



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**LICENCIATURA PLENA EM QUÍMICA**

**MONOGRAFIA**

**ESTUDO VOLTAMÉTRICO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO:  
3-NITRO-, ORTO- E PARA-TIROSINA**

**MAYSA LIMA DO NASCIMENTO**

**RECIFE**

**2019**

**MAYSA LIMA DO NASCIMENTO**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DE BIOMARCADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO: 3-NITRO-TIROSINA, ORTO- E PARA-TIROSINA**

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo como orientador(a) o(a) Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira.

**Recife**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

N244e Nascimento, Maysa Lima do  
Estudo voltamétrico de biomarcadores de estresse oxidativo:  
3-nitro-, orto- e para-tirosina / Maysa Lima do Nascimento. – 2019.  
60 f. : il.

Orientador: Severino Carlos Bezerra de Oliveira.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife,  
BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Stress (Fisiologia) 2. Marcadores bioquímicos 3. Aminoácidos  
4. Proteínas 5. Voltametria I. Oliveira, Severino Carlos Bezerra de,  
orient. II. Título

CDD 540

**MAYSA LIMA DO NASCIMENTO**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DE BIOMARCADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO: 3-NITRO-TIROSINA, ORTO- E PARA-TIROSINA**

Monografia apresentada como pré-requisito de conclusão do curso de Licenciatura Plena em Química, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, tendo como orientador(a) o(a) Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira.

Aprovada em \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira – DQ-UFRPE  
Orientador

---

Prof. Dr. Márcio Vilar França Lima  
Primeiro examinador

---

Prof. Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento  
Segundo examinador

**Recife**

**2019**

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Maria Aparecida e Josias.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as conquistas alcançadas até o momento. Por ter me dado forças para superar os obstáculos e poder concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Josias Nascimento e Maria Aparecida, por estarem sempre ao meu lado, torcendo por mim e sempre disponível para o que for preciso.

Aos meus familiares que acreditam e torcem pelo meu sucesso, em especial minha avó, Josefa Lima.

Ao meu esposo, Isaac Dionisio, pelo seu companheirismo e por estar sempre disposto a ajudar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Severino Carlos, por todos os ensinamentos que contribuíram de forma significativa para minha formação acadêmica.

Ao grupo de eletroquímica e eletroanalítica da UFRPE, Alex Pedro, Carlos Mendes, Gabriel Montenegro, Hitala Nicole, José Nascimento, Nathália Lopes e Raphael Nascimento, por todos os momentos, aprendizados que foram compartilhados, sempre ajudando uns aos outros nas dificuldades encontradas.

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Análise Química, Inorgânica e Sensores (LAQIS), em especial Amanda, Arthur, Carol, Gaby, Danielle, Ester, Helena, Lidiane, Mirella, Nattany, Reobe, Rômulo e Renê, por todos os momentos compartilhados.

Aos meus colegas de turma, em especial meus queridos amigos Hitala Nicole, Matheus Ferreira, Mirella Meira, Rômulo Almeida e Thaynan Jovência pelos bons momentos que foram vivenciados durante toda a graduação.

Aos meus professores da UFRPE por toda paciência e conhecimento transmitido no decorrer do curso.

Aos órgãos de fomento, CNPQ e FACEPE, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ESQUEMAS.....	XII
LISTA DE QUADROS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 METODOLOGIA.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Revisão da literatura.....	20
4.1.1 Aminoácidos e proteínas.....	22
4.1.1.1 Configuração espacial das proteínas.....	24
4.1.1.2 Grupos prostéticos das proteínas.....	26
4.1.2 Oxidação das proteínas <i>in-vivo</i> .....	27
4.1.3 Determinação analítica dos derivados da tirosina: 3-nitro-, <i>orto</i> - e <i>para</i> -tirosina.....	30
4.1.3.1 3-Nitro-tirosina.....	30
4.1.3.2 <i>Orto</i> -tirosina.....	32
4.1.3.3 <i>Para</i> -tirosina.....	32
4.1.4 Técnicas voltamétricas.....	33
4.1.4.1 Voltametria cíclica.....	33
4.1.4.2 Voltametria de pulso diferencial.....	35
4.1.4.3 Voltametria de onda quadrada.....	36
4.1.5 Estudo voltamétrico das proteínas.....	37
4.2 Resultados experimentais.....	39
4.2.1. Oxidação da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo.....	39
4.2.1.1 Voltametria cíclica.....	39
4.2.1.2 Voltametria de pulso diferencial.....	40
4.2.1.3 Voltametria de onda quadrada.....	42

4.2.2 Mecanismo de oxidação da 3-nitro-tirosina.....	43
4.2.3 Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina.....	44
4.2.4 Redução da 3-nitro-tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo.....	45
4.2.4.1 Voltametria cíclica.....	45
4.2.5 Oxidação da <i>para</i> -tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo.....	46
4.2.5.1 Voltametria cíclica.....	46
4.2.5.2 Voltametria de pulso diferencial.....	46
4.2.6 Mecanismo de oxidação da <i>para</i> -tirosina.....	47
4.2.7 Redução da <i>para</i> -tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo.....	48
4.2.8 Oxidação da <i>ortho</i> -tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo.....	48
4.2.8.1 Voltametria cíclica.....	48
4.2.8.2 Voltametria de onda quadrada.....	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

## RESUMO

Espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de oxigênio (ERO) são produzidas *in-vivo* dentro das células como produtos do metabolismo celular. Essas espécies desempenham papéis fisiológicos importantes no controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose e na fagocitose. Entretanto, o excesso de ERN e ERO *in-vivo* pode causar danos em moléculas biológicas, como ácido desoxirribonucléico de hélice dupla (dsDNA) e proteínas, provocando mutações, com consequências diretas em muitos processos patológicos. O peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) é uma ERN que promove reações com proteínas nos resíduos de tirosina produzindo 3-nitro-tirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), podendo causar diferentes tipos de doenças tais como lesão pulmonar aguda, aterosclerose e alguns tipos de câncer. Assim, a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é um importante biomarcador de produção *in-vivo* de ERN em vários tecidos. No entanto, ERO provocam danos oxidativos nas proteínas levando à produção de *ortho*- (*o*-Tyr) e *para*-tirosina (*p*-Tyr). Diante disso, este trabalho propôs como objetivo investigar por técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada, o comportamento redox da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, *o*-Tyr e *p*-Tyr, utilizando eletrodo de carbono vítreo, bem como desenvolver métodos eletroanalíticos para suas quantificações. O estudo revelou os mecanismos redox dos biomarcadores. Além disso, foi realizada uma revisão bibliográfica para elaboração de um texto didático sobre os aminoácidos e proteínas, como também sobre os fundamentos das técnicas voltamétricas e suas aplicações em estudos biológicos.

**Palavras-chave:** biomarcadores de estresse oxidativo, 3-nitro-tirosina, *ortho*-tirosina, *para*-tirosina, eletrodo de carbono vítreo, voltametria.

## ABSTRACT

Reactive nitrogen (RNS) and oxygen species (ROS) are produced *in-vivo* within cells as products of cellular metabolism. These species play important physiological roles in controlling blood pressure, cell signaling, apoptosis and phagocytosis. However, *in-vivo* excess of RNS and ROS can cause damage to biological molecules, such as double-helix deoxyribonucleic acid (dsDNA) and proteins, leading to mutations, with direct consequences in many pathological processes. Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) is an RNS that promotes reactions with proteins in tyrosine residues producing 3-nitro-tyrosine (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), which can cause different types of diseases such as acute pulmonary injury, atherosclerosis and some type of cancers. Thus, 3-NO<sub>2</sub>-Tyr is an important biomarker of *in-vivo* production of RNs in various tissues. However, ROS provoke oxidative damage in the proteins leading to the production of *ortho*- (o-Tyr) and *para*-tyrosine (p-Tyr). Therefore, the objective of this work was to investigate via electrochemical techniques, such as cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and square wave voltammetry, the redox behavior of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, o-Tyr and p-Tyr using a glassy-carbon electrode, as well as to develop electroanalytical methods for their quantifications. The study revealed the redox mechanisms of biomarkers. In addition, a bibliographic review was carried out to elaboration of a didactic text on amino acids and proteins, as well as on the fundamentals of voltammetric techniques and their applications in biological studies.

**Key words:** biomarkers of oxidative stress, 3-nitro-tyrosine, *ortho*-tyrosine, *para*-tyrosine, glassy-carbon electrode, voltammetry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Estruturas químicas da 3-nitro-tirosina, <i>orto</i> - e <i>para</i> -tirosina.....	15
<b>Figura 02.</b> Estrutura geral dos aminoácidos.....	20
<b>Figura 03.</b> Ionização da alanina em função do pH.....	23
<b>Figura 04.</b> Curva de titulação da alanina.....	24
<b>Figura 05.</b> Níveis de estrutura nas proteínas.....	25
<b>Figura 06.</b> Estruturas secundárias das proteínas: (A) $\alpha$ -hélice e (B) folha $\beta$ pregueada, (—) ligação de hidrogênio.....	26
<b>Figura 07.</b> Tipos de conformações das proteínas: (A) mioglobina, proteína globular e (B) colágeno, proteína fibrosa.....	27
<b>Figura 08.</b> Produtos da oxidação dos resíduos de: (A) histidina, (B) arginina, (C) lisina e (D) prolina.....	29
<b>Figura 09.</b> Reações de conversão da fenilalanina em <i>para</i> -, <i>orto</i> - e <i>meta</i> -tirosina...	30
<b>Figura 10.</b> Modificações causadas por ERN na tirosina.....	31
<b>Figura 11.</b> Voltametria cíclica: (A) CVs do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1 mmol L $^{-1}$ , em KCl 0,1 mol L $^{-1}$ , para diferentes velocidades de varredura (5-500 mV s $^{-1}$ ), em GCE ( $\phi$ = 1,6 mm).....	35
<b>Figura 12.</b> Voltametria de pulso diferencial: DPV do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 0,0625 mol L $^{-1}$ , em tampão fosfato, pH = 7,0, em GCE ( $\phi$ = 2,0 mm), $v$ = 5 mV s $^{-1}$ .....	36
<b>Figura 13.</b> Voltametria de onda quadrada: SWV do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 0,0625 mol L $^{-1}$ , em tampão fosfato, pH = 7,0, em GCE ( $\phi$ = 2,0 mm), $I_t$ - corrente total, $I_f$ - forward (corrente direta) e $I_b$ - backward (corrente reversa).....	37
<b>Figura 14.</b> CVs sucessivos da 3-NO $_2$ -Tyr obtidos em tampão fosfato pH = 7,0: (A) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , $v$ = 100 mV s $^{-1}$ , (—) primeira varredura de potencial.....	41

<b>Figura 15.</b> DPVs (com correção de linha de base) sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr obtidos em tampão fosfato pH = 7,0: (A) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (C) 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (—) primeira varredura.....	42
<b>Figura 16.</b> Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) obtidos em solução 100 $\mu\text{M}$ de 3-NO <sub>2</sub> -Tyr, em função do pH.....	43
<b>Figura 17.</b> SWVs da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH = 7,0: (A) (—) primeira varredura e (B) (—) $I_t$ - corrente total, (—) $I_f$ - corrente direta e (—) $I_b$ - corrente reversa, $v_{ef} = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....	44
<b>Figura 18.</b> (A) DPVs (com correção de linha de base) de uma solução de 3-NO <sub>2</sub> -Tyr em diferentes concentrações, em pH= 7,0 e (B) Curva analítica ( $I_{pa}/[3\text{-NO}_2\text{-Tyr}]$ ); (a) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (c) 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	45
<b>Figura 19.</b> CVs sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ obtidos em tampão acetato pH = 4,5: (A) sentido anódico de varredura e (B) sentido catódico de varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura de potencial, (—) linha de base.....	46
<b>Figura 20.</b> CVs sucessivos obtidos em solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de <i>p</i> -Tyr: (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH = 7,0, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.....	47
<b>Figura 21.</b> DPVs sucessivos obtidos em solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de <i>p</i> -Tyr: (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH = 7,0, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.....	48
<b>Figura 22.</b> CVs sucessivos obtidos em solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de <i>o</i> -Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.....	50
<b>Figura 23.</b> SWVs obtidos em solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de <i>o</i> -Tyr em pH =7,0: (A) SWVs sucessivos, (—) primeira varredura, (B) primeira varredura e (C) segunda varredura, $I$ -corrente total, $I_f$ -corrente direta e $I_b$ -corrente reversa, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .....	51

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 01.</b> Reações de oxidação da Tyr, Trp, His, Cys e Met.....	40
<b>Esquema 02.</b> Mecanismo de oxidação proposto para a 3-NO <sub>2</sub> -Tyr.....	45
<b>Esquema 03.</b> Mecanismo de oxidação proposto para a <i>p</i> -Tyr.....	49

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01.</b> Estruturas químicas e propriedades dos aminoácidos que compõem as proteínas em pH = 7,0, (—R) cadeia lateral.....	21
<b>Quadro 02.</b> Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos em GCE, em tampão fosfato, pH = 7,0.....	39
<b>Quadro 03.</b> Potenciais de oxidação e redução dos biomarcadores 3-NO <sub>2</sub> -Tyr, o-Tyr e p-Tyr, em GCE, em tampão fosfato, pH = 7,0.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

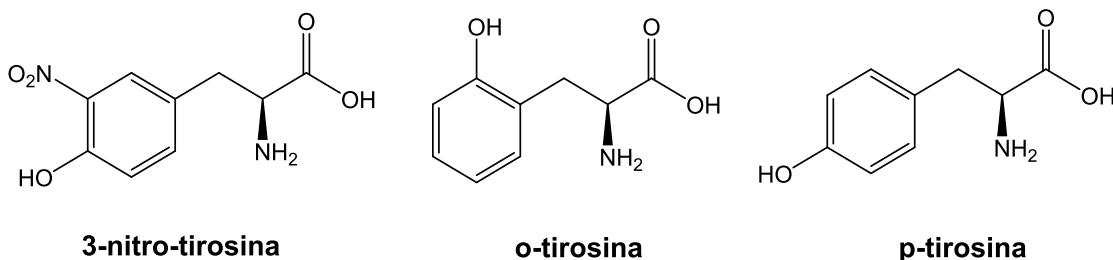
- 3-NO<sub>2</sub>-Tyr – 3-nitro-tirosina
- BDDE – Eletrodo de diamante dopado com boro (do inglês “Boron-Doped Diamond Electrode”)
- CV – Voltametria cíclica (do inglês “Cyclic Voltammetry”)
- Cys – cistina
- CySS – cisteína
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “DeoxyriboNucleic Acid”)
- DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “Differential Pulse Voltammetry”)
- ECD – Detecção eletroquímica (do inglês “Electrochemical detection”)
- ECL – Eletroquimioluminescente (do inglês “Electrochemiluminescence”)
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- GC – Cromatografia gasosa (do inglês “Gas Chromatography”)
- GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “Glassy Carbon Electrode”)
- GC-MS – Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (do inglês “Gas Chromatography–Mass Spectrometry”)
- His – histidina
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “High Performance Liquid Chromatography”)
- I<sub>b</sub> – Corrente reversa (do inglês “backward”)
- I<sub>f</sub> – Corrente direta (do inglês “forward”)
- I<sub>t</sub> – Corrente total
- Met – metionina
- MS – Espectrometria de massas (do inglês “Mass Spectrometry”)
- o-Tyr – *ortho*-tirosina
- p-Tyr – *para*-tirosina
- SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “Square Wave Voltammetry”)
- Tyr – tirosina
- Trp – Triptofano
- UV – Ultravioleta

## 1 INTRODUÇÃO

Espécies altamente reativas de nitrogênio e oxigênio são radicais livres naturalmente produzidas no organismo humano a partir do metabolismo celular, como também por agentes externos, como a radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos. No organismo humano, essas espécies desempenham inúmeras funções, tais como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso desses radicais pode causar danos oxidativos em moléculas biológicas importantes, DNA e proteínas, bem como mutações, com consequências diretas em muitos processos patológicos (DU *et al.*, 2004; OLIVEIRA, BRETT, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) promove diferentes efeitos biológicos a partir de diferentes reações, tais como as reações redox diretas e a homólise de ácido peroxinitroso (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Reações com o ONOO<sup>-</sup> podem formar agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, como por exemplo, a tirosina, gerando 3-nitro-tirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), **Figura 01**, que pode causar diferentes tipos de doenças, tais como lesão pulmonar aguda, neurodegeneração, aterosclerose e alguns tipos de câncer (DU *et al.*, 2004; MAHMOUDI *et al.*, 2016; SARVER *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é um importante biomarcador de produção *in-vivo* de espécies reativas de nitrogênio (ERN) em vários tecidos (DU *et al.*, 2004; SARVER *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). No entanto, a produção *in-vivo* de *ortho*- (*o*-Tyr) e *para*-tirosina (*p*-Tyr), **Figura 01**, está associada a danos oxidativos provocados nas proteínas por espécies reativas de oxigênio (ERO) (DU *et al.*, 2004). A fim de quantificar a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em fluidos e tecidos biológicos, métodos analíticos têm sido propostos, em sua grande maioria baseados em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (DU *et al.*, 2004; SARVER *et al.*, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

**Figura 01.** Estruturas químicas da 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina.



Para postular mecanismos de reações redox de inúmeras espécies químicas, incluindo fármacos e biomoléculas, técnicas voltamétricas como voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV), principalmente utilizando eletrodos sólidos de carbono, ouro ou platina, são muito utilizadas na atualidade, principalmente devido as características intrínsecas de elevadas sensibilidade, seletividade e adaptabilidade dos métodos eletroanalíticos. Nesse sentido, inúmeros mecanismos de reações redox têm sido propostos na literatura a partir de estudos voltamétricos (OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PONTINHA *et al.*, 2012). Além disso, as técnicas voltamétricas de pulso, como DPV e SWV, têm grande relevância para o desenvolvimento de metodologias analíticas, considerando a elevadíssima sensibilidade resultante da minimização da corrente capacitiva, o que melhora significativamente a resolução e permite atingir limites de detecção da ordem de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; PACHECO *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi investigar por técnicas voltamétricas as propriedades redox dos biomarcadores de estresse oxidativo 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, o-Tyr e p-Tyr. O trabalho foi dividido em três etapas: primeiramente, foi realizada uma revisão da literatura a fim de elaborar um texto didático sobre os aminoácidos e proteínas, como também sobre os fundamentos das técnicas voltamétricas e suas aplicações em estudos biológicos. Em seguida, o comportamento redox dos biomarcadores 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, o-Tyr e p-Tyr foi investigado em eletrodo de carbono vitreo (GCE), numa ampla faixa de pH, utilizando CV, DPV e SWV. Por fim, foram investigadas as potencialidades das propriedades redox dessas espécies para aplicações eletroanalíticas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Realizar estudo voltamétrico dos biomarcadores de estresse oxidativo: 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina.

