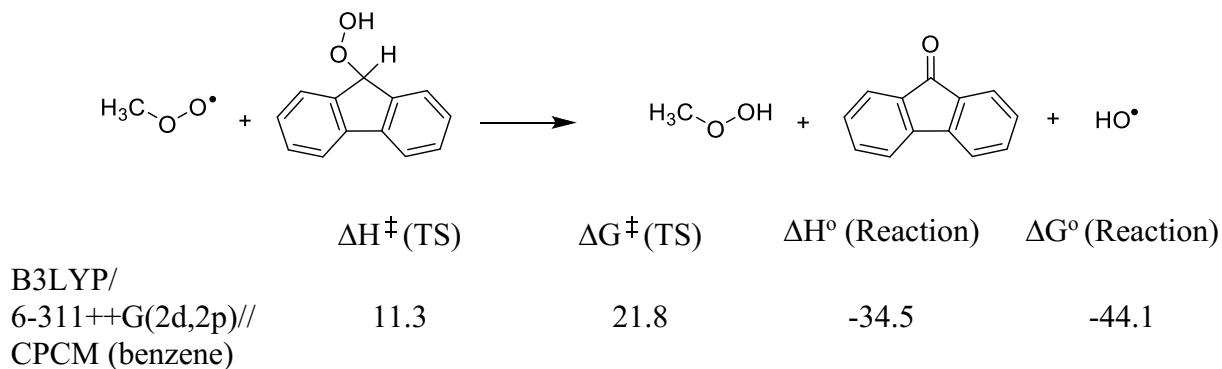
The attacking peroxy radical in computational chemistry is often approximated at $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ in order to minimize the computational cost. The results for the calculation using this approximation are shown in the table below. As can be seen, the results are comparable for the full system and the truncated peroxy radical.



Thermochemical data in kcal/mol at 298 K obtained from B3LYP/6-311++G(2d,2p)//CPCM (benzene) calculations for the reaction $\text{FHOO}^\bullet + \text{FHOOH} \rightarrow [\text{TS}] \rightarrow \text{FHOOH} + \text{F=O} + \text{HO}^\bullet$.



The attacking peroxy radical in computational chemistry is often approximated at $\text{CH}_3\text{OO}^\bullet$ in order to minimize the computational cost. The results for the calculation using this approximation are shown in the table below. As can be seen, the results are comparable for the full system and the truncated peroxy radical.



Energy scan of the interatomic distance between the oxygen of the **FHOOH** species and the hydrogen of the **HCOOH** used as a hydroperoxide substitute for the characterization of the transition state. The relative energies were obtained at the 6-31+(d,p) //CPCM(benzene) level of theory.