### 2.2. Objetivos Específicos

*A partir de uma revisão bibliográfica discutir e elaborar um texto didático sobre:*

- Estrutura, propriedades e funções dos aminoácidos e proteínas;
- Danos oxidativos em proteínas;
- Comportamento voltamétrico de proteínas;
- Métodos analíticos para detecção e quantificação de 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina;
- Fundamentos das técnicas voltamétricas e suas aplicações em estudos biológicos.

*Realizar um estudo experimental sobre:*

- Comportamento voltamétrico dos biomarcadores de estresse oxidativo 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina sobre GCE, utilizando técnicas voltamétricas como CV, SWV e DPV;
- Potencialidades das propriedades redox da 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina para aplicações eletroanalíticas;

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Parte teórica (revisão bibliográfica)**

##### **3.1.1 Seleção de livros e artigos**

Foram selecionados artigos científicos e livros considerados importantes para a fundamentação do trabalho, envolvendo temas como estrutura, propriedades e funções dos aminoácidos e proteínas, oxidação das proteínas *in-vivo*, métodos analíticos para detecção e quantificação da 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina e fundamentos e aplicações das técnicas voltamétricas, tais como voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; CAMPBELL, FARRELL, 2007; ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013).

##### **3.1.2 Aprofundamento científico**

Realizou-se um aprofundamento científico sobre os temas aminoácidos, proteínas, técnicas voltamétricas e de mecanismos de reações redox de aminoácidos e proteínas utilizando técnicas voltamétricas, tomando como base a literatura selecionada, analisando livros e artigos publicados em periódicos científicos nacionais e internacionais.

##### **3.1.3 Elaboração de um texto didático**

Nesta etapa, procurou-se escrever um texto introdutório conciso sobre os temas em epígrafe indicando apenas referências bibliográficas chaves, optando-se por aquelas mais didáticas e acessíveis para um leitor iniciante na área.

### **3.2 Parte experimental**

Para uma melhor compreensão e familiarização dos temas abordados na revisão bibliográfica, o comportamento eletroquímico de biomarcadores de estresse oxidativo como a 3-nitro-tirosina, *ortho*- e *para*-tirosina foi investigado sobre eletrodo de carbono vítreo, utilizando técnicas voltamétricas. Todos os resultados obtidos foram discutidos e comparados com os resultados prévios da literatura.

#### **3.2.1 Materiais e metodologia**

A partir de reagentes de alto grau de pureza, foram preparadas soluções estoque de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 1 mmol L<sup>-1</sup> em tampões fosfato pH = 7,0 e acetato pH = 4,5, *p*-Tyr 1 mmol L<sup>-1</sup> em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e *o*-Tyr 1 mmol L<sup>-1</sup> em água deionizada.

Foram utilizados eletrólitos suporte de diferentes pH / composição: (2.0 / HCl + KCl, 3.3 / HAcO + NaAcO, 4.5 / HAcO + NaAcO, 5.2 / HAcO + NaAcO, 5.9 / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.2 / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.0 / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9.2 / NaOH + Na<sub>2</sub>B<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 11.2 / NaOH + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Durante todos os ensaios a célula eletroquímica estava ligada a um potenciosstat/galvanostat Autolab Electrochemical Instruments, Utrecht, Holanda, funcionando no modo potenciosstático. O controle dos parâmetros voltamétricos, a aquisição e o tratamento dos dados foram efetuados por intermédio do software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Echo-Chemie, Utrecht, Holanda. Uma célula eletroquímica de compartimento único foi utilizada, contendo um eletrodo de carbono vítreo (GCE) ( $\phi = 1,6$  mm), um fio de platina e um eletrodo de Ag/AgCl (3 mol L<sup>-1</sup> KCl saturado com AgCl) como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente.

Os estudos fundamentais de caracterização das propriedades redox dos biomarcadores 3-nitro-, *ortho*- e *para*-tirosina foram realizados utilizando as técnicas eletroquímicas voltamétricas CV, DPV e SWV.

Potencialidades das propriedades redox dos biomarcadores 3-nitro-, *ortho*- e *para*-tirosina para aplicações analíticas foram investigadas, utilizando CV, SWV e DPV. Diferentes parâmetros eletroquímicos foram estudados como, escolha das condições que resultam um sinal eletroquímico mais sensível e seletivo, bem como a influência da velocidade de varredura e do pH na resposta eletroquímica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

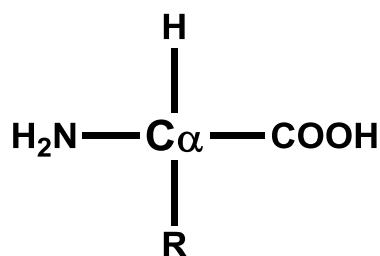
### 4.1 Revisão da literatura

#### 4.1.1 Aminoácidos e proteínas

Os aminoácidos são encontrados em peptídeos e proteínas e atuam como transportadores de nitrogênio, neurotransmissores e precursores de outras moléculas biológicas, como nucleotídeos, creatina e cetoácidos, por exemplo. A estrutura geral dos aminoácidos inclui um grupo carboxila, um grupo amino e um hidrogênio ligados ao mesmo átomo de carbono, denominado carbono  $\alpha$ , **Figura 02**, e, por este motivo, os aminoácidos são classificados como  $\alpha$ -aminoácidos. Além disso, possuem grupos variáveis R (cadeias laterais) distintos ligados a este carbono. Assim, o carbono- $\alpha$  encontrado nos aminoácidos é tetraédrico e assimétrico, com exceção da glicina em que o grupo R é o hidrogênio (NELSON, COX, 2014).

Há vinte tipos de aminoácidos principais (**Quadro 01**) que podem ser encontrados nas proteínas, diferenciando-se uns dos outros em suas cadeias laterais (R), que variam em tamanho, carga elétrica e estrutura, influenciando consideravelmente suas propriedades químicas (CAMPBELL, FARRELL, 2007; NELSON, COX, 2014).

**Figura 02.** Estrutura geral dos aminoácidos.



Os aminoácidos podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com suas cadeias laterais (grupos R) (CAMPBELL, FARRELL, 2007):

- 1- Aminoácidos com cadeias laterais apolares não-carregadas: nesta classe, os grupos variáveis são apolares e hidrofóbicos, devido à ausência de grupamentos hidrofílicos nas cadeias laterais.
- 2- Aminoácidos com cadeias laterais polares não-carregadas: os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, hidrofílicos, do que aqueles dos

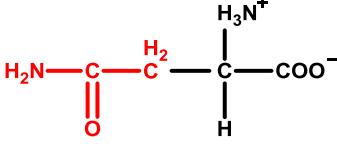
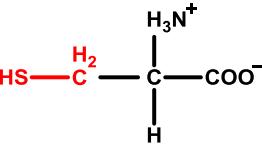
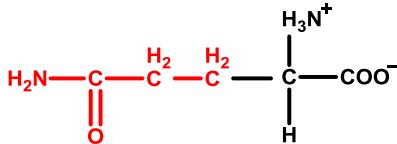
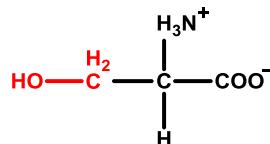
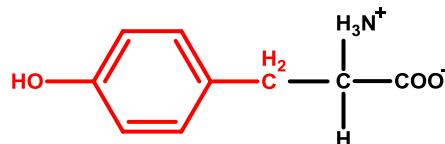
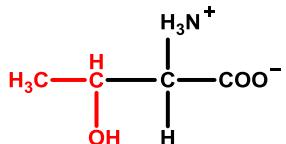
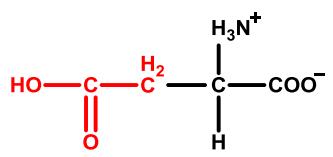
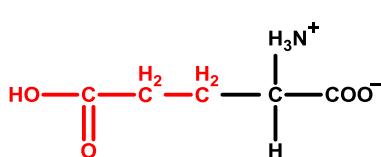
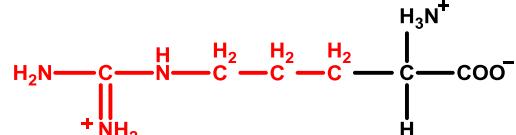
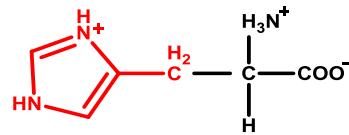
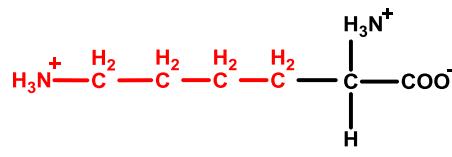
aminoácidos apolares, em virtude da presença de grupos funcionais que realizam ligações de hidrogênio com a água.

- 3- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos): possuem o grupo carboxila em suas cadeias laterais. Este grupo pode perder um próton, levando à formação do ânion carboxilato. Devido a presença deste ânion, as cadeias laterais dos aminoácidos que compõem esta classe são carregadas negativamente em pH neutro. Além disso, possuem grupos R hidrofílicos.
- 4- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos): apresentam o grupo amino em suas cadeias laterais que são carregadas positivamente em pH neutro. Possuem grupos R hidrofílicos.

**Quadro 01.** Estruturas químicas e propriedades dos aminoácidos que compõem as proteínas, em pH = 7,0, (—R) cadeia lateral.

**Fonte:** (CAMPBELL, FARRELL, 2007; NELSON, COX, 2014)

<b>Aminoácidos com cadeias laterais apolares não-carregadas</b>					
 Alanina (Ala, A)	 Isoleucina (Ile, I)	 Prolina (Pro, P)			
 Fenilalanina (Phe, F)	 Leucina (Leu, L)	 Triptofano (Trp, W)			
 Glicina (Gly, G)	 Metionina (Met, M)	 Valina (Val, V)			

Aminoácidos com cadeias laterais polares não-carregadas		
		
Asparagina (Asn, N)	Cisteína (Cys, C)	Glutamina (Gln, Q)
		
Serina (Ser, S)	Tirosina (Tyr, Y)	Treonina (Thr, T)
Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)		
		
Ácido aspártico (Asp, D)	Ácido glutâmico (Glu, E)	
Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)		
		
Arginina (Arg, R)	Histidina (His, H)	
		
	Lisina (Lys, K)	

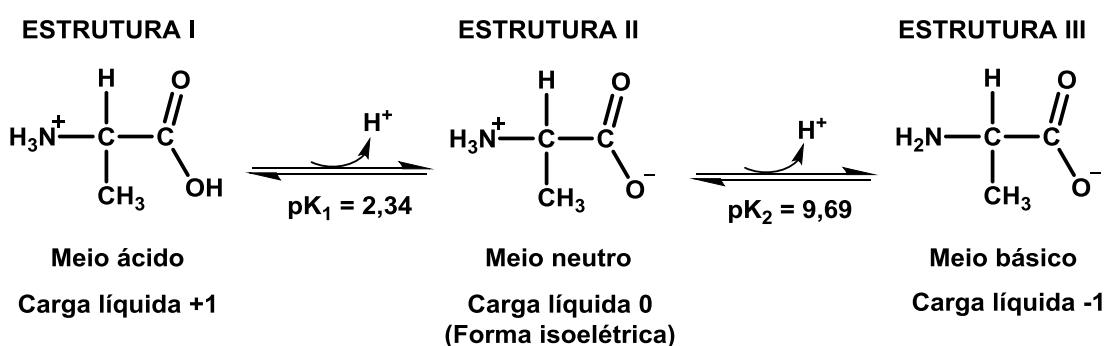
Em solução, os aminoácidos podem agir como ácidos ou bases, em virtude do caráter ácido do grupo carboxila (-COOH) e básico do grupo amino (-NH<sub>2</sub>). Com a variação do pH do meio, estes grupos apresentam uma série de equilíbrios, envolvendo a doação ou recepção de um próton:



Tendo em vista que o estado de ionização depende do pH do meio, podem predominar o grupamento amino com carga positiva (forma catiônica) ou o grupamento ácido carboxílico com carga negativa (forma aniónica) à medida que variamos o pH da solução. Dessa forma, tanto os aminoácidos livres quanto alguns aminoácidos combinados por meio de ligações peptídicas podem atuar como tampões. Diante disso, quando um aminoácido é titulado, sua curva de titulação indica a reação de cada grupo funcional com o íon hidrogênio, evidenciando as regiões de tamponamento. Na alanina, por exemplo, os grupos carboxila e amino são os grupos tituláveis. Em pH muito baixo, os dois grupos encontram-se protonados, fazendo com que o grupo amino apresente carga positiva e o ácido carboxílico não apresente carga, **Figura 03**, estrutura I. Sob essas condições, a alanina tem uma carga líquida positiva de 1. Ao se adicionar gradativamente equivalentes de  $\text{OH}^-$  a partir da adição de uma base forte, pode-se observar o efeito tamponante do ácido carboxílico, onde o grupo  $-\text{COOH}$  pode dissociar-se, doando um próton ao meio, resultando na formação do grupo carboxilato,  $-\text{COO}^-$ , **Figura 03**, estrutura II. Esta estrutura, predominante no ponto isoelétrico,  $\text{pI}$ , corresponde à forma isoelétrica da alanina, também denominada *zwitterion*, possuindo cargas positivas e negativas iguais e, portanto, não tendo nenhuma carga líquida. À medida que o pH da solução aumenta, pela adição de mais base, nota-se outra faixa tamponante, agora correspondente ao grupo amino protonado que, ao ceder seu próton, resulta na forma completamente desprotonada da alanina, **Figura 03**, estrutura III, sendo assim, a molécula passa a ter carga líquida negativa de 1 (CAMPBELL, FARRELL, 2007; HARVEY, FERRIER, 2012; WHITFORD, 2005). A curva de titulação da alanina corresponde a de um ácido diprótico, **Figura 04** (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

**Figura 03.** Ionização da alanina em função do pH.

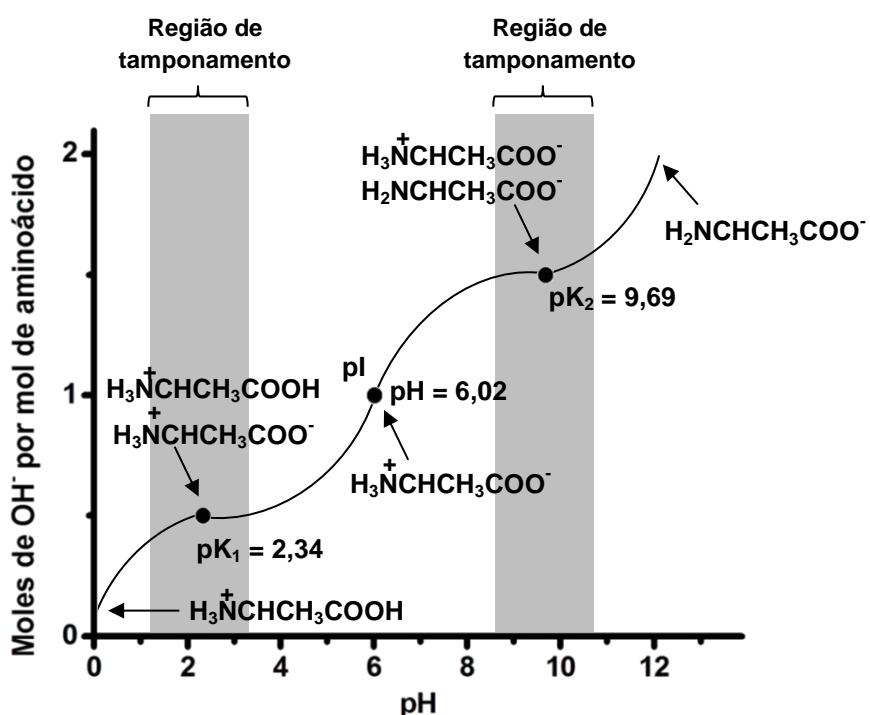
Fonte: (CAMPBELL, FARRELL, 2007)



Tendo em vista que os aminoácidos são capazes de se comportar como cátions ou ânions e podem ter a carga elétrica do grupo R variada, diferentes conformações estruturais são possíveis às proteínas, uma vez que os aminoácidos se relacionarão entre si de maneira variada.