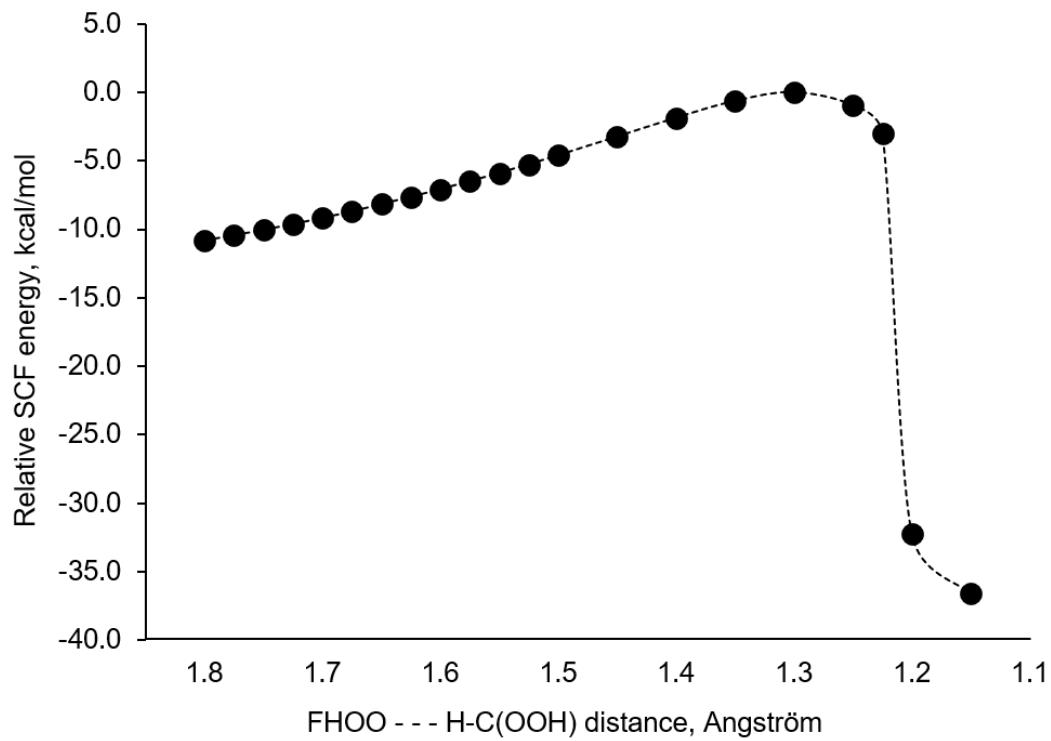


Figure 2.27. Relative SCF energy.

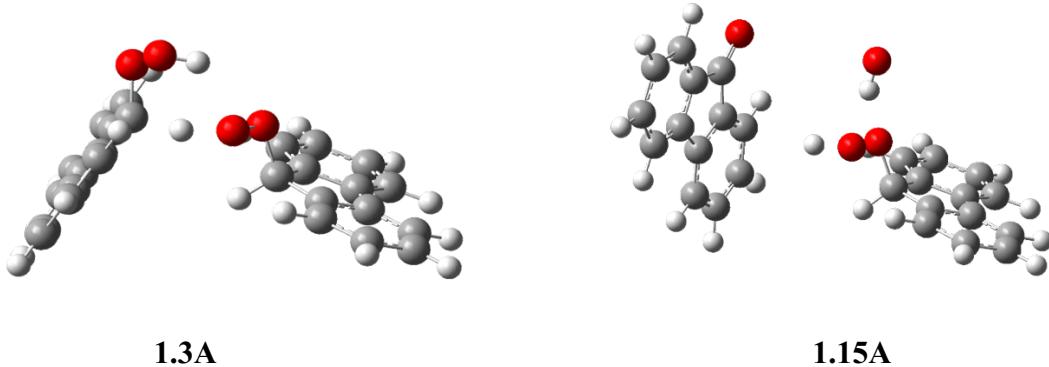


Figure 2.28. Geometries for FHOOH scan at the transition state (1.3 Å), and at minimum scan distance (1.15 Å) showing collapse of the O-O bond.

DFT energies and coordinates for selected compounds as obtained from B3LYP/6-311++G (2d,2p)//CPCM (benzene)

FHOO[•]

Zero-point correction=	0.183267
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.194391
Thermal correction to Enthalpy=	0.195335
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.144796
Sum of electronic and zero-point Energies=	-651.137810
Sum of electronic and thermal Energies=	-651.126685
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-651.125741
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-651.176280

0 2

C	-3.51815000	-0.07575100	-0.08109400
C	-3.18965600	-1.41312200	0.13490300
C	-1.85862200	-1.82792500	0.17385300

C	-0.85908200	-0.87890700	-0.00363200
C	-1.19545500	0.46540400	-0.22917900
C	-2.51560000	0.87785800	-0.26976300
H	-4.55629100	0.22441200	-0.10598400
H	-3.97864700	-2.13941000	0.27413900
H	-1.61719100	-2.86856600	0.34120400
H	-2.77046700	1.91503300	-0.44007400
C	1.16464500	0.26543200	-0.23916300
C	0.60801900	-1.00274800	-0.00784600
C	1.43411000	-2.10627500	0.16905200
C	2.81566500	-1.92216000	0.12228400
C	3.36291700	-0.65968500	-0.10127600
C	2.53498400	0.44929700	-0.28888600
H	1.02110200	-3.09061600	0.34191100
H	3.47180200	-2.77038500	0.26125400
H	4.43663000	-0.53858500	-0.13287500
H	2.95872000	1.42851300	-0.46395700
O	0.11171600	2.32197500	0.64101400
O	0.87214200	3.33915300	0.29443800
C	0.05926800	1.28249800	-0.41342900
H	0.10522200	1.82708800	-1.35418800

FH₂

Zero-point correction=	0.187531
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.196458
Thermal correction to Enthalpy=	0.197402
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.153420
Sum of electronic and zero-point Energies=	-501.378714
Sum of electronic and thermal Energies=	-501.369788
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-501.368843
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-501.412825

0 1

H	-0.00005700	2.48219100	-0.87563100
C	3.00990100	-1.20773900	0.00010800
C	3.45265100	0.11575100	-0.00015600
C	2.53783900	1.16945300	-0.00012800
C	1.18119400	0.88325500	-0.00005700
C	0.73390000	-0.44999000	-0.00003200
C	1.64876800	-1.50093100	0.00022500
H	3.73175400	-2.01309300	0.00028300
H	4.51349900	0.32565100	-0.00037800
H	2.88824700	2.19355400	-0.00046400
H	1.31423100	-2.52973200	0.00042100
C	-0.00003500	1.82783600	0.00007600
C	-1.18122500	0.88328700	-0.00004700
C	-2.53782100	1.16944800	0.00017200
C	-3.45263900	0.11567600	-0.00008000
C	-3.00990400	-1.20776500	-0.00011400
C	-1.64870700	-1.50093200	-0.00002300
C	-0.73391600	-0.44999000	-0.00012400
H	-2.88842600	2.19348800	0.00056900
H	-4.51346600	0.32570400	-0.00021200

H	-3.73173200	-2.01313300	-0.00040000
H	-1.31407100	-2.52969600	0.00005600
H	-0.00001800	2.48090700	0.87683500

FHOOH

Zero-point correction=	0.195242
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.206728
Thermal correction to Enthalpy=	0.207673
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.157635
Sum of electronic and zero-point Energies=	-651.767532
Sum of electronic and thermal Energies=	-651.756046
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-651.755102
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-651.805140

0 1

H	-0.00005700	2.48219100	-0.87563100
C	3.00990100	-1.20773900	0.00010800
C	3.45265100	0.11575100	-0.00015600
C	2.53783900	1.16945300	-0.00012800
C	1.18119400	0.88325500	-0.00005700
C	0.73390000	-0.44999000	-0.00003200
C	1.64876800	-1.50093100	0.00022500
H	3.73175400	-2.01309300	0.00028300
H	4.51349900	0.32565100	-0.00037800
H	2.88824700	2.19355400	-0.00046400
H	1.31423100	-2.52973200	0.00042100
C	-0.00003500	1.82783600	0.00007600
C	-1.18122500	0.88328700	-0.00004700
C	-2.53782100	1.16944800	0.00017200
C	-3.45263900	0.11567600	-0.00008000
C	-3.00990400	-1.20776500	-0.00011400
C	-1.64870700	-1.50093200	-0.00002300
C	-0.73391600	-0.44999000	-0.00012400
H	-2.88842600	2.19348800	0.00056900
H	-4.51346600	0.32570400	-0.00021200

H	-3.73173200	-2.01313300	-0.00040000
H	-1.31407100	-2.52969600	0.00005600
H	-0.00001800	2.48090700	0.87683500

FH[•]

Zero-point correction=	0.174656
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.183451
Thermal correction to Enthalpy=	0.184395
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.140108
Sum of electronic and zero-point Energies=	-500.753874
Sum of electronic and thermal Energies=	-500.745079
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-500.744135
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-500.788422