**Figura 04.** Curva de titulação da alanina.

Fonte: (CAMPBELL, FARRELL, 2007)



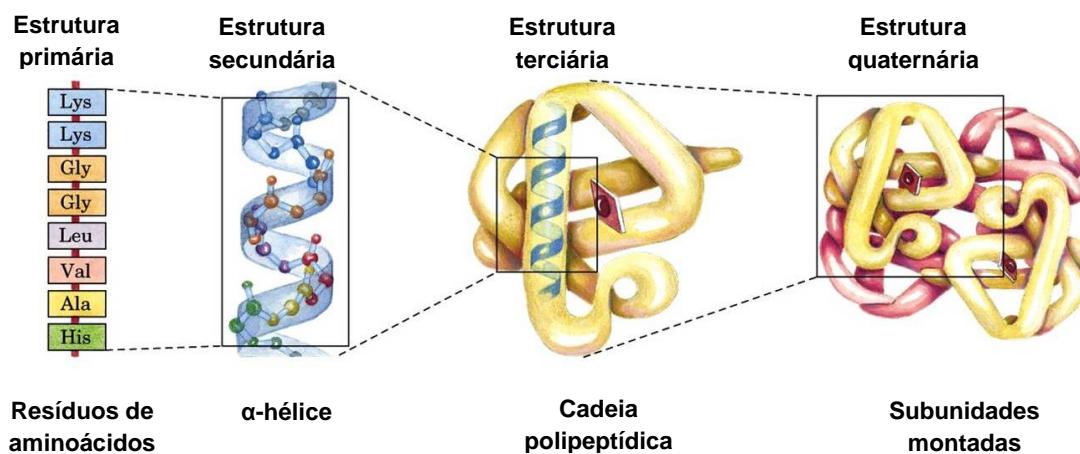
Proteínas são polímeros de aminoácidos que se unem covalentemente, formando longas cadeias não ramificadas, por meio de ligações peptídicas envolvendo o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro (NELSON, COX, 2014). Tais moléculas desempenham funções dinâmicas e estruturais no organismo, destacando-se as propriedades enzimáticas ou catalisadoras de reações bioquímicas, de sinalização e de transdução de sinais celulares, como também as funções de transporte de oxigênio no sangue (WHITFORD, 2005). Além disso, as proteínas estão diretamente relacionadas à defesa do organismo, sendo realizada por tipos específicos de proteínas, as imunoglobulinas (anticorpos) e o interferon, que atuam no combate das infecções bacterianas e virais (VOET, GREENWALD-VOET, PRATT, 1999; WHITFORD, 2005).

#### 4.1.1.1 Conformação espacial das proteínas

Cada proteína apresenta uma configuração tridimensional característica, determinada pela sequência de aminoácidos e pelo grau de inclinação entre as ligações químicas. Devido a complexidade de sua estrutura molecular, as proteínas são divididas em quatro níveis de estrutura, **Figura 05** (NELSON, COX, 2014).

**Figura 05.** Níveis de estrutura nas proteínas.

Fonte: (NELSON, COX, 2014)



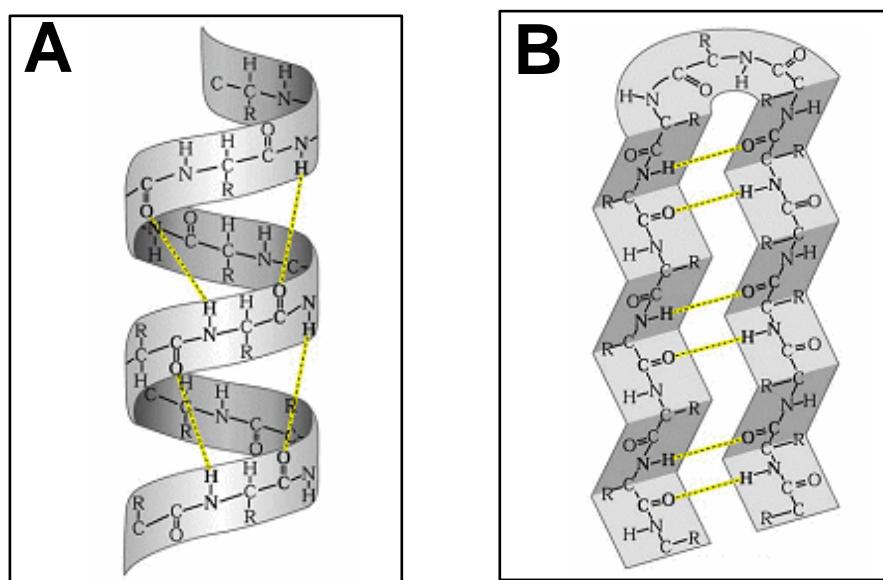
A estrutura primária da proteína corresponde à sequência dos aminoácidos na cadeia polimérica, determinada geneticamente pela sequência de nucleotídeos da molécula de DNA responsável por sua síntese. As cadeias polipeptídicas típicas contêm cerca de 100 a 600 moléculas de aminoácidos e tem um peso molecular de aproximadamente 15.000 a 70.000 Da. Nesta estrutura são encontradas ligações peptídicas e, dependendo da proteína, podem ser encontradas ligações dissulfeto que podem ser formadas pela cisteína, por exemplo (CAMPBELL, FARRELL, 2007; WHITFORD, 2005).

As sequências de aminoácidos podem formar ligações de hidrogênio entre os grupos amida N-H e os grupos carbonila C=O dando origem à estrutura secundária da proteína, que se constitui o arranjo espacial dos átomos que compõem a cadeia polipeptídica. Dois tipos de estruturas secundárias que ocorrem frequentemente nas proteínas são as estruturas de  $\alpha$ -hélice e folha  $\beta$  pregueada, ambas mantidas por ligações de hidrogênio (CAMPBELL, FARRELL, 2007; WHITFORD, 2005). A conformação em  $\alpha$ -hélice, **Figura 06A**, é conferida através do ângulo de rotação que os resíduos de aminoácidos apresentam na ligação peptídica, estabilizada por pontes de hidrogênio entre o oxigênio do grupamento carboxila de um  $\text{C}\alpha$  e o

hidrogênio do grupamento amino do outro aminoácido. A forma de folha  $\beta$  pregueada, **Figura 06B**, é possível graças a ligações de hidrogênio que podem ser formadas entre diferentes partes de uma mesma cadeia dobrada sobre si própria (ligações intracadeia) ou entre diferentes cadeias polipeptídicas (ligações intercadeia) (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

**Figura 06.** Estruturas secundárias das proteínas: (A)  $\alpha$ -hélice e (B) folha  $\beta$  pregueada, (—) ligação de hidrogênio.

**Fonte:** (MELHOR BIOLOGIA, 2013)



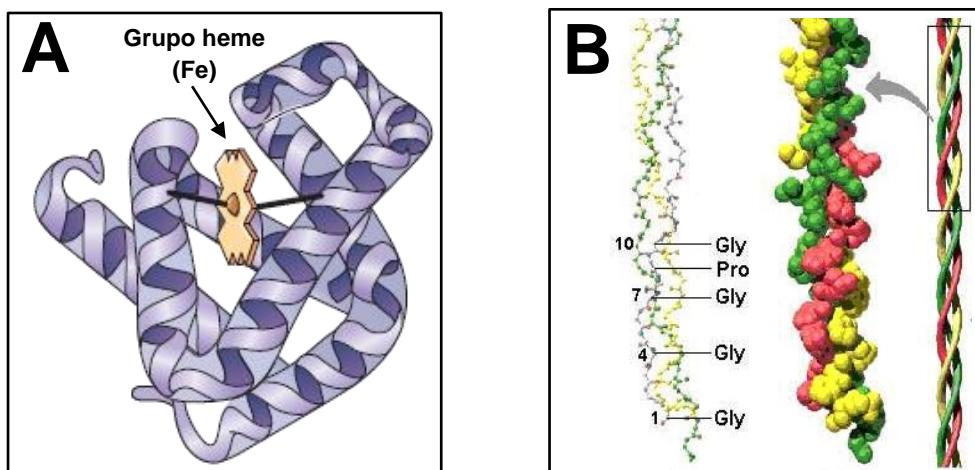
As interações estabelecidas entre os aminoácidos que constituem a proteína e a água induzem à coalescência e ao empacotamento da proteína levando a formação da estrutura terciária, que corresponde às relações da cadeia polipeptídica no sentido de estabilizar a conformação tridimensional. A fim de adquirir esta estabilidade, muitos tipos de interações químicas podem ocorrer dentro de uma molécula proteica. As mais fortes são as ligações covalentes, como a que ocorre entre dois aminoácidos cisteína que se unem através de ligações dissulfeto entre seus grupamentos  $-SH$  formando o complexo cistina. Além disso, a estabilidade da estrutura proteica tridimensional pode ser garantida por forças não-covalentes, como as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e interações fracas de van der Waals, existentes entre os grupamentos R (CAMPBELL, FARRELL, 2007; DAVIES, 1999; WHITFORD, 2005).

Uma proteína pode consistir em múltiplas cadeias polipeptídicas denominadas de subunidades. A associação não-covalente de uma subunidade com relação às outras é a estrutura quaternária da proteína (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

A conformação espacial final das proteínas (estrutura terciária ou quaternária) é o fator determinante das funções biológicas por elas exercidas. Duas conformações são possíveis às proteínas: proteínas globulares e fibrosas. As proteínas globulares, como a mioglobina, **Figura 07A**, são esferas compactas e irregulares resultantes do enovelamento da cadeia polipeptídica. São bastante solúveis em água e apresentam diferentes funções. As proteínas fibrosas, como o colágeno, **Figura 07B**, possuem formato cilíndrico, apresentam baixa solubilidade em água e possuem funções estruturais. Algumas proteínas podem apresentar os dois tipos de conformação, como o fibrinogênio (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

**Figura 07.** Tipos de conformações das proteínas: (A) mioglobina, proteína globular e (B) colágeno, proteína fibrosa.

Fonte: (CAMPBELL, FARRELL, 2007)



#### 4.1.1.2 Grupos prostéticos das proteínas

Há proteínas que apresentam em sua composição, grupos não protéicos ligados de forma covalente ou não aos aminoácidos que as compõem, denominados, genericamente, de grupo prostético. Os grupos prostéticos podem ser orgânicos, como por exemplo, uma vitamina ou um açúcar, ou inorgânicos, como por exemplo, um íon metálico. Proteínas que contêm um ou mais íons metálicos em sua estrutura, são denominadas metaloproteínas. A mioglobina, **Figura 07A**, é uma metaloproteína que possui em sua estrutura um grupo prostético, o grupo heme, que

consiste em um íon metálico, o Fe (II), o qual se liga de forma não covalente às cadeias peptídicas. A presença do grupo heme afeta completamente a conformação do polipeptídeo. A apoproteína, cadeia polipeptídica sem o grupo prostético heme, não se dobra tão fortemente quanto a molécula completa (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

Outros grupos importantes das proteínas conjugadas são as glicoproteínas e as lipoproteínas. As glicoproteínas são proteínas que possuem ligações covalentes a uma ou mais cadeias de oligossacarídeos, que são pequenos polissacarídeos, pertencentes à classe de carboidratos. Estas proteínas estão presentes na superfície celular, como por exemplo, a mucina, fazem parte de proteínas estruturais, como o colágeno, são hormônios, como por exemplo, o glucagon, ou receptores de membrana. Já as lipoproteínas são importantes transportadoras dos lipídios plasmáticos, principalmente os triglicerídeos e o colesterol, e possuem em sua estrutura lipídios conjugados às proteínas (CAMPBELL, FARRELL, 2007).

#### **4.1.2 Oxidação das proteínas *in-vivo***

Devido à sua abundância em células, quando comparadas com outras moléculas biológicas, as proteínas são alvos primários da oxidação *in-vivo*. A oxidação das proteínas ocorre por meio da exposição a espécies reativas, como as ERO ou ERN, geradas por reações metabólicas no interior das células, a partir dos produtos de reações de estresse oxidativo (STADTMAN, LEVINE, 2003), ou através da presença de fortes oxidantes. Todos estes fatores podem levar à formação de danos ou a modificações estruturais das proteínas (STADTMAN, 1992; STADTMAN, LEVINE, 2003).

As ERO e ERN encontradas nas células são geradas por via endógena, como consequência direta do metabolismo aeróbico, ou por fontes exógenas, devido à exposição à radiação ultravioleta, radiação ionizante, como também a partir de substâncias que são capazes de gerar estas espécies reativas, como os agentes carcinógenos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2003).

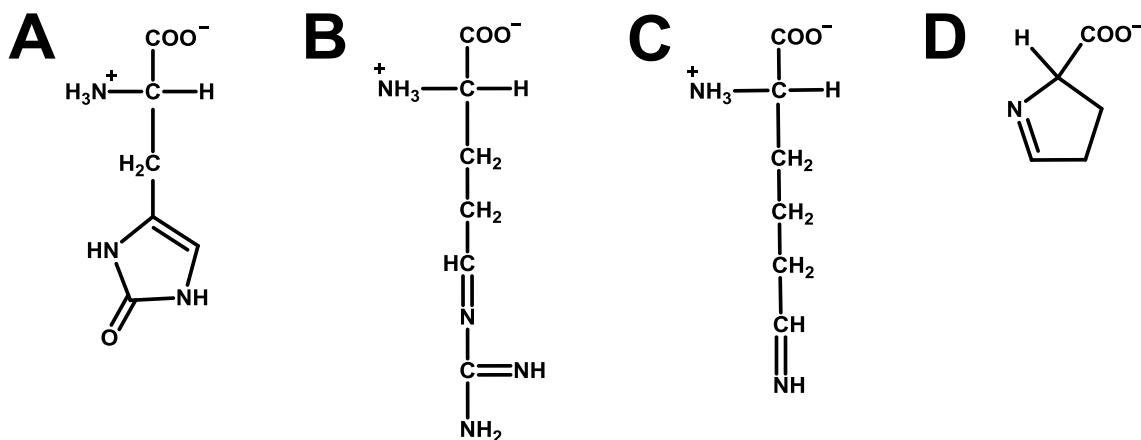
Danos em proteínas, provocados por meio da oxidação induzida por ERO e ERN, são conhecidos por causarem doenças neurológicas degenerativas, pulmonares, inflamação, doenças cardiovasculares entre outros problemas (SHACTER, 2000; STADTMAN, 1992; STADTMAN, LEVINE, 2003).

A oxidação das proteínas ocorre principalmente nas cadeias laterais dos aminoácidos. Entretanto, mesmo se apenas a cadeia lateral do resíduo de aminoácido for oxidada, toda a estrutura da proteína é modificada, comprometendo sua atividade *in-vivo*.

Resíduos de histidina podem ser facilmente oxidados à 2-oxohistidina, **Figura 08A**, e outros derivados. A oxidação dos resíduos de arginina, lisina e prolina levam à formação de derivados carbonílicos, **Figura 08B, C e D**, respectivamente (BARREIROS, DAVID, PEREIRA-DAVID, 2006; STADTMAN, LEVINE, 2003).

**Figura 08.** Produtos da oxidação dos resíduos de: (A) histidina, (B) arginina, (C) lisina e (D) prolina.

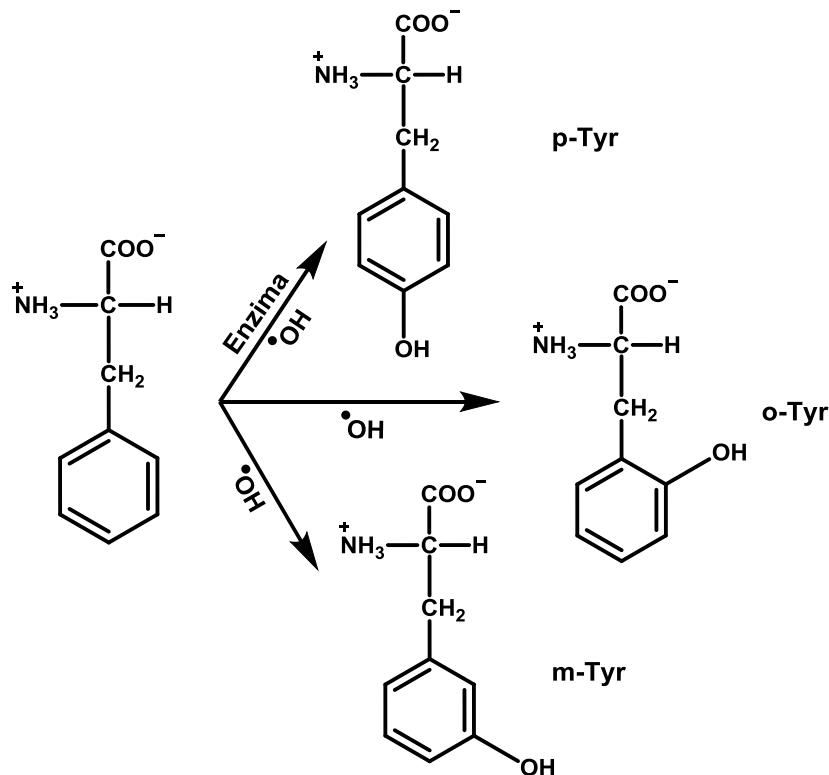
**Fonte:** (BARREIROS, DAVID, PEREIRA-DAVID, 2006)



O aminoácido essencial fenilalanina (Phe) pode ser oxidado, sendo convertido à *para*-tirosina (*p*-Tyr) através da enzima fenilalanina hidroxilase. Nenhuma outra isoforma de tirosina é formada durante esta reação enzimática. Na presença do radical livre de hidroxila, uma espécie reativa de oxigênio, Phe pode ser hidroxilada nas posições *para*, *meta* e *ortho*. Assim, *para*-, *meta*- e *ortho*-tirosina (*p*-, *m*-, *o*-Tyr) podem ser formados nesta reação radicalar, **Figura 09**. Dessa forma, *p*-Tyr pode ser formada naturalmente no organismo, como também através de processos oxidativos, enquanto *m*- e *o*-Tyr são marcadores seletivos de radicais livres de hidroxila (STADTMAN, LEVINE, 2003).

**Figura 09.** Reações de conversão da fenilalanina em *para*-, *ortho*- e *meta*-tirosina.

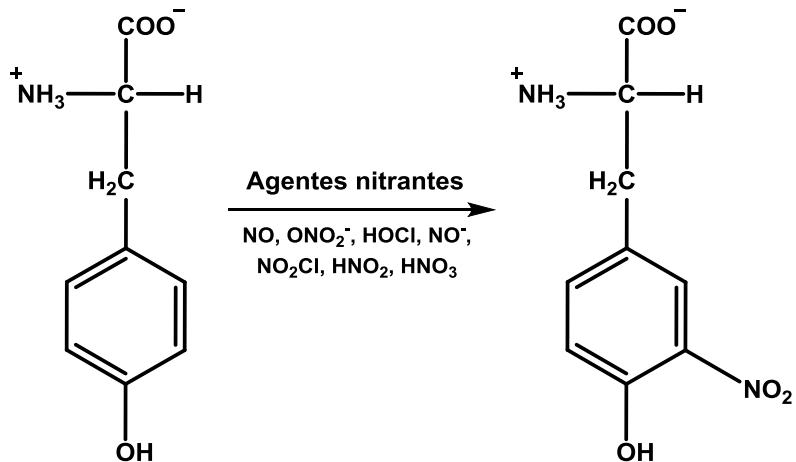
**Fonte:** (STADTMAN, LEVINE, 2003)



Outra molécula que pode sofrer oxidação e ter sua estrutura modificada a partir de espécies reativas, especificamente ERN, é a tirosina, um aminoácido aromático não essencial. A maioria das proteínas contém resíduos de tirosina em sua composição com uma abundância natural de cerca de 3% (HASEEB, 2013; RADI, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2016). A Tyr é levemente hidrofílica o que é explicado pelo seu anel hidrofóbico aromático contendo um grupo hidroxila. Como consequência, a tirosina é frequentemente exposta à superfície em proteínas e está, portanto, disponível para modificações adicionais, como a nitração, levando à formação de 3-nitrotirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), **Figura 10**, em alto rendimento, com uma pequena produção de 3,3'-ditirosina, 3,4-di-hidroxifenilalanina e os correspondentes quinona (HASEEB, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2016). A nitração dos resíduos de tirosina pode mudar completamente a estrutura e a conformação das proteínas que a contém, alterando sua função *in-vivo* (HASEEB, 2013).

**Figura 10.** Modificações causadas por ERN na tirosina.

Fonte: (HASEEB, 2013)



Devido às propriedades redox dos aminoácidos e de seus derivados, componentes das proteínas, o comportamento eletroquímico dessas espécies tem sido investigado nos últimos anos em diferentes substratos eletroquímicos, como eletrodos de ouro e carbono, utilizando técnicas voltamétricas (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OSTATNA *et al.*, 2012; WACKERBARTH, HILDEBRANDT, 2003). Uma revisão bibliográfica do comportamento voltamétrico de aminoácidos e proteínas é apresentada na seção 4.1.5.

#### 4.1.3 Determinação analítica dos derivados da tirosina: 3-nitro-, *ortho*- e *para*-tirosina

##### 4.1.3.1 3-Nitro-tirosina

A 3-nitro-tirosina foi a primeira molécula a ser proposta como biomarcador de estresse nitrosativo (BECKMAN *et al.*, 1992; RAMEZANIAN, PADMAJA, KOPPENOL, 1996), demandando o desenvolvimento de métodos analíticos para sua quantificação em amostras biológicas (TEIXEIRA *et al.*, 2016).

As primeiras tentativas de detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foram realizadas a partir de uma combinação de cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta (HPLC-UV) e métodos imunológicos. Embora as abordagens tenham demonstrado algum sucesso, ambas apresentam algumas limitações. A detecção com UV é suficientemente sensível para determinação de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr *in vitro*, entretanto, geralmente não é sensível o suficiente para quantificação de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr *in-vivo*. A medição de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em plasma humano foi realizada utilizando HPLC

de fase reversa com detecção por UV, no entanto, poucos estudos semelhantes foram relatados (HENSLEY, WILLIAMSON, FLOYD, 2000).

A espectrometria de massa também foi utilizada para detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, entretanto, este método exige equipamento especializado e de custo elevado, preparação extensiva da amostra, e padrões internos isotopicamente rotulados, o que pode tornar o método inviável para análise (SALMAN-TABCHEH, GUERIN, TORREILLES 1995). HPLC com detecção eletroquímica (ECD) tem sido apresentada como uma alternativa que permite uma determinação fácil, sensível e seletiva da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (HENSLEY *et al.*, 1999; HERCE-PAGLIAI, KOTECHA, SHUKER, 1998; SHIGENAGA *et al.*, 1997), apesar das limitações inerentes da cromatografia, especialmente em relação ao tempo de análise. Por muito tempo, detectores eletroquímicos têm sido utilizados para medição de catecolaminas, xenobióticos e nucleotídeos oxidados (HENSLEY *et al.*, 1999), mas apenas recentemente, o ECD foi utilizado na análise de proteínas e lipídios. A principal diferença entre o ECD e outras formas de detecção por HPLC é que o analito a ser analisado experimenta uma transformação química, oxidação ou redução ao atingir o detector. A corrente gerada por essa reação redox depende da estrutura do analito, sendo proporcional à sua concentração. Compostos fenólicos são bastante adequados para fins de detecção por ECD, pois eles normalmente se oxidam em potenciais baixos (200–800 mV) e são bem retidos na fase reversa das colunas de HPLC (HENSLEY, WILLIAMSON, FLOYD, 2000).

Métodos baseados em ELISA oferecem um meio alternativo para detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Tais métodos são de alto rendimento, relativamente baratos e não envolvem preparação extensiva de amostras, contudo, apresentam baixa sensibilidade e são frequentemente semi-quantitativos (KHAN *et al.*, 1998; FRANZE *et al.*, 2004). Ensaios ELISA são muitas vezes incapazes de detectar a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em uma alta proporção de amostras de soro humano.

Um ensaio ELISA de alto rendimento, baseado em uma plataforma eletroquimioluminescente (ECL), foi desenvolvido para medição da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. O método ECL usa uma corrente elétrica para produzir luminescência. A corrente elétrica é transmitida ao complexo anticorpo/antígeno através de eletrodos de carbono contidos na base da placa de ELISA (KNIGHTA *et al.*, 2018).

#### 4.1.3.2 *Orto-tirosina*

Desde os anos 1990, a *orto-tirosina* tem sido caracterizada como um indicador de radicais hidroxila e estresse oxidativo, o que desencadeou o desenvolvimento de vários métodos para sua detecção, como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa e espectroscopia de massa (HALLIWELL, KAUR, 1997; HEINECKE *et al.*, 1999; KAUR *et al.*, 1988; KAUR, HALLIWELL, 1994; LI *et al.*, 2003; REDDY *et al.*, 1999).

A detecção da *o-Tyr* em proteínas foi realizada com precisão e em níveis baixos utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC/MS). Este ensaio seria eficiente no processo de detecção por eliminar a interferência de fatores não proteicos (BLOUNT, 1997). Métodos analíticos baseados em ELISA se apresentam como alternativas que minimizam algumas possíveis interferências (BUSS *et al.*, 1997; CAO, CUTLER, 1995).

PAL *et al.* (1988) propuseram um método de detecção e estimativa de *o-Tyr* em alimentos utilizando a fluorimetria, onde analisaram a absorção e a fluorescência da *o-Tyr* e verificaram bandas máximas de absorção e fluorescência em 270 nm e 305 nm, respectivamente, em meio ácido e neutro.

#### 4.1.3.3 *Para-tirosina*

Diferentes métodos têm sido apresentados na literatura para detecção de *p-Tyr*, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Zhu *et al.*, 2010; YOU *et al.*, 2003; ZHEN *et al.*, 2011), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (ISHII *et al.*, 2006), cromatografia de troca iônica (RAVINDRAN, BRYDEN, 2005), eletroforese capilar (SIMIONATO *et al.*, 2008; UNDERBERG, WATERVAL, 2002), fluorimetria (SIKORSKA *et al.*, 2008) e quimioluminescência (LIANG, SONG, 2005; COSTIN, FRANCIS, LEWISM, 2003; HANAOKA, LIN, YAMADA, 2000). Entretanto, a maioria desses métodos consome muito tempo, tanto no preparo da amostra quanto na análise, além de exigir equipamentos altamente sofisticados e de custo elevado, tornando-os inviáveis para análise de rotina. Em contrapartida, a detecção de *p-Tyr* por via eletroquímica tem sido considerada como uma abordagem analítica viável, por ser simples, de baixo custo e permitir análises rápidas.

#### 4.1.4 Técnicas voltamétricas

A voltametria baseia-se na medida da corrente (sinal de resposta) em uma célula eletroquímica, que flui através do eletrodo de trabalho em função do potencial aplicado (sinal de excitação). A aplicação de um potencial ao eletrodo dá origem a uma corrente faradaica,  $I_f$ , que está relacionada à transferência de carga, e uma corrente capacitiva,  $I_c$ , que é necessária para organizar as moléculas e íons presentes na dupla camada, região interfacial onde ocorrem as reações eletroquímicas. Ambas as correntes são proporcionais à velocidade de varredura utilizada (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993). Assim, a corrente total,  $I_t$ , registrada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

A curva de corrente ( $I$ ), em amperes (A), em função do potencial alicado ( $E$ ), em volts (V), registrada durante o ensaio voltamétrico é designada voltamograma ou onda voltamétrica. Atualmente, as técnicas voltamétricas mais utilizadas em eletroanálise são a voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e de voltametria de onda quadrada (SWV) (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006), sendo aplicadas na área médica, no desenvolvimento de mecanismos de reações redox e de novas metodologias analíticas para fármacos e compostos biológicos, tendo em vista que possuem elevadas sensibilidade, seletividade e adaptabilidade. Diante disso, têm sido propostos na literatura inúmeros mecanismos de reação redox a partir de estudos voltamétricos (OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013; PONTINHA *et al.*, 2012).

##### 4.1.4.1 Voltametria cíclica

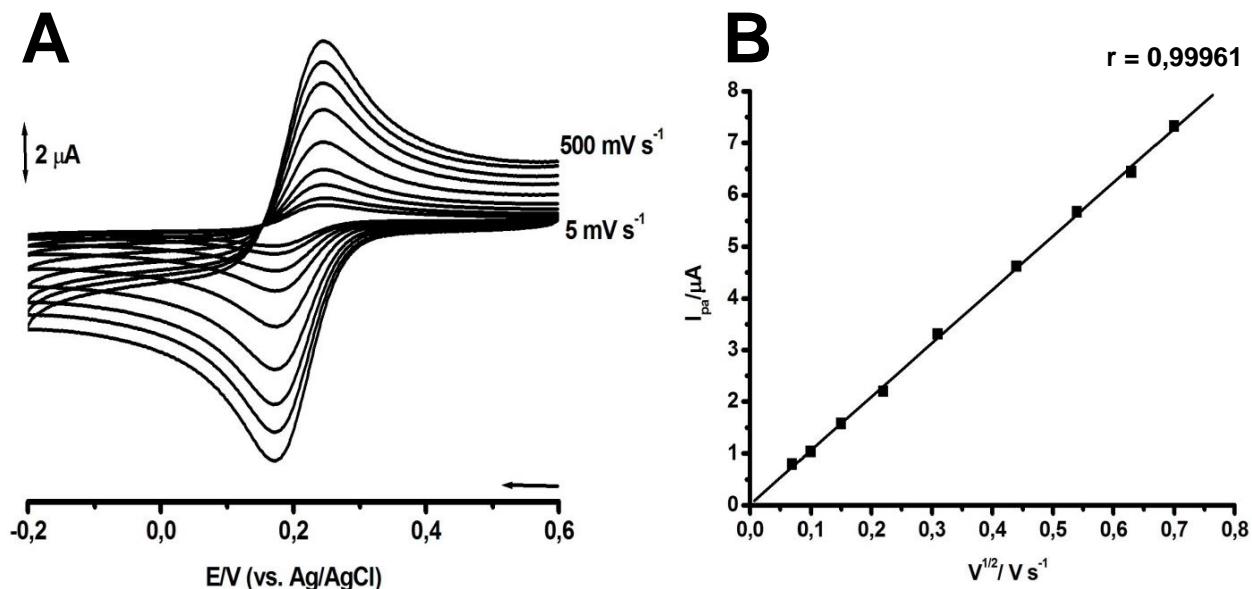
A voltametria cíclica (CV – “Cyclic Voltammetry”) é uma técnica eletroanalítica amplamente empregada na obtenção de informações qualitativas sobre as reações eletroquímicas. Além disso, é bastante utilizada no estudo de reações redox, tendo em vista que possibilita a detecção de intermediários de reação, bem como a observação e o acompanhamento de reações que envolvem produtos formados na superfície dos eletrodos (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; SKOOG *et al.*, 2008).

Na CV, a aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho, varia de forma linear a uma velocidade de varredura constante,  $v = dE / dt$ , entre um potencial inicial

( $E_i$ ), e um potencial final ( $E_f$ ), previamente escolhidos, oscilando ciclicamente entre um valor de potencial máximo ( $E_{\max}$ ) e um valor de potencial mínimo ( $E_{\min}$ ), onde o sentido da varredura de potencial pode ser positivo ou negativo (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993, SKOOG *et al.*, 2008).

A variação da corrente em função do potencial aplicado é representada graficamente, ao qual se denomina de voltamograma cíclico. Este apresenta os picos de corrente que correspondem às semi-reações de oxidação e/ou redução que ocorrem no eletrodo. Na **Figura 11A**, está representado um voltamograma cíclico típico para um processo de transferência de carga reversível, referente ao comportamento do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , em GCE, onde verifica-se a existência de dois processos redox, um pico catódico na varredura em sentido direto, que corresponde à redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e um pico anódico na varredura em sentido reverso, associado à oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Além disso, foi possível observar que a corrente do pico anódico aumenta linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $r = 0,999$ ), indicando que o transporte de massa do íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  à superfície do eletrodo é controlado predominantemente por difusão, **Figura 11B** (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993).

**Figura 11.** Voltametria cíclica: (A) CVs do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  1 mmol L<sup>-1</sup>, em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para diferentes velocidades de varredura (5-500 mV s<sup>-1</sup>), em GCE ( $\phi = 1,6$  mm).