0 2

H	-2.82024400	0.00005100	0.00000000
C	1.15602700	-0.00010400	3.02874100
C	-0.17688400	-0.00013500	3.44939900
C	-1.21493000	-0.00001400	2.52244000
C	-0.90449200	0.00006100	1.15785500
C	0.46070700	0.00013700	0.73325100
C	1.48179800	0.00007100	1.66663400
H	1.94747300	-0.00018400	3.76549400
H	-0.40173500	-0.00024100	4.50702200
H	-2.24515000	0.00003600	2.85293100
H	2.51941000	0.00016200	1.35998700
C	-1.74107800	0.00003600	0.00000000
C	-0.90449200	0.00006100	-1.15785500
C	-1.21493000	-0.00001400	-2.52244000
C	-0.17688400	-0.00013500	-3.44939900
C	1.15602700	-0.00010400	-3.02874100
C	1.48179800	0.00007100	-1.66663400
C	0.46070700	0.00013700	-0.73325100
H	-2.24515000	0.00003600	-2.85293100
H	-0.40173500	-0.00024100	-4.50702200
H	1.94747300	-0.00018400	-3.76549400

H 2.51941000 0.00016200 -1.35998700

FO

Zero-point correction=	0.169211
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.178773
Thermal correction to Enthalpy=	0.179717
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.134068
Sum of electronic and zero-point Energies=	-575.436032
Sum of electronic and thermal Energies=	-575.426470
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-575.425526
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-575.471175

0 1

C	3.02144900	-1.39089000	0.00007500
C	3.45905200	-0.06810300	-0.00002800
C	2.53500800	0.97965800	-0.00009300
C	1.18825400	0.66568800	-0.00019600
C	0.74117800	-0.66653400	-0.00000200
C	1.65774300	-1.70514300	0.00010300
H	3.74912100	-2.19090400	0.00018300
H	4.51850300	0.14599000	-0.00003500
H	2.85857800	2.01154600	-0.00010900
H	1.33915700	-2.73844200	0.00013500
C	-1.18831800	0.66561000	-0.00003400
C	-2.53506900	0.97971900	-0.00004700
C	-3.45909600	-0.06800900	0.00002300
C	-3.02144800	-1.39082000	0.00001500
C	-1.65780700	-1.70511400	-0.00006000
C	-0.74110700	-0.66652800	0.00000700
H	-2.85837000	2.01167300	-0.00008100
H	-4.51859400	0.14586600	0.00002500
H	-3.74917100	-2.19079300	0.00011000
H	-1.33936700	-2.73846100	-0.00010600

C	-0.00002200	1.57494000	-0.00005600
O	0.00015500	2.78958600	0.00020500

HO[•]

Zero-point correction=	0.008457
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.010817
Thermal correction to Enthalpy=	0.011761
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	-0.008470
Sum of electronic and zero-point Energies=	-75.758444
Sum of electronic and thermal Energies=	-75.756084
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-75.755139
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-75.775371

0 2

O	0.00000000	0.00000000	0.10831100
H	0.00000000	0.00000000	-0.86648900

FHOOH + CH₃OO[•] (TS Proxy)

Zero-point correction=	0.234266
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.250284
Thermal correction to Enthalpy=	0.251228
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.189232
Sum of electronic and zero-point Energies=	-841.997326
Sum of electronic and thermal Energies=	-841.981308
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-841.980363
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-842.042360

0 2

H	-0.63384900	-1.29899200	0.26673800
C	3.77053000	0.40617500	0.81677300
C	3.61834800	-0.89937200	0.35250400
C	2.39674700	-1.33602500	-0.16229700
C	1.34247800	-0.43553900	-0.22137200
C	1.49571500	0.89013900	0.23818500
C	2.71018100	1.31170400	0.76304100
H	4.72264600	0.72235600	1.22011600
H	4.45373700	-1.58411200	0.39704300
H	2.27495100	-2.35017800	-0.51094000
H	2.84278700	2.32605400	1.11407300
C	-0.07463900	-0.61117000	-0.66614800
C	-0.68320200	0.73856800	-0.59365700
C	-1.94821200	1.16627900	-0.97307400
C	-2.29517700	2.49671100	-0.73848500
C	-1.39306100	3.36793000	-0.12744300
C	-0.11912200	2.93753600	0.24989000
C	0.24003500	1.61884400	0.00709500
H	-2.64553600	0.48537500	-1.43972300
H	-3.27193000	2.85584300	-1.03081700