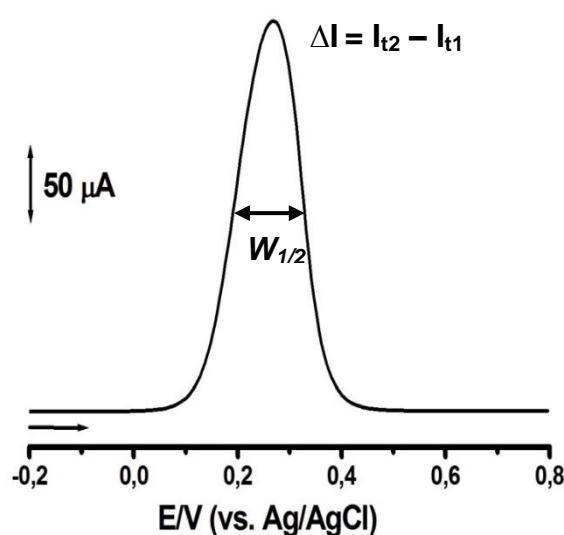
As correntes de pico possuem uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reação de transferência de carga, e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reação (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993).

#### 4.1.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV – “*Differential Pulse Voltammetry*”) baseia-se na diferente velocidade de decaimento das correntes capacitiva e faradaica depois da aplicação de um pulso de potencial. Após a aplicação do pulso, a corrente capacitiva decai exponencialmente com o tempo, e a corrente faradaica, proveniente da reação eletroquímica, decai a uma velocidade menor, proporcional a  $1/t^{1/2}$ , sendo a corrente total medida no final do pulso. Essa propriedade confere uma maior sensibilidade à técnica de pulso diferencial.

Na voltametria de DP, pulsos de potencial sucessivos com uma amplitude de pulso  $\Delta E_p$  são aplicados ao eletrodo de trabalho, em intervalos periódicos de tempo  $\tau$  sobre uma escada de potencial com degraus  $\Delta E_s$ . A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim deste, e então se registra a diferença entre as duas correntes,  $I_f = I_{t2} - I_{t1}$ , obtendo-se o valor final da corrente,  $I_f$ . Nesta subtração os resíduos da corrente capacitativa são eliminados (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; SOUZA *et al.*, 2003; WANG, 2006). A partir disso, obtém-se uma curva diferencial, **Figura 12**, onde a altura dessa curva é diretamente proporcional à concentração da espécie química investigada.

**Figura 12:** DPV do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,0625 mol L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato, pH = 7,0, em GCE ( $\phi = 2,0$  mm),  $v = 5$  mV s<sup>-1</sup>.



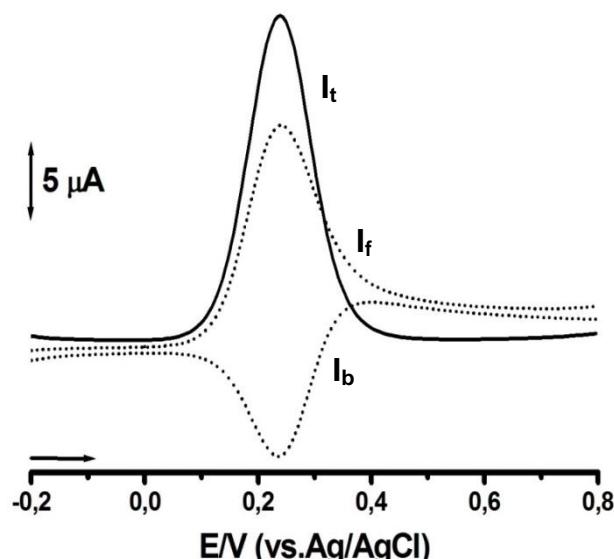
O tempo  $\tau$ , em que o pulso de potencial é aplicado define a largura do pulso. Em contrapartida, o tempo  $\tau$  multiplicado ao  $\Delta E_s$  determina a velocidade de varredura ( $v$ ), que, em DPV, varia entre 1 e 10 mV s<sup>-1</sup>. Durante a escolha da

amplitude para o pulso de potencial  $\Delta E_p$ , deve-se considerar a reação em estudo e a sensibilidade exigida, tendo em vista que grandes amplitudes geram correntes capacitivas residuais que podem diminuir a detecção da corrente faradaica. Para pequenas amplitudes de pulso, a largura a meia altura,  $W_{1/2}$ , é inversamente proporcional ao número de elétrons transferidos ( $W_{1/2} = 90/n$ ), o que permite caracterizar o mecanismo da reação de transferência de carga. A intensidade do pico de corrente,  $I_p$ , é proporcional à concentração do analito e depende da velocidade da reação eletroquímica.

#### 4.1.4.3 Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV – “Square Wave Voltammetry”) é resultado da combinação de uma onda quadrada de amplitude de pulso  $\Delta E_p$  de larga amplitude e uma escala de potencial com degraus de amplitude  $\Delta E_s$ , com período  $\tau$ . Como consequência da construção da onda, um pulso de potencial positivo (direto),  $I_f$  - *forward current*, é aplicado ao eletrodo durante a metade do ciclo que se segue, e um pulso de potencial negativo (reverso),  $I_b$  - *backward current*, é aplicado na metade restante, durante cada ciclo de frequência  $f = \tau^{-1}$ . A medição da corrente é realizada antes do fim de ambos os pulsos, o que diminui o efeito da corrente capacitiva sobre a corrente total medida. A diferença entre as correntes direta e reversa dão origem à corrente total registrada,  $\Delta I$  ou  $I_t$ . Dessa forma,  $I_t = I_f - I_b$ . O sinal resposta das correntes total, direta e reversa é apresentado na **Figura 13** (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

**Figura 13.** SWV do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  0,0625 mol L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato, pH = 7,0, em GCE ( $\phi = 2,0$  mm),  $I_t$  - corrente total,  $I_f$  - forward (corrente direta) e  $I_b$  - backward (corrente reversa).



O método de medição e o tratamento da corrente são responsáveis por uma maior sensibilidade desta técnica para reações reversíveis. Além disso, a SWV apresenta como vantagem, em relação à DPV, a possibilidade de serem realizadas análises a velocidades elevadas, o que diminui o consumo de espécies eletroativas durante a análise, reduzindo também os problemas de bloqueio da superfície do eletrodo. A voltametria de SW tem grande importância para o estudo da reversibilidade de uma reação, tendo em vista que completa a informação obtida através da voltametria cíclica (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993).

#### **4.1.5 Estudo voltamétrico das proteínas**

Um estudo eletroquímico dos aminoácidos utilizando voltametria foi demonstrado pela primeira vez em 1960 a partir de estudos do processo de oxidação eletroquímica da cisteína (Cys) em cistina (CySS) utilizando eletrodos de ouro e platina (PRADAC; KORYTA, 1968). Entretanto, a atividade eletroquímica das proteínas que não continham Cys e CySS ou um grupo prostético eletroquimicamente ativo, como grupamentos heme ou centros redox de ferro-enxofre ou cobre, não foi relatada até o início dos anos 80. Em 1980, foi demonstrada pela primeira vez a oxidação direta de proteínas, gerada pelos resíduos de aminoácidos, em eletrodos sólidos (REYNAUD *et al.*, 1980; BRABEC *et al.*, 1980; BRABEC *et al.*, 1981).

A eletroquímica das proteínas baseada em resíduos de aminoácidos é fortemente dependente do pH, como também depende da interação da proteína com a superfície do eletrodo, levando à adsorção (BRABEC, MORNSTEIN, 1980; REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980). Este processo de adsorção dificulta o estudo eletroquímico das proteínas e das enzimas devido ao bloqueamento da superfície do eletrodo e à ocorrência de modificações estruturais nas proteínas, ou até mesmo a sua degradação. Além disso, a orientação desfavorável da proteína na superfície do eletrodo reduz a acessibilidade dos seus centros eletroativos protegidos no interior das cadeias polipeptídicas, o que dificulta a oxidação eletroquímica da proteína (SHEN, HUANG, HU, 2002; ZHANG *et al.*, 2007). Considerando essas dificuldades, foi recentemente sugerida uma nova metodologia analítica em que a proteína é previamente desnaturada, utilizando agentes desnaturantes como ditiotreitol e dodecil sulfato de sódio, facilitando assim o contato dos resíduos dos aminoácidos eletroativos com a superfície do substrato

eletroquímico utilizado (OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; SANTARINO, OLIVEIRA, OLIVEIRA-BRETT, 2014).

Dos 20 aminoácidos principais constituintes das proteínas, a tirosina (OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980; SANTARINO, OLIVEIRA, OLIVEIRA-BRETT, 2014), o triptofano (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013), a histidina (ZHOU *et al.*, 2017), a cisteína (CAO *et al.*, 2018) e a metionina (HOOSHMAND, ES'HAGHI, 2017), são eletroativos em eletrodos de carbono,

#### Quadro 02.

**Quadro 02.** Potenciais de oxidação dos aminoácidos eletroativos em GCE, pH = 7,0.

**Fonte:** (OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013).

Aminoácido	Potencial / V (vs. Ag/AgCl) pH = 7,0
Tirosina (Tyr)	+ 0,65 V
Triptofano (Trp)	+ 0,65 V e + 1,05 V
Histidina (His)	+ 1,25 V
Cisteína (Cys)	+ 0,69 V, + 0,92 V e + 1,33 V
Metionina (Met)	+ 1,35 V e + 1,05 V

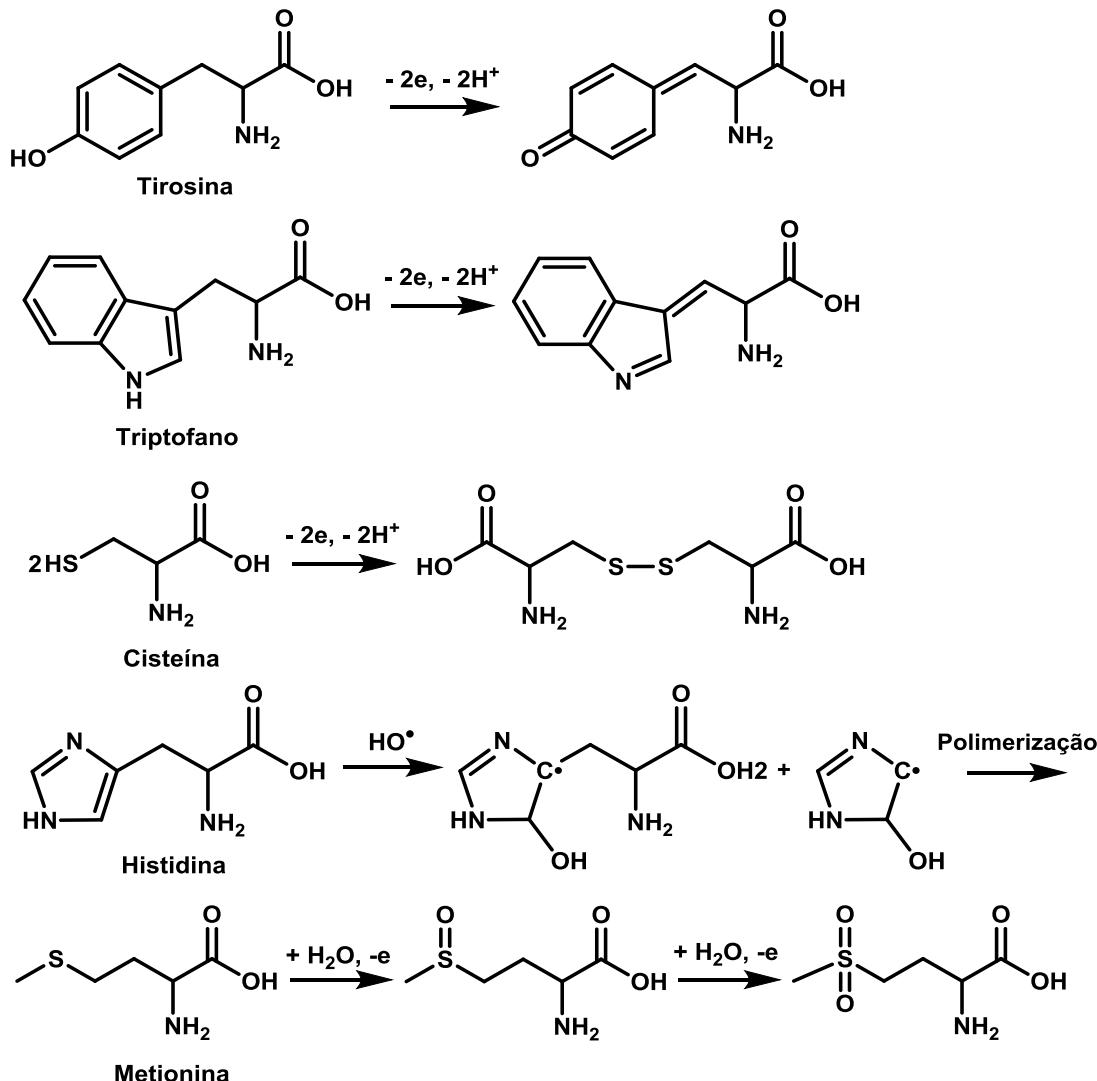
As moléculas tirosina e triptofano apresentam em suas estruturas os grupos fenol e indol que podem ser oxidados eletroquimicamente. A oxidação da Tyr ocorre em um único processo anódico, e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, ocorrendo a conversão do grupo fenol da Tyr em um produto quinônico (OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980; SANTARINO, OLIVEIRA, OLIVEIRA-BRETT, 2014). No caso do triptofano sua oxidação ocorre em dois processos anódicos e envolve a transferência de dois elétrons e dois prótons, levando a formação de 2-oxindolalanine (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA-BRETT, 2013; REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980).

Histidina, cisteína e metionina podem ser oxidadas eletroquimicamente devido suas cadeias laterais (ARDAKANI *et al.*, 2007; REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980; ZHOU *et al.*, 2007). Os centros eletroativos são o grupo

imidazol, no caso da histidina, o grupo tiol, na cisteína e a metionina apresenta um átomo de enxofre que pode ser oxidado (REYNAUD, MALFOY, CANESSON, 1980). Todos os produtos formados a partir das reações de oxidação dos aminoácidos tirosina, triptofano, histidina, cisteína e metionina encontram-se no **Esquema 01**.

**Esquema 01.** Reações de oxidação da Tyr, Trp, His, Cys e Met.

**Fonte:** (SUPRUN *et al.*, 2014)



## 4.2 Resultados experimentais

### 4.2.1. Oxidação da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo

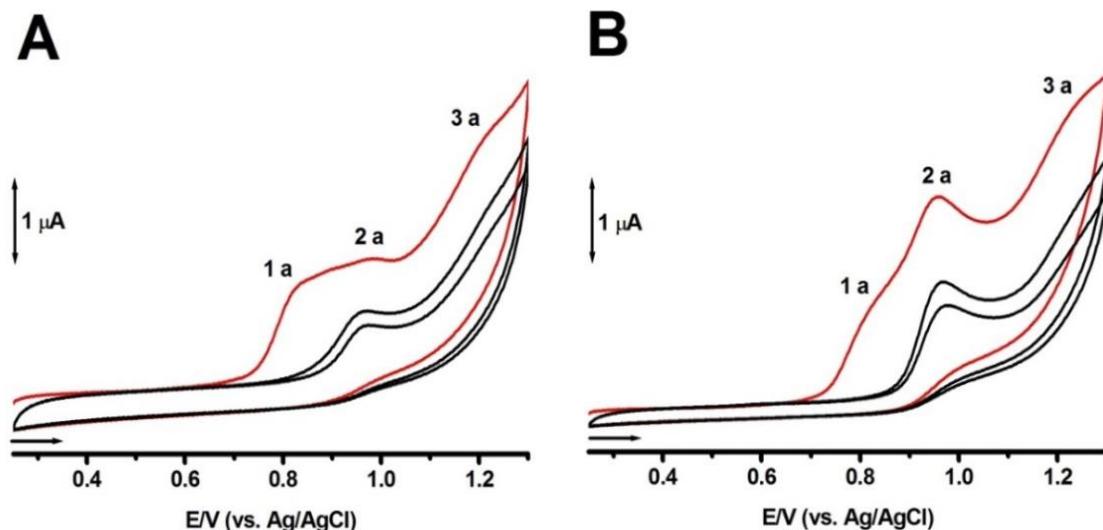
#### 4.2.1.1 Voltametria cíclica

A eletro-oxidação do biomarcador de estresse oxidativo 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi investigada sobre o GCE utilizando CV em soluções de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr de diferentes concentrações (100 µmol L<sup>-1</sup> e 500 µmol L<sup>-1</sup>) em tampão fosfato, pH = 7,0.

Voltamogramas sucessivos de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , **Figura 14A**, revelaram na primeira varredura de potencial numa janela de 0,2 V a 1,3 V, a presença de três picos anódicos (pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,83$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,96$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,21$  V) associados à processos de oxidação na molécula. Além disso, na varredura reversa de potencial nenhum pico catódico foi detectado demonstrando que os três processos de oxidação são irreversíveis. Entretanto, a partir da segunda varredura apenas o pico 2a foi detectado demonstrando claramente um bloqueio de sítios eletroativos da superfície do GCE, devido, provavelmente, a adsorção dos produtos de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.

Estudo semelhante foi realizado para uma solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . CVs foram registrados em pH = 7,0, **Figura 14B**, onde foram identificados três picos anódicos bem resolvidos e irreversíveis, tal como no resultado anterior, porém mais definidos (pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,82$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,96$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,22$  V). A partir da segunda varredura, foi observado uma diminuição na intensidade de corrente do processo anódico 2a e o desaparecimento dos processos 1a e 3a. Este comportamento pode ser justificado por uma provável rota de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com produção de um polímero, o qual adsorve e modifica a superfície do GCE.

**Figura 14.** CVs sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr obtidos em tampão fosfato pH = 7,0: (A) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (B) 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>, (—) primeira varredura de potencial.

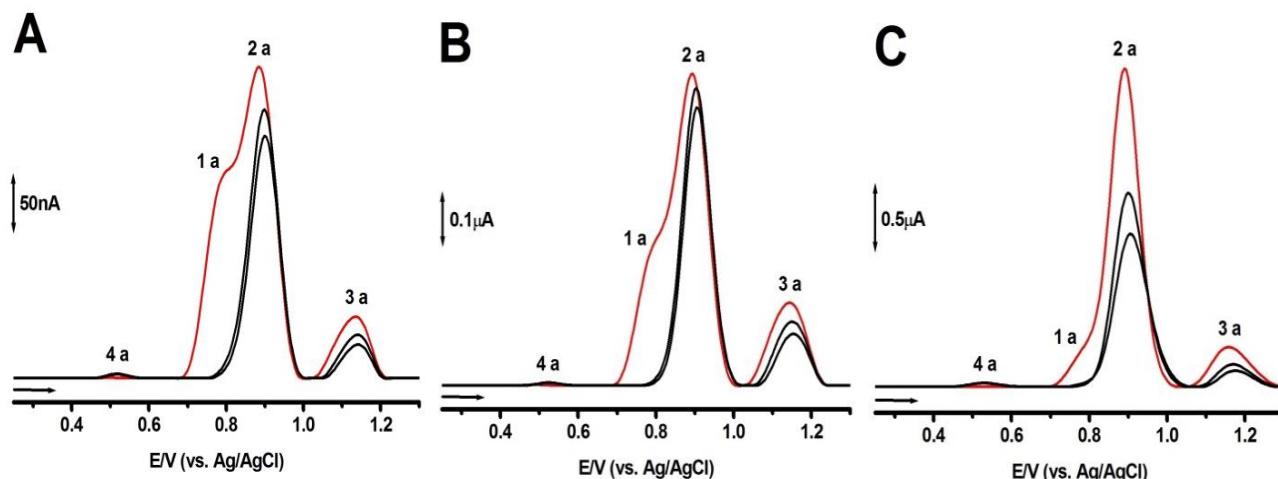


#### 4.2.1.2 Voltametria de pulso diferencial

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi avaliada sobre GCE utilizando DPV em tampão fosfato, pH = 7,0, a partir de soluções de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , **Figura 15**. Voltamogramas de DP de uma solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$

<sup>1</sup> revelaram, na primeira varredura de potencial, o aparecimento de três picos anódicos (pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,79$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,88$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,13$  V). A partir da segunda varredura foi observado um novo pico anódico, pico 4a,  $E_{p4a} = + 0,51$  V, que, possivelmente, corresponde a um produto de oxidação eletroativo da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, **Figura 15A**. Os DPVs obtidos a partir de uma solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ <sup>1</sup>, também demonstraram a presença de três picos anódicos na primeira varredura de potencial (pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,79$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,89$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,14$  V). A partir da segunda varredura de potencial foi verificada a existência do pico anódico 4a,  $E_{p4a} = + 0,52$  V, **Figura 15B**. Assim como nos resultados anteriores, os voltamogramas obtidos em soluções de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentaram três picos anódicos (pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,77$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,89$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,16$  V) e, a partir da segunda varredura de potencial, foi observado a presença do pico anódico 4a,  $E_{p4a} = + 0,52$  V, **Figura 15C**.

**Figura 15.** DPVs (com correção de linha de base) sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr obtidos em tampão fosfato pH = 7,0: (A) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (C) 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (—) primeira varredura.

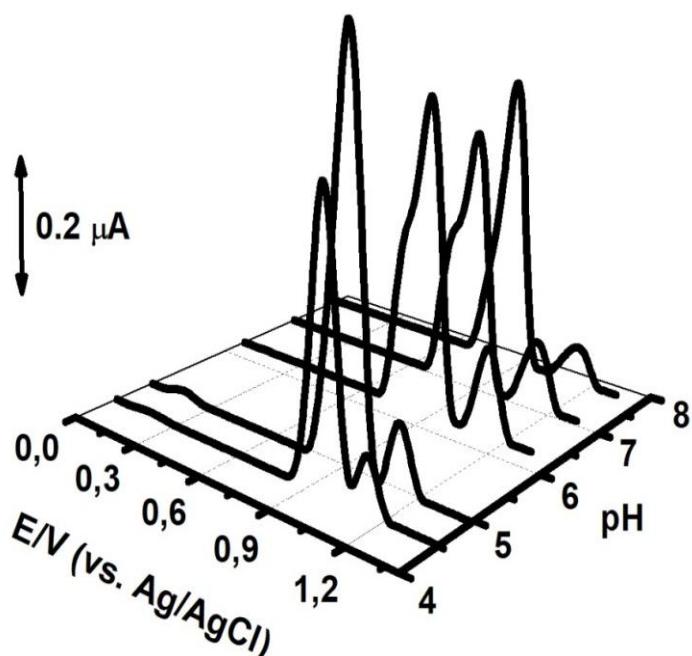


A influência do pH foi investigada por DPV numa ampla faixa de pH, entre 4,5 e 7,81, **Figura 16**. Verificou-se que uma inclinação de ~59 mV por unidade de pH para o segundo processo de oxidação, pico 2a, demonstrando a participação de igual número de prótons e elétrons no processo (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993). Considerando os valores da largura de pico a meia-altura ( $W_{1/2} = 117$  mV), para este processo de oxidação, concluiu-se que o processo anódico 2a ocorre com a transferência de apenas um elétron (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993) e, consequentemente, um próton, em função do coeficiente Nernstianiano de ~59mV

verificado para o processo. Em relação ao processo anódico 3a, considerando os valores da largura a meia-altura ( $W_{1/2}$ ),  $\sim 100$  mV, verificou-se que este processo de oxidação ocorre com a transferência apenas de um único elétron, não envolvendo prótons.

Os resultados por DPV em diferentes meios também demonstraram claramente uma melhor resposta eletroquímica em termos de corrente para a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em meio ácido, pH = 5,0, e para o processo anódico 2a, **Figura 16**.

**Figura 16.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) obtidos em solução 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em função do pH.



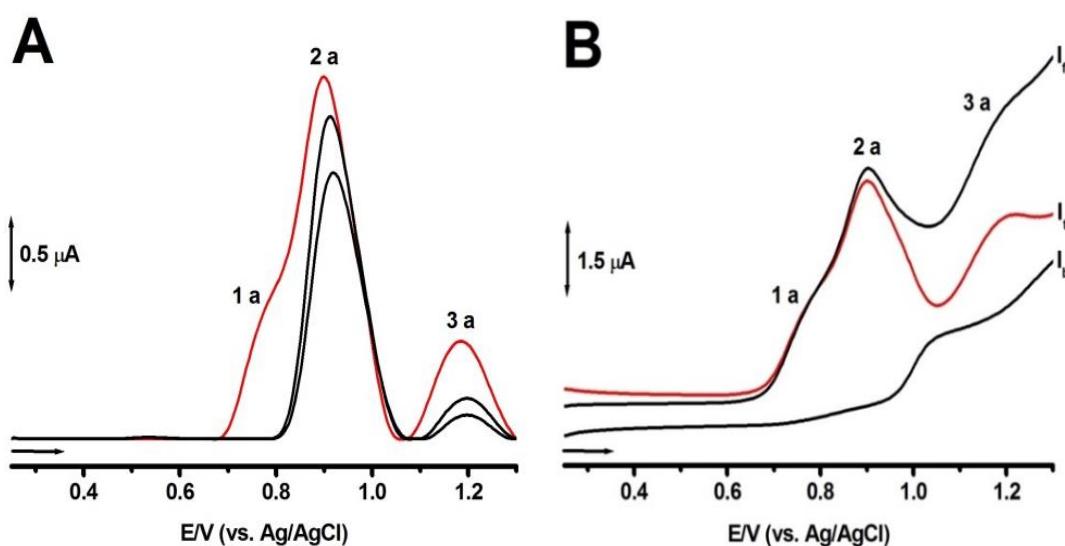
#### 4.2.1.3 Voltametria de onda quadrada

O comportamento de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi investigado por SWV, numa solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , preparada em tampão fosfato, pH = 7,0, **Figura 17**. Os SWVs registrados demonstraram a presença de três picos anódicos, pico 1a,  $E_{p1a} = + 0,78$  V, 2a,  $E_{p2a} = + 0,89$  V e 3a,  $E_{p3a} = + 1,18$  V, assim como foi observado nos resultados obtidos por CV e DPV.

A irreversibilidade das etapas de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, picos 1a, 2a e 3a, foi confirmada através do exame das componentes direta ( $I_f$ ) e reversa ( $I_b$ ) obtidas a partir da corrente total ( $I_t$ ), **Figura 17A**, cujo gráfico mostra claramente a completa inexistência de corrente reversa. Esses resultados estão em concordância com os

resultados obtidos por CV, **Figura 17B**, atestando a conclusão quanto a irreversibilidade dos três processos de oxidação.

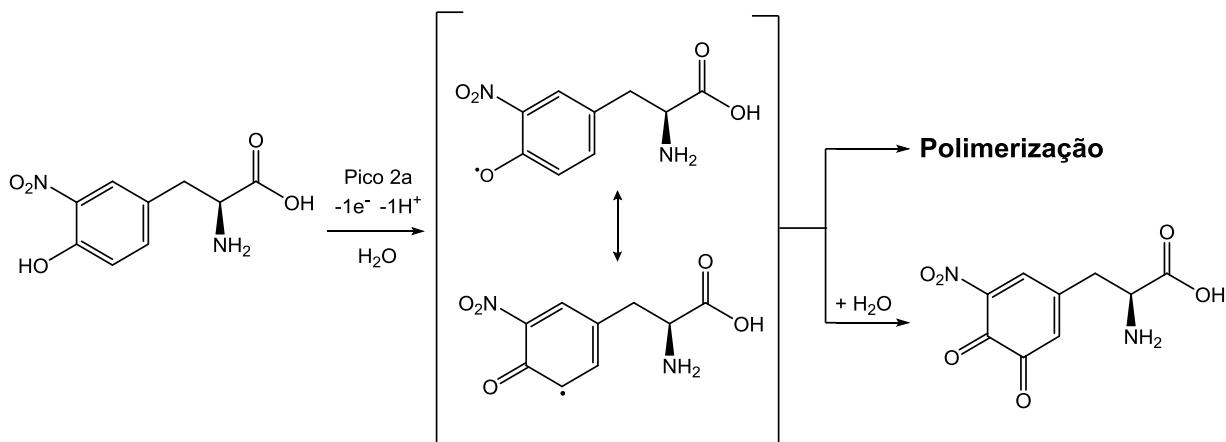
**Figura 17.** SWVs da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pH = 7,0: (A) (—) primeira varredura e (B) (—)  $I_t$  - corrente total, (—)  $I_f$  - corrente direta e (—)  $I_b$  - corrente reversa,  $v_{ef} = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .



#### 4.2.2 Mecanismo de oxidação da 3-nitro-tirosina

A molécula de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr contém um grupo fenólico em sua estrutura. Com base nos resultados voltamétricos acima, juntamente com outros dados da literatura (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2011; FERNANDES *et al.*, 2012; OLIVEIRA, NASCIMENTO, 2013), foi proposto um mecanismo de oxidação para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em relação ao processo anódico 2a, **Esquema 02**. Concluiu-se que esse processo de oxidação consiste na retirada de um elétron e um próton do grupo fenol. O primeiro passo da oxidação eletroquímica do fenol envolve a formação do radical fenóxido. Em seguida, este radical pode reagir de duas maneiras distintas: por um lado o radical pode reagir entre si, iniciando a polimerização, e, se for este o caso, o produto polimérico formado pode adsorver fortemente na superfície do GCE. Noutra possível rota, o radical é oxidado e dá origem a um produto com grupos quinona em sua estrutura.

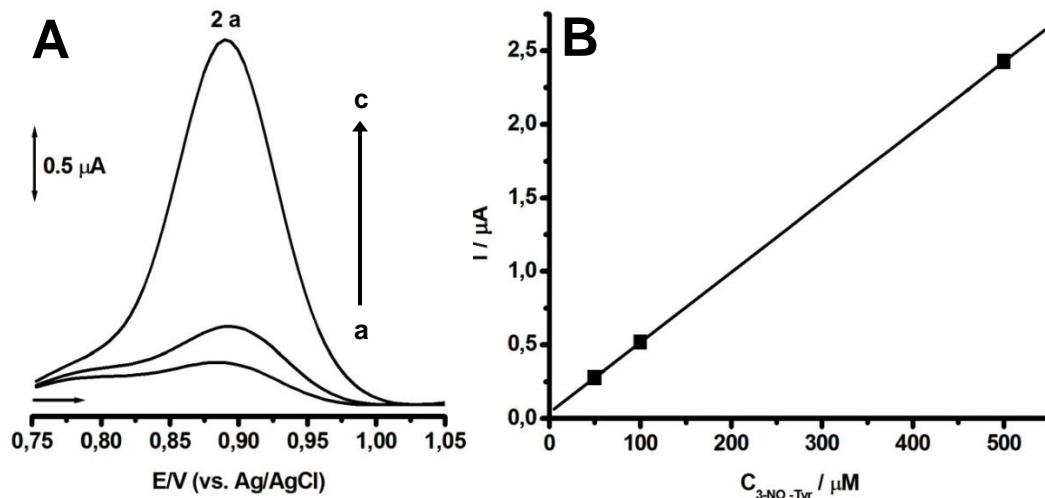
**Esquema 02.** Mecanismo de oxidação proposto para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.



#### 4.2.3 Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina

A voltametria de DP foi utilizada para investigar a possibilidade de quantificação eletroanalítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Os resultados foram obtidos em tampão fosfato, pH= 7,0, em concentrações de 50, 100 e 500 μmol L<sup>-1</sup>, **Figura 18A**. Verificou-se um aumento linear da intensidade de corrente do pico 2a com a concentração de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, sobre a superfície do GCE. Dessa forma, foi possível construir uma curva analítica relacionando a concentração à corrente, **Figura 18B**. O gráfico mostra uma excelente linearidade de resposta entre a concentração e a corrente do pico anódico 2a, com um coeficiente de correlação, *r* = 1. Esses resultados exploratórios demonstraram claramente a possibilidade da utilização do sinal eletroquímico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr para sua quantificação nas condições experimentais investigadas.

**Figura 18.** (A) DPV (com correção de linha de base) de uma solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em diferentes concentrações, em pH= 7,0 e (B) Curva analítica ( $I_{pa}/[3\text{-NO}_2\text{-Tyr}]$ ); (a) 50 μmol L<sup>-1</sup>, (b) 100 μmol L<sup>-1</sup> e (c) 500 μmol L<sup>-1</sup>.

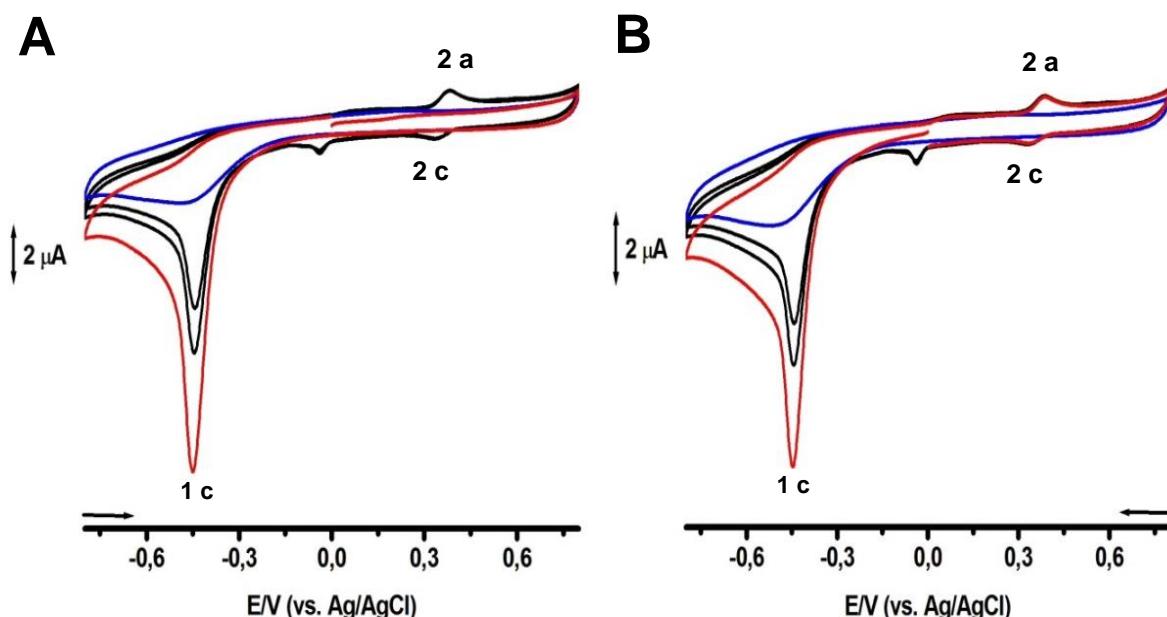


#### 4.2.4 Redução da 3-nitro-tirosina em eletrodo de carbono vítreo

##### 4.2.4.1 Voltametria cíclica

O comportamento de redução da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi investigado sobre o GCE utilizando CV, em tampão acetato, pH = 4,5. Os voltamogramas foram registrados em diferentes sentidos de varredura de potencial, tanto no sentido anódico, **Figura 19A**, quanto no sentido catódico, **Figura 19B**. Nos voltamogramas cíclicos sucessivos no sentido anódico, **Figura 19A**, verificou-se na primeira varredura, a presença de um único pico catódico, pico 1c,  $E_{p1c} = -0,45$  V, associado à redução do grupo nitro presente na estrutura da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. A partir da segunda varredura de potencial, foi detectada a presença de um produto eletroativo que sofre oxidação reversível, pico 2a,  $E_{p2a} = +0,38$  V e pico 2c,  $E_{p2c} = +0,34$  V, correspondente à formação da hidroxilamina proveniente da oxidação do grupo amino (PAIXÃO, SILVA, SALLLES, 2015). Diferentemente, no sentido catódico de varredura, **Figura 19 B**, foi possível verificar a presença do produto reversível de oxidação, descrito anteriormente, porém já na primeira varredura de potencial, como também a presença de um pico catódico, correspondente à redução do grupo nitro, demonstrando que o produto eletroativo identificado é dependente do processo de redução 2c.