H	-1.68221700	4.39446700	0.05110400
H	0.57287700	3.62868900	0.71125000
O	-0.41929200	-1.30869300	-1.82057300
O	-0.02772400	-2.70029600	-1.67739200
H	-0.64621400	-2.99627000	-0.98170900
C	-2.87916600	-1.21046900	2.11870700
H	-3.95486200	-1.04842500	2.09448400
H	-2.35465600	-0.25548900	2.11023000
H	-2.60063100	-1.79167900	2.99632100
O	-2.59012300	-1.94916600	0.92653700
O	-1.23359100	-2.25878400	0.89886900

FH₂ + CH₃OO[•] (TS Proxy)

Zero-point correction=	0.225854		
(Hartree/Particle)			
Thermal correction to Energy=	0.239624		
Thermal correction to Enthalpy=	0.240568		
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.182813		
Sum of electronic and zero-point Energies=	-691.606443		
Sum of electronic and thermal Energies=	-691.592672		
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-691.591728		
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-691.649484		
0 2			
H	-0.38215600	1.72457800	-0.70621500
C	-2.14988600	-2.57112000	0.35832700
C	-2.83386100	-1.74454600	-0.53342200
C	-2.18992300	-0.66461600	-1.13720100
C	-0.85072500	-0.42964600	-0.84165600
C	-0.15594300	-1.27252000	0.05967700
C	-0.80509100	-2.34207600	0.66054400

H	-2.66589700	-3.40283600	0.81811500
H	-3.87309000	-1.94238500	-0.75664000
H	-2.72578000	-0.02041600	-1.82093000
H	-0.28395300	-2.99816300	1.34481700
C	0.05018400	0.64466800	-1.29564900
H	-0.00509700	0.99676600	-2.32236300
C	1.36353500	0.32544700	-0.70092000
C	2.59175900	0.96240800	-0.83945100
C	3.68872200	0.47327400	-0.13066200
C	3.55628700	-0.63348200	0.70874900
C	2.32677500	-1.27960700	0.85200300
C	1.23145900	-0.80032500	0.14560700
H	2.69757900	1.82538400	-1.48334100
H	4.65088800	0.95612500	-0.23125100
H	4.41772100	-0.99815000	1.25123500
H	2.24010900	-2.14393600	1.49682300
C	-1.80700400	2.20459900	1.78370800
H	-2.79777400	2.03740200	2.20145900
H	-1.32551600	3.05104800	2.27115500
H	-1.19820100	1.30732500	1.88883000
O	-2.03164100	2.49715300	0.39986000
O	-0.82417900	2.79941000	-0.21106200

FHOOH + FHO[•] (TS)

Negative frequency: -1663.96 cm⁻¹

Zero-point correction=	0.374126
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.397854
Thermal correction to Enthalpy=	0.398798
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.317016
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1302.888681

Sum of electronic and thermal Energies=	-1302.864953
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1302.864009
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1302.945791

0 2

H	-1.16616100	-0.41362900	0.98721900
C	-4.80351000	-2.06339400	-1.57223400
C	-4.52592400	-2.66707800	-0.34682600
C	-3.72735900	-2.02486900	0.60088000
C	-3.23308300	-0.76219200	0.30511500
C	-3.52057700	-0.14354400	-0.93050800
C	-4.30294400	-0.79619600	-1.87380200
H	-5.41702400	-2.58126800	-2.29648500
H	-4.92829000	-3.64662300	-0.12933300
H	-3.50280800	-2.49752900	1.54484200
H	-4.53477000	-0.33100100	-2.82225000
C	-2.32506900	0.14314400	1.07629200
C	-2.24838400	1.39407100	0.28544100
C	-1.62941700	2.60032000	0.58386400
C	-1.66898800	3.61876500	-0.36832200
C	-2.30536600	3.41976600	-1.59374500
C	-2.93245200	2.20786000	-1.89079200
C	-2.91272800	1.19472700	-0.94219200
H	-1.13447900	2.74753100	1.53327000
H	-1.20155000	4.57010800	-0.15635400
H	-2.31993300	4.21887900	-2.32200400
H	-3.43426100	2.07426800	-2.83932600
O	-2.46691400	0.36644300	2.44280100
O	-2.25755600	-0.87880800	3.16059800
H	-1.30524400	-1.02765700	3.00300900
O	0.97389900	-0.16537400	1.32111300
O	-0.08847400	-1.06559100	1.29394100
C	1.63051000	-0.14577400	0.02586200
C	2.44020400	-1.39467600	-0.27224700