**Figura 19.** CVs sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  obtidos em tampão acetato pH = 4,5: (A) sentido anódico de varredura e (B) sentido catódico de varredura,  $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>, (—) primeira varredura de potencial, (—) linha de base.



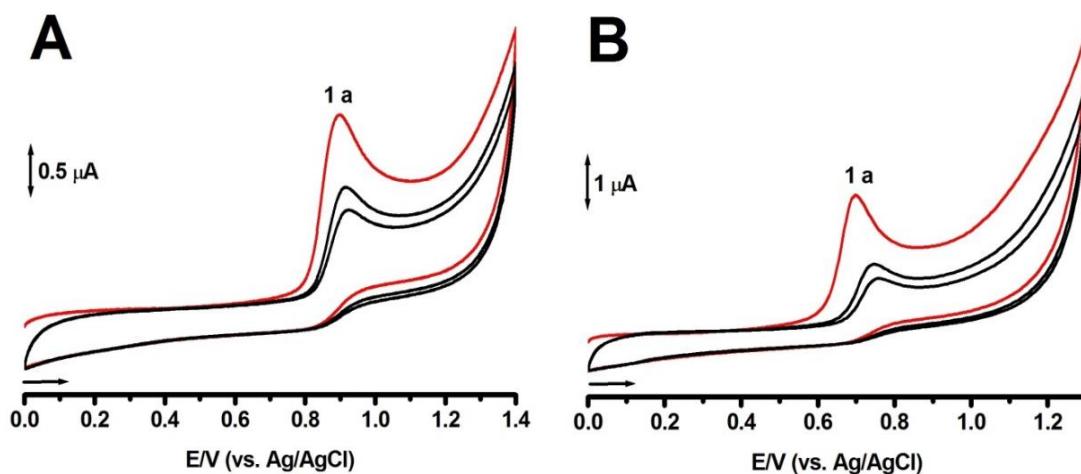
#### 4.2.5 Oxidação da *para*-tirosina em eletrodo de carbono vítreo

##### 4.2.5.1 Voltametria cíclica

O comportamento de oxidação da *p*-Tyr foi investigado sobre o GCE utilizando CV, a uma velocidade de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , numa solução de *p*-Tyr  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em diferentes meios em diferentes valores de pH, em tampão acetato ( $\text{pH} = 4,5$ ), **Figura 20A** e tampão fosfato ( $\text{pH} = 7,0$ ), **Figura 20B**. Nos voltamogramas cíclicos sucessivos, numa solução de *p*-Tyr em meio ácido, **Figura 20A**, verificou-se na primeira varredura o pico anódico 1a, em  $E_{p1a} = + 0,89 \text{ V}$ , associado a oxidação da *p*-Tyr. Nota-se que este pico é irreversível, uma vez que não foi detectado nenhum pico catódico durante a varredura reversa de potencial. Os voltamogramas cíclicos registrados numa solução de  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *p*-Tyr, em meio neutro,  $\text{pH} = 7,0$ , **Figura 20B**, apresentaram um único pico anódico irreversível 1a, em  $E_{p1a} = + 0,69 \text{ V}$ .

Ocorre um deslocamento do pico 1a com a variação do pH. Em meio ácido, os potenciais foram detectados em valores mais positivos, já e em meio neutro os em valores mais negativos, demonstrando que há um equilíbrio ácido-base de Bronsted associado a esse processo.

**Figura 20.** CVs sucessivos obtidos em solução  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *p*-Tyr: (A) tampão acetato,  $\text{pH} = 4,5$  e (B) tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.



##### 4.2.5.2 Voltametria de pulso diferencial

A oxidação da *p*-Tyr foi investigada por DPV, numa solução de *p*-Tyr  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada em tampões acetato,  $\text{pH} = 4,5$ , e fosfato  $\text{pH} = 7,0$ .

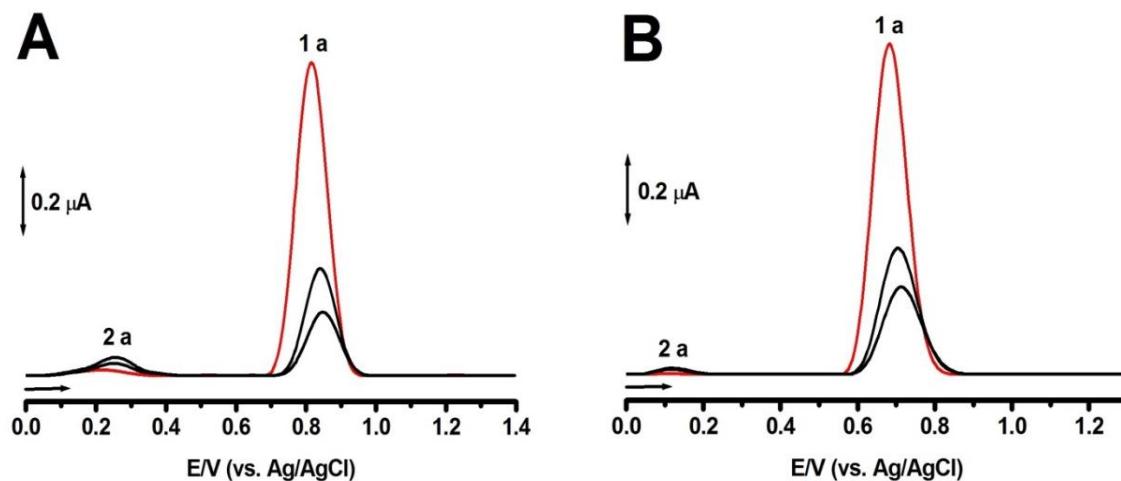
Nos voltamogramas sucessivos de DP, numa solução de *p*-Tyr em meio ácido, **Figura 21A**, observou-se na primeira varredura um pico anódico, pico 1a,  $E_{p1a}$

= + 0,81 V. A partir da segunda varredura, verificou-se uma diminuição significativa da corrente do pico 1a, como também foi detectado o aparecimento de um novo pico, pico 2a,  $E_{p2a} = + 0,25$  V, que corresponde ao produto de oxidação da *p*-Tyr.

Em meio neutro, pH = 7,0, verificou-se na primeira varredura de potencial a presença de um único pico anódico, 1a,  $E_{p1a} = + 0,68$  V, **Figura 21B**. Assim como no resultado anterior, a partir da segunda varredura de potencial, observou-se uma diminuição significativa da corrente do pico 1a, e, além disso, detectou-se a presença de um novo pico, pico 2a,  $E_{p2a} = + 0,11$  V. Os resultados obtidos estão em concordância com os resultados descritos na literatura (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2011).

A partir dos resultados, observou-se que há um deslocamento do pico 1a com a variação do pH, assim como foi verificado em CV, seção 4.2.5.1, como também, há um deslocamento do pico 2a, em meio ácido, para potenciais positivos.

**Figura 21.** DPVs sucessivos obtidos em solução 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de *p*-Tyr: (A) tampão acetato, pH = 4,5 e (B) tampão fosfato, pH = 7,0,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.

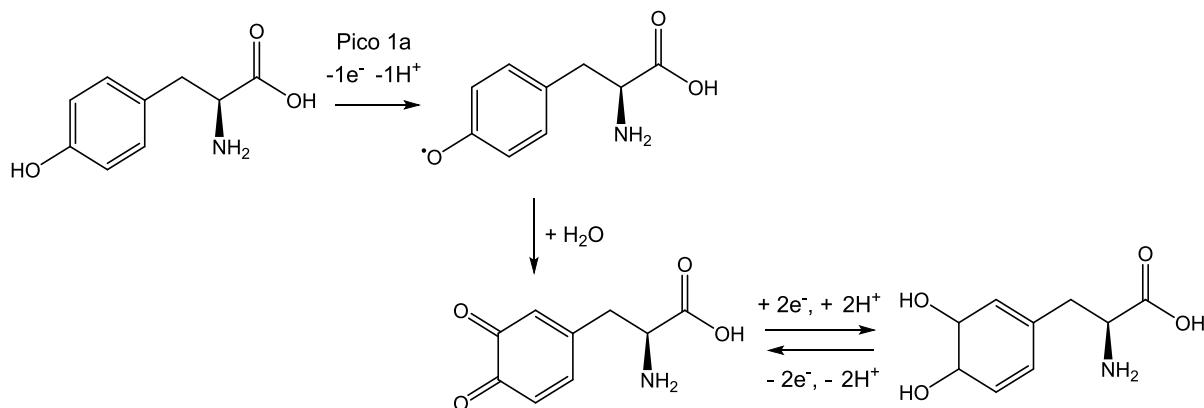


#### 4.2.6 Mecanismo de oxidação da *para*-tirosina

Com base nos resultados voltamétricos acima, juntamente com outros dados da literatura (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2011), verifica-se que a oxidação da *p*-Tyr ocorre com a remoção de um elétron e um próton do grupo fenol, formando o radical fenóxido. Em seguida, ocorre a hidrólise, dando origem a um produto com grupos quinonas em sua estrutura, que pode ser convertido em catecol a partir do ganho de dois elétrons e dois prótons. Como se trata de um processo reversível, o catecol formado pode ser re-oxidado à *para*-quinona, **Esquema 03**.

**Esquema 03.** Mecanismo de oxidação proposto para a *p*-Tyr.

Fonte: (Adaptado de ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2011).



Comparando os resultados eletroquímicos da *p*-Tyr com os obtidos para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, seção 4.2.1, verifica-se claramente uma forte influência do grupo nitro nas propriedades redox da tirosina, uma vez que, quando presente na estrutura da tirosina, o mesmo pode sofrer eletro-redução, além de alterar os processos de oxidação da tirosina, desestabilizando a molécula e facilitando a retirada de elétrons (CAREY, 2003).

#### 4.2.7 Redução da *para*-tirosina em eletrodo de carbono vítreo

O comportamento de redução da *p*-Tyr foi avaliado utilizando CV, DPV e SWV, a partir da solução de *p*-Tyr 100 μmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão acetato, pH = 4,5, e tampão fosfato, pH = 7,0. Os resultados foram semelhantes para as três técnicas utilizadas, onde verificou-se a presença de um único pico anódico irreversível para ambos os meios analisados. Nenhum pico catódico foi verificado, como já era esperado, considerando a estrutura da molécula. Diferentemente, do que foi observado na molécula de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, que sofre redução, seção 4.2.4, devido à presença do grupo nitro em sua estrutura.

#### 4.2.8 Oxidação da *ortho*-tirosina em eletrodo de carbono vítreo

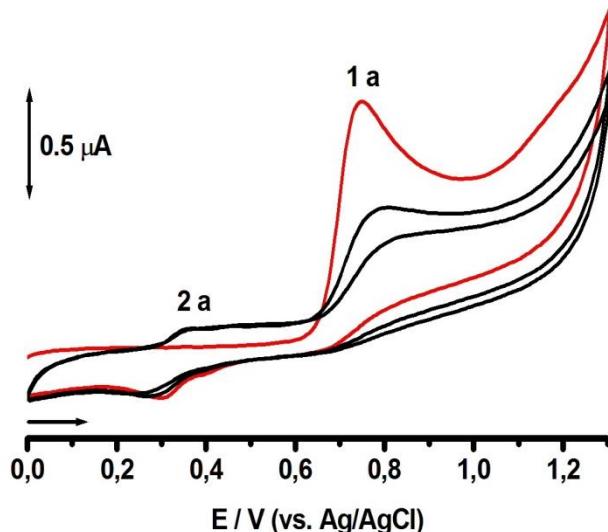
##### 4.2.8.1 Voltametria cíclica

O comportamento eletroquímico da *o*-Tyr 100 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0, foi investigado sobre o GCE utilizando CV, **Figura 22**. Nos voltamogramas cíclicos sucessivos, verificou-se na primeira varredura de potencial o pico anódico 1a, em  $E_{p1a} = + 0,75$  V, associado a oxidação da *o*-Tyr. O pico 1a pelo perfil

voltamétrico é irreversível, **Figura 22**. Além disso, a partir do segundo voltamograma foi identificado a presença de um novo pico anódico reversível, 2a, em  $E_{p2a} = + 0,35$  V, que, possivelmente, corresponde a um produto de oxidação eletroativo da o-Tyr.

Nota-se que há um deslocamento do pico 1a com a variação do pH. Em meio ácido, os potenciais estão mais deslocados para valores positivos.

**Figura 22.** CVs sucessivos obtidos em solução  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de o-Tyr em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ ,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ , (—) primeira varredura.

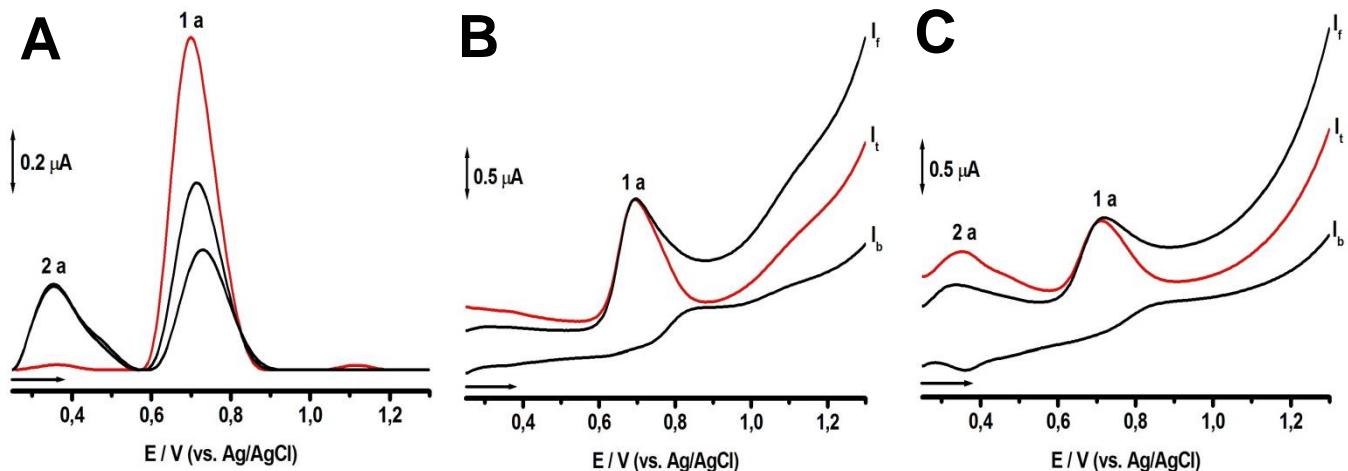


#### 4.2.8.2 Voltametria de onda quadrada

O comportamento de oxidação da o-Tyr foi investigado por SWV, numa solução de o-Tyr  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , preparada em meio neutro, tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ .

Nos voltamogramas sucessivos de SW, **Figura 23A**, observou-se na primeira varredura a presença de um único pico anódico, 1a, em  $E_{p1a} = + 0,70$  V. A partir da segunda varredura de potencial, verificou-se a existência de um novo pico, 2a, em  $E_{p2a} = + 0,35$  V, **Figura 23B**. A irreversibilidade dos processos de oxidação 1a e a reversibilidade do produto de oxidação 2a da o-Tyr, foram confirmadas através da representação gráfica das componentes direta ( $I_f$ ) e reversa ( $I_b$ ) obtidas a partir da corrente total ( $I_t$ ), **Figuras 23B e C**. Todos os resultados obtidos por voltametria de SW estão em concordância com os resultados obtidos por CV, **seção 4.2.8.1**.