H	0.85885600	0.03849100	-0.72407700
C	2.68439200	0.93996200	0.06008000
C	2.01380900	-2.70322000	-0.42335900
C	3.79642100	-1.05851000	-0.41354300
C	2.53041500	2.29384200	0.30069400
C	3.94761700	0.39039900	-0.20712600
C	2.96238400	-3.68856600	-0.70772800
H	0.96992400	-2.96050800	-0.31808600
C	4.73774400	-2.03878000	-0.70635200
C	3.66205400	3.11178500	0.27240300
H	1.55570700	2.71323900	0.50709000
C	5.07216000	1.20713500	-0.24341700
C	4.30896300	-3.35762700	-0.84885300
H	2.64823400	-4.71662100	-0.82364800
H	5.78384000	-1.79011100	-0.82275900
C	4.91794200	2.57131700	0.00057800
H	3.56348600	4.17192400	0.45991200
H	6.05117400	0.79888300	-0.45403300
H	5.02889100	-4.13249700	-1.07426100
H	5.78387200	3.21876700	-0.02135100

$\text{FH}_2 + \text{FHO}\cdot (\text{TS})$ Negative frequency: -1809.76 cm⁻¹

Zero-point correction=	0.365937
(Hartree/Particle)	
Thermal correction to Energy=	0.387305
Thermal correction to Enthalpy=	0.388249
Thermal correction to Gibbs Free Energy=	0.311399
Sum of electronic and zero-point Energies=	-1152.497998
Sum of electronic and thermal Energies=	-1152.476630
Sum of electronic and thermal Enthalpies=	-1152.475686
Sum of electronic and thermal Free Energies=	-1152.552536

0 2

H	1.23048800	-0.98722700	1.69650700
C	3.13564300	3.09388700	0.09634700
C	2.83721800	2.95167000	1.45231400
C	2.62031900	1.68914900	2.00242500
C	2.71445400	0.57118600	1.17886900
C	3.01886100	0.71680000	-0.19657200
C	3.22899400	1.97748700	-0.73816200
H	3.30044000	4.08115000	-0.31301300
H	2.77168700	3.82908900	2.08053500
H	2.37969000	1.58309300	3.05160000
H	3.47041900	2.10195100	-1.78524300
C	2.51130300	-0.85556000	1.48437300
C	2.82212300	-1.56845800	0.22808500
C	2.85299500	-2.93051900	-0.04891700
C	3.14344000	-3.34838200	-1.34763800
C	3.39332500	-2.41583400	-2.35484600
C	3.36706600	-1.04614900	-2.08401000

C	3.08376500	-0.62386900	-0.79192700
H	2.65239500	-3.65737800	0.72698400
H	3.17385800	-4.40452200	-1.57707400
H	3.61458200	-2.75803100	-3.35646200
H	3.57396600	-0.33362800	-2.87124700
H	2.86014600	-1.25781000	2.43217200
O	0.01378500	-1.14279300	1.99404800
O	-0.65258800	0.00102400	1.57733600
C	-1.22916300	-0.21068700	0.26188900
C	-1.73688200	1.12029300	-0.24798600
H	-0.44518500	-0.63114500	-0.36989200
C	-2.48130300	-1.06866100	0.27286600
C	-1.03649600	2.29686600	-0.44851300
C	-3.10879000	1.03461500	-0.53024300
C	-2.63670600	-2.38952300	0.65690700
C	-3.57161500	-0.32421300	-0.20602700
C	-1.72408000	3.40686300	-0.94423900
H	0.01944000	2.36060100	-0.22434100
C	-3.78965700	2.13834400	-1.03173700
C	-3.90480100	-2.96868400	0.56759600
H	-1.79649000	-2.96024300	1.02532800
C	-4.83090000	-0.90538600	-0.30445500
C	-3.08521500	3.32452500	-1.23453000
H	-1.19665200	4.33665300	-1.10612500
H	-4.84554000	2.08634200	-1.25973500
C	-4.98824200	-2.23351900	0.08931800
H	-4.04634900	-3.99754500	0.86843900
H	-5.67680600	-0.34377400	-0.67707100
H	-3.60167500	4.19248500	-1.62127600
H	-5.96191000	-2.69935600	0.02172800