**Figura 23.** SWVs obtidos em solução  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *o*-Tyr em pH = 7,0: (A) SWVs sucessivos, (—) primeira varredura, (B) primeira varredura e (C) segunda varredura,  $I_t$  - corrente total,  $I_f$  - corrente direta e  $I_b$  - corrente reversa,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$



Com base no perfil voltamétrico da *o*-Tyr e da *p*-Tyr bem como das suas semelhanças estruturais foi detectado um mecanismo redox semelhante para ambas, com a eletro-oxidação do grupo fenólico para formação de quinonas eletroativas, **Esquema 03**, bem como nenhum processo catódico foi detectado, **Quadro 03**. Em contrapartida, para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr novos processos catódicos e anódicos foram detectados, devido a presença do grupo nitro em sua estrutura, o que influencia significativamente o seu mecanismo de reação redox proposto, **Quadro 03**.

**Quadro 03.** Potenciais de oxidação e redução dos biomarcadores 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, *o*-Tyr e *p*-Tyr, em GCE, em tampão fosfato, pH = 7,0.

Potenciais de oxidação e redução	
pH = 7,0	
3-nitro-tirosina (3-NO <sub>2</sub> -Tyr)	$E_{p1a} = + 0,77 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,89 \text{ V}$ $E_{p3a} = + 1,16 \text{ V}$ $E_{p1c} = - 0,45 \text{ V}$
<i>Orto</i> -tirosina ( <i>o</i> -Tyr)	$E_{p1a} = + 0,70 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,35 \text{ V}$
<i>Para</i> -tirosina ( <i>p</i> -Tyr)	$E_{p1a} = + 0,68 \text{ V}$ $E_{p2a} = + 0,11 \text{ V}$

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação do comportamento eletroquímico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em meio ácido, neutro e alcalino, utilizando as técnicas voltamétricas, CV, DPV e SWV, demonstrou, que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr sofre eletro-oxidação irreversível em várias etapas dependentes do pH. Em meio ácido a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr sofre oxidação em duas etapas sucessivas. A primeira ocorre com a transferência de um elétron e um próton e a segunda com a transferência de um único elétron. Além disso, um produto de oxidação eletroativo também foi detectado. Em meio neutro foram detectadas três etapas de oxidação sucessivas.

Um mecanismo para a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi postulado e proposto. A eletro-oxidação ocorre no grupo fenol envolvendo a transferência de um elétron e um próton.

Uma curva analítica foi realizada para quantificação eletroanalítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, numa faixa de 50-500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , onde foi obtido um coeficiente de correlação de  $r = 1$ .

Um estudo do comportamento catódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr também foi realizado, onde foi detectada a presença de um único processo de eletro-redução na superfície do GCE, o qual foi associado com a eletro-redução do grupo nitro da molécula.

O comportamento redox da *p*-Tyr e da *o*-Tyr, em meio ácido e neutro, foi investigado pelas técnicas CV, DPV e SWV, em GCE. Os resultados demonstraram que ambas as moléculas sofrem eletro-oxidação em uma única etapa irreversível dependente do pH, com a transferência de um elétron e um próton para formação de quinonas.

Os resultados eletroquímicos demonstraram a possibilidade de eletro-oxidação e eletro-redução desses biomarcadores bem como elucidaram seus respectivos mecanismos redox, fornecendo importantes subsídios para o entendimento de processos biológicos *in-vivo* associados a essas espécies, bem como para o desenvolvimento de métodos eletroanalíticos altamente seletivos e sensíveis para detecção e quantificação dessas espécies.

## REFERÊNCIAS

- ARDAKANI, M.M., et al. Electrocatalytic oxidation of cysteine by quinizarine at glassy carbon electrode. **Sensor Actuator B Chem.** 123, 763-768, 2007.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M, DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
- BECKMAN, J. S.; ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; VAN DER WOERD, M.; SMITH, C. D.; CHEN, J.; HARRISON, J.; MARTIN, J. C.; TSAI, M. Kinetics of superoxide dismutase and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite. **Arch. Biochem. Biophys.** 298, 438–445, 1992.
- BLOUNT, B. C. Trace quantitation of the oxidative damage products, meta- and ortho-tyrosine, in biological samples by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. **Anal. Biochem.** 244, 270–276, 1997.
- BRABEC, V.; MORNSTEIN, V. **Biophys. Chem.** 12, 159, 1980.
- BRABEC, V.; SCHINDLEROVA, I. **Bioelectrochem. Bioenerg.** 8, 451, 1981.
- BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications**, Oxford Science University Publications ed., **Oxford**, 1993.
- BUSS, H.; CHAN, T. P.; SLUIS, K. B.; DOMIGAN, N. M.; WINTERBOURN, C. C. Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. **Free Radic Biol Med.** 23, 361-6, 1997.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. São Paulo: Thomson Learning, 2007.
- CAO, G.; CUTLER, R. G. Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4- dinitrophenylhydrazine. **Arch. Biochem. Biophys.** 320, 106–114, 1995.

- CAO, Fei et al. A high-performance electrochemical sensor for biologically meaningful L-cysteine based on a new nanostructured L-cysteine electrocatalyst. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 1019, p. 103–110, 2018.
- CAREY, F.A.. **Química Orgânica**. 6<sup>a</sup> ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2003.
- COSTIN, J.W.; FRANCIS, P.S.; LEWISM, S.W. **Anal. Chim. Acta**. 480, 67, 2003.
- DAVIES, J.S., Amino acids, peptides, and proteins. Vol. 30. **Royal society of chemistry**, 1999.
- DONOGHUE, J.D.; RABIN, E.; LAMBERG, E.M.; WERNER, W.G. **Mov. Disord. Clin. Pract.** 1, 348, 2014.
- DU, A.; WU, W.; ERCAL, N.; MA, Y. **J. Chromatogr. B**. 803, 321, 2004.
- ENACHE, T.A., OLIVEIRA-BRETT, A.M., **J. Electroanal. Chem.** v. 81, n. 1, p. 46–52, 2011.
- ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. **Bioelectrochemistry**. 89, 11, 2013.
- FERNANDES, I.P.G.; OLIVEIRA, S.C.B.; GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. **Electroanalysis**, 24, 618, 2012.
- FERNSTROM, J.D. **Am. J. Clin. Nutr.** 71, 1669, 2000.
- FRANZE, T.; WELLER, M.G.; NIESSNER, R.; POSCHL, U. Comparison of nitrotyrosine antibodies and development of immunoassays for the detection of nitrated proteins, **The Analyst**. 129, 589-96, 2004.
- HALLIWELL, B.; KAUR, H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. **Free Radic. Res.** 27, 239–244, 1997.
- HANAOKA, S.; LIN, J.-M.; YAMADA, M. **Anal. Chim. Acta**. 409, 65, 2000.
- HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica Ilustrada**, 5<sup>a</sup> ed., Artmed, 2012.

HASEEB, A. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Human Immunology**, 74, 1392–1399, 2013.

HEINECKE, J.W.; HSU, F.F.; CROWLEY, J.R.; HAZEN, S.L.; LEEUWENBURGH, C.; MUELLER, D.M.; RASMUSSEN, J.E.; TURK, J. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. **Methods Enzymol.** 300, 124–144, 1999.

HENSLEY, K.; WILLIAMSON, K.S.; FLOYD, R.A. Measurement of 3-nitrotyrosine and 5-nitro- $\alpha$ -tocopherol by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, N. 4, p. 520–528, 2000.

HENSLEY, K.; WILLIAMSON, K. S.; MAIDT, M. L.; GABBITA, S. P.; GRAMMAS, P.; FLOYD, R. A. Determination of biological oxidative stress using high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). **J. High Res. Chromatogr.** 22, 429–437, 1999.

HERCE-PAGLIAI, C.; KOTECHA, S.; SHUKER, D. E. Analytical methods for 3 nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. **Nitric Oxide**. 2, 324–336, 1998.

HOOSHMAND, Sara; ES'HAGHI, Zarrin. Simultaneous quantification of arginine, alanine, methionine and cysteine amino acids in supplements using a novel bioelectro-nanosensor based on CdSe quantum dot/modified carbon nanotube hollow fiber pencil graphite electrode via Taguchi method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 146, p. 226–235, 2017.

HOSHI, T.; HEINEMANN, S.H. Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction, **J. Physiol.** 531, 1–11, 2001.

INGLE, R.A. **Arabidopsis Book**. 9, 141, 2011.

ISHII, Y.; LIJIMA, M.; UMEMURA, T.; NISHIKAWA, A.; IWASAKI, Y.; ITO, R.; SAITO, K.; HIROSE, M.; NAKAZAWA, H. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 41, 1325, 2006.

JIN, G.P.; LIN, X.Q. **Electrochem. Commun.** 6, 454, 2004.

KAUR, H.; FAGERHEIM, I.; GROOTVELD, M.; PUPPO, A.; HALLIWELL, B. Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals: application to activated human neutrophils and to the heme protein leghemoglobin. **Anal. Biochem.** 172, 360–367, 1988.

KAUR, H.; HALLIWELL, B.; Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. **Methods Enzymol.** 233, 67–82, 1994.

KHAN, J.; BRENNAND, D.M.; BRADLEY, N.; GAO, B.; BRUCKDORFER, R.; JACOBS, M.; BRENNAN, D.M. 3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method, **Biochemical Journal.** 330, 795-795, 1998.

KNIGHTA, A. R.; TAYLORA, E.; LUKASZEWSKIB, R.; JENSENC, K. T.; JONESB, H. E.; CARRÉA, J E.; ISUPOVD, M. N.; LITTLECHILDD, J. A.; BAILEYE, S. J.; BREWERF, E.; MCDONALDF, T. J.; PITTC A. R.; SPICKETTC C. C.; WINYARDA, P. G. A high-sensitivity electrochemiluminescence-based ELISA for the measurement of the oxidative stress biomarker, 3-nitrotyrosine, in human blood serum and cells. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 120, 246-254, 2018.

LI, M.; CARLSON, S.; KINZER, J.A.; PERPALL, H.J.. HPLC and LC–MS studies of hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals generated from Udenfriend's reagent. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 312, 316–322, 2003.

LIANG, Y.D.; SONG, J.F. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 38, 100, 2005.

MAHMOUDI, L.; KISSNER, R.; NAUSER, T.; KOPPENOL, W.H. **Biochemistry** 55, 2849, 2016.

MALFOY, B.; REYNAUD, J.A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives. **J Electroanal Chem.** 114, 213-223, 1980.

MARTINO, L., et al. Chemistry, antioxidant, antibacterial and antifungal activities of volatile oils and their components. **Nat. Prod. Commun.** 4, 1741-1750, 2009.

MEYERS, S. **Altern. Med. Rev.** 5, 64, 2000.

- NAN, C.G.; PING, W.X.; PING, D.J.; QING, C.H. **Talanta**. 49, 319, 1999.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OLIVEIRA, S.C.B., **J. Electroanal. Chem.** 746, 51, 2015.
- OLIVEIRA, S.C.B. et al., **J. Electroanal.Chem.** 689, 207, 2013.
- OLIVEIRA, S.C.B.; BRETT, A.M.O. **Langmuir**. 28, 4896, 2012.
- OLIVEIRA, S.C.B.; NASCIMENTO, V.B. **Electroanalysis**, 25, 2117, 2013.
- OLIVEIRA, S.C.B.; SANTARINO, I. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Direct electrochemistry of native and denatured anticancer antibody rituximab at a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 1029–1034, 2013.
- ÖZBEN, T. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants: pathological and physiological significance. **Springer**, 1998.
- OZCAN, A.; SAHIN, Y. **Biosens. Bioelectron**. 2012, 31, 26.
- OSTATNA, V.; CERNOCKA, H.; KURZATKOWSKA, K.; PALECEK, E. **Anal. Chim. Acta**. 735, 31, 2012.
- PACHECO, W.F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITTA, A.G.S.L.; AUCÉLIO, R.Q. **Rev. Virtual Quim**. 5, 516, 2013.
- PAIXÃO, T.R.L.C.; SILVA, T.G.; SALLES, M.O. **Quím. Nova**. v. 38, n. 1, 2015.
- PONTINHA, A.D.R. et al., **Electroanalysis** 24, 917, 2012.
- PRADAC, J.; KORYTA, J. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem**. 17, 167, 1968.
- RADI, Rafael. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. **Accounts of Chemical Research**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 550–559, 2013.

- RAMEZANIAN, M. S.; PADMAJA, S.; KOPPENOL, W. H. Hydroxylation and nitration of phenolic compounds by peroxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.** 9, 232–240, 1996.
- RAOOF, B.; OJANI, R.; BAGHAYERI, M. **Sens. Actuators B.** 143, 261, 2009.
- RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W.L. **Food Chem.** 89, 309, 2005.
- REDDY, S.; HALLIWELL, B.; JONES, A.D.; LONGHURST, J.C.; The use of phenylalanine to detect hydroxyl radical production in vivo: a cautionary note. **Free Radic. Biol. Med.** 27, 1465, 1999.
- REYNAUD, J. A.; MALFOY, B.; CANESSON, P. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 195–211, 1980.
- ROESER, J.; PERMENTIER, P.; BRUINS, A.P.; BISCHOFF, R. **Anal. Chem.** 82, 7556, 2010.
- SALMAN-TABCHEH, S.; GUERIN, M. C.; TORREILLES, J. Nitration of tyrosyl residues from extra and intracellular proteins in human whole blood. **Free Radic. Biol. Med.** 19, 695–698, 1995.
- SANTARINO, I. B.; OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In Situ Evaluation of the Anticancer Antibody Rituximab-dsDNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 1304–1311, 2014.
- SARVER A. et al., **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.** 12, 439, 2001.
- SCHWARZENBACH, R.P., et al., Environmental organic chemistry. **Wiley Online Library**, 2003.
- SENGUL, M., et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. **Pak. J. Pharm. Sci.** 22, 102-106, 2009.
- SHAHROKHIAN, S.; FOTOUHI, L. **Sens. Actuators B.** 123, 942, 2007.
- SHACTER, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabol Rev**, 32, 307-326, 2000.

- SHEN, L., HUANG R. and HU, N., Myoglobin in polyacrylamide hydrogel films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis. **Talanta**, 56, 1131-1139, 2002.
- SHIGENAGA, M. K.; LEE, H. H.; BLOUNT, B. C.; CHRISTEN, S.; SHIGENO, E. T.; YIP, H.; AMES, B. N. Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 94, 3211–3216, 1997.
- SIKORSKA, E.; GLISZCZYNsKA-SWIGŁO, A.; INSINSKA-RAK, M.; KHMELINSKII, I.; KEUKELEIRE, D.; SIKORSKI, M. **Anal. Chim. Acta**. 613, 207, 2008.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.W.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8<sup>a</sup> Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2008.
- SIMIONATO, A.V.C.; MORAES, E.P.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M.; KENNDLER, E. **Electrophoresis**. 29, 2051, 2008.
- STADTMAN, E.R., Protein oxidation and aging. **Science**, 257, 1220-1224, 1992.
- STADTMAN, E.R. and LEVINE, R.L., Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino acids**, 25, 207-218, 2003.
- ŠTOLC, S., Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sci**, 65, 1943-1950, 1999.
- SUPRUN, E.V. et al. **Electrochimica Acta**. 140, 72–82, 2014.
- TEIXEIRA, Dulce et al. 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. **Biochimie**, [s. l.], v. 125, p. 1–11, 2016.
- UNDERBERG, W.J.M.; WATERVAL, J.C.M. **Electrophoresis**. 23, 3922, 2002.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. **Quím. Nova**. 30, 1323-1338, 2007.
- VOET, D.; GREENWALD-VOET, J.; PRATT, C.W. **Fundamentals of biochemistry**. Wiley: New York, 1999.
- WACKERBARTH, H., HILDEBRANDT, P. **ChemPhysChem**. 4, 714, 2013.

WANG, Joseph. **ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY**. 3a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2006.

WHITFORD, D. **Proteins: structure and function**. Wiley, 2005.

YOU, J.; SHAN, Y.; ZHEN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. **Anal. Biochem.** 313, 17, 2003.

ZHANG, H., et al., Ultrasensitive assays for proteins. **Analyst**, 132, 724-737, 2007.

ZHEN, Q.; XU, B.; MA, L.; TIAN, G.; TANG, X.; DING, M. **Clin. Biochem.** 44, 226, 2011.

ZHOU, Yuyang et al. Highly selective Electrochemiluminescent probe to histidine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 799, n. April, p. 122–125, 2017.

ZHOU, M., et al., Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at ordered mesoporous carbon-modified glassy carbon electrode. **Anal Chem**, 79, 5328-5335, 2007.

ZHU, Y.; YANG, Y.; ZHOU, G.; LI, M.; JIANG, C.; ZHANG, C.; CHEN, S. **Food Chem.** 118, 159, 2010.