CONCLUSION

Un nouveau mécanisme détaillé de l'auto-oxydation du fluorène est présenté. Cette étude allie la chimie computationnelle et expérimentale pour une meilleure compréhension du mécanisme. Dans un premier temps, les barrières d'énergies nécessaire pour les réactions d'auto-oxydation primaires et secondaires ont été calculées à l'aide de Gaussian. Ces calculs DFT ont été réalisés au niveau de théorie B3LYP/6-311++g(2d,2p)//CPCM(benzène) et montrent un ΔG^\ddagger inférieur pour l'auto-oxydation secondaire, cela signifie que la réaction secondaire est plus rapide que la primaire. Par la suite, il a été possible de suivre l'évolution de la concentration des espèces FO, PhOH et FHOH en fonction du temps par GC-MS et UV-Vis. Les résultats montrent l'évolution de la concentration du phénol qui est une preuve indirecte que le radical hydroxyle est formé comme produit du mécanisme d'auto-oxydation secondaire. Pour finir, à l'aide du logiciel de modélisation COPASI, la cinétique de la réaction d'auto-oxydation du fluorène a été étudiée. Les cinétiques, théoriques et expérimentales, sont en corrélation et suivent la même tendance. De plus, le logiciel a permis d'obtenir les constantes k_p , k_s et k_t ayant pour valeur $11.3 \pm 1.5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $25 \pm 9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $2.69 \pm 0.07 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivement.

Le mécanisme proposé pour le fluorène est un système modèle qui peut être appliqué à d'autres molécules ayant une structure chimique similaire comme la tetaline ou encore le cholestérol pour lequel il est d'une importance majeur de comprendre son mécanisme d'oxydation en détails.

RÉFÉRENCES

- Aikens, J., & Dix, T. (1991). Perhydroxyl radical (HOO[.]) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 266(23), 15091-15098.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Barclay, L. R. C., Xi, F., & Norris, J. Q. (1997). Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 17(1-2), 73-90.
- Bouchonnet, S. (2013). *Introduction to GC-MS coupling*: CRC Press.
- Burton, G., & Ingold, K. (1981). Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *Journal of the American Chemical Society*, 103(21), 6472-6477.
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P., & Ross, A. B. (1988). Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (\cdot OH/ \cdot O⁻) in aqueous solution. *Journal of physical and chemical reference data*, 17(2), 513-886.
- Carey, F. A., & Sundberg, R. J. (1996). *Chimie organique avancée: Structures moléculaires et mécanismes réactionnels* (Vol. 1): De Boeck Supérieur.

- Fenton, H. (1876). On a new reaction of tartaric acid. *Chem. News*, 33, 190.
- Frenette, M., & Scaiano, J. C. (2008). Evidence for hydroxyl radical generation during lipid (linoleate) peroxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(30), 9634-9635.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., . . . Fox, D. J. (2016). Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT.
- Greer, A. (2006). Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [1O₂ (1Δg)] in photosensitized oxidation reactions. *Accounts of chemical research*, 39(11), 797-804.
- Gupta, S. D. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*: CRC press.
- Haidasz, E. A., Van Kessel, A. T., & Pratt, D. A. (2016). A continuous visible light spectrophotometric approach to accurately determine the reactivity of radical-trapping antioxidants. *The Journal of Organic Chemistry*, 81(3), 737-744.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA.
- Hermans, I., Peeters, J., & Jacobs, P. A. (2008). Autoxidation of hydrocarbons: from chemistry to catalysis. *Topics in Catalysis*, 50(1-4), 124-132.
- Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., . . . Kummer, U. (2006). COPASI—a complex pathway simulator. *Bioinformatics*, 22(24), 3067-3074.

- Howard, J., & Ingold, K. (1965). Absolute Rate Constants for Hydrocarbon Autoxidation: I. Styrene. *Canadian Journal of Chemistry*, 43(10), 2729-2736.
- Howard, J., & Ingold, K. (1966). Absolute rate constants for hydrocarbon autoxidation: IV. Tetralin, cyclohexene, diphenylmethane, ethylbenzene, and allylbenzene. *Canadian Journal of Chemistry*, 44(10), 1119-1130.
- Howard, J., & Ingold, K. (1968). Self-reaction of sec-butylperoxy radicals. Confirmation of the Russell mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 90(4), 1056-1058.
- Howard, J., Ingold, K., & Symonds, M. (1968). Absolute rate constants for hydrocarbon oxidation. VIII. The reactions of cumyloperoxy radicals. *Canadian Journal of Chemistry*, 46(6), 1017-1022.
- Howard, J., Schwalm, W., & Ingold, K. (1968). Absolute Rate Constants for Hydrocarbon Autoxidation: VII. Reactivities of Peroxy Radicals Toward Hydrocarbons and Hydroperoxides: ACS Publications.
- Ider, M. (2017). *Elaboration et caractérisation des nanomatériaux à base de métaux nobles*. Disponible chez ProQuest Dissertations & Theses Full Text.
- Ingold, K. U., & Pratt, D. A. (2014). Advances in radical-trapping antioxidant chemistry in the 21st century: a kinetics and mechanisms perspective. *Chemical reviews*, 114(18), 9022-9046.
- Kulig, W., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Rog, T., & Vattulainen, I. (2016). Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and physics of lipids*, 199, 144-160.

- Laubach, H., Chang, S. K., Lee, S., Rizvi, I., Zurakowski, D., Davis, S. J., . . . Hasan, T. (2008). In-vivo singlet oxygen dosimetry of clinical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Journal of biomedical optics*, 13(5), 050504.
- Maillard, B., Ingold, K., & Scaiano, J. (1983). Rate constants for the reactions of free radicals with oxygen in solution. *Journal of the American Chemical Society*, 105(15), 5095-5099.
- Mannervik, B. (1985). [60] Glutathione peroxidase *Methods in enzymology* (Vol. 113, pp. 490-495): Elsevier.
- Nair, A. (2008). *Principles of biotechnology*: Laxmi Publications.
- Nardello, V., Marti, M.-J., Pierlot, C., & Aubry, J.-M. (1999). Photochemistry without Light: Oxidation of Rubrene in a Microemulsion with a Chemical Source of Singlet Molecular Oxygen (1O_2 , 1Dg). *Journal of chemical education*, 76(9), 1285.
- Papas, A. M. (2019). *Antioxidant status, diet, nutrition, and health*: CRC press.
- Perkampus, H.-H. (2013). *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*: Springer Science & Business Media.
- Pratt, D. A., Tallman, K. A., & Porter, N. A. (2011). Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Accounts of chemical research*, 44(6), 458-467.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.

- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current opinion in microbiology*, 2(2), 188-194.
- Van Hook, J., & Tobolsky, A. (1958). The thermal decomposition of 2, 2'-Azo-bis-isobutyronitrile. *Journal of the American Chemical Society*, 80(4), 779-782.
- Venkatadri, R., & Peters, R. W. (1993). Chemical oxidation technologies: ultraviolet light/hydrogen peroxide, Fenton's reagent, and titanium dioxide-assisted photocatalysis. *Hazardous Waste and Hazardous Materials*, 10(2), 107-149.
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., & Korte Jr, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical biochemistry*, 184(2), 193-199.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., . . . Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO journal*, 16(16), 4806-4816.
- Wong, P., Griller, D., & Scaiano, J. (1982). A kinetic study of the reactions of tert-butoxyl with alkenes: hydrogen abstraction vs. addition. *Journal of the American Chemical Society*, 104(19), 5106-5108.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139-162.
- Zielinski, Z. A., & Pratt, D. A. (2019). H-Atom Abstraction vs Addition: Accounting for the Diverse Product Distribution in the Autoxidation of Cholesterol and Its Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 141(7), 3037-3051.