



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DO  
BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO 3-NITRO-  
TIROSINA EM DIFERENTES SUBSTRATOS  
ELETROQUÍMICOS E DE SUA INTERAÇÃO COM O DNA**

**José Ailton Mota Nascimento**

**Recife**  
**Outubro/2019**

**José Ailton Mota Nascimento**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DO  
BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO 3-NITRO-  
TIROSINA EM DIFERENTES SUBSTRATOS  
ELETROQUÍMICOS E DE SUA INTERAÇÃO COM O DNA**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em  
Química pela Universidade Federal  
Rural de Pernambuco.

**Orientador: Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira**

**Recife  
Outubro/2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- N244e Nascimento, José Ailton Mota  
Estudo eletroquímico e eletroanalítico do biomarcador de estresse oxidativo 3-nitro-tirosina em diferentes substratos eletroquímicos e de sua interação com o DNA / José Ailton Mota Nascimento. - 2019. 107 f. : il.
- Orientador: Severino Carlos Bezerra de Oliveira.  
Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Química, Recife, 2019.
1. 3-nitro-tirosina. 2. Oxidação. 3. DNA. 4. Voltametria. 5. Substratos eletroquímicos. I. Oliveira, Severino Carlos Bezerra de, orient. II. Título

**José Ailton Mota Nascimento**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO E ELETROANALÍTICO DO  
BIOMARCADOR DE ESTRESSE OXIDATIVO 3-NITRO-  
TIROSINA EM DIFERENTES SUBSTRATOS  
ELETROQUÍMICOS E DE SUA INTERAÇÃO COM O DNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira (DQ-UFRPE)

**Orientador**

---

Profa. Dra. Madalena Carneiro da Cunha Areias (DQF-UFPE)

**1º Examinador**

---

Prof. Dr. Jandyson Machado Santos (DQ-UFRPE)

**2º Examinador**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas até o momento superando todos os obstáculos que surgiram durante todo o meu mestrado.

Agradeço aos meus pais, Hilária Gomes e Ailton Miguel, e a minha irmã, Wéllida, por estarem sempre disponível para o que for preciso.

Aos meus familiares que torcem para o meu sucesso em mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Severino Carlos Bezerra de Oliveira por todos os ensinamentos durante a minha iniciação científica, graduação e mestrado que contribuíram de forma significativa para o meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Valberes Bernardo do Nascimento por todos os ensinamentos desde a graduação que contribuíram de forma significativa para a minha formação acadêmica.

A todos do Laboratório de Eletroanalítica e Bioeletroquímica (LEB) o qual faço parte, em especial aos meus amigos Nathalia, Carlos Mendes, Maysa Thayane, Alex, Raphael e aos que também fizeram parte deste laboratório Gabriel e Hitala por todos os momentos vividos, aprendizados compartilhados e a forma de trabalho em equipe.

Aos meus colegas de turma do mestrado e aos meus amigos do LAMTESA, Lidiane, Amanda, Renê, Nayara, Nattany, Dani, Arthur, Carol, Helena, Larissa, Rômulo, Thayná, Julyana por todos os momentos compartilhados e pelo apoio de todos.

Ao CNPQ e a FACEPE pelo o apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa e mais uma vez a FACEPE pela bolsa ao longo de todo o mestrado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
CAPÍTULO 1.....	17
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	17
1.1. INTRODUÇÃO.....	18
1.2. Ácido desoxirribonucleico: Estrutura, propriedade e funções.....	20
1.2.1. Estrutura primária.....	20
1.2.2. Estrutura secundária do DNA: A fita dupla.....	21
1.2.3. Funções biológicas do DNA.....	22
1.2.4. Modos de interação de pequenas moléculas com o DNA.....	23
1.2.4.1. Modo de ligação covalente.....	24
1.2.4.2. Modo de ligação não-covalente.....	26
1.3. Aminoácidos: estrutura e funções.....	29
1.3.1. Oxidação de aminoácidos.....	32
1.4. 3-nitro-tirosina (3-NO <sub>2</sub> -Tyr).....	33
1.5. Técnicas voltamétricas.....	36
1.5.1. Voltametria cíclica.....	38
1.5.2. Voltametria de pulso diferencial.....	41
1.5.3. Voltametria de onda quadrada.....	44
1.5.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	45
1.6. Estudo eletroquímico dos aminoácidos.....	47
1.7. Estudo eletroquímico da 3-nitro-tirosina.....	48
1.8. Eletroforese.....	49
CAPÍTULO 2.....	52
<i>OBJETIVOS</i> .....	52
2.1. Objetivo geral.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
CAPÍTULO 3.....	54

<b>EXPERIMENTAL</b> .....	54
3.1. Reagentes, materiais e metodologia .....	55
3.2. Parâmetros voltamétricos e célula eletroquímica .....	56
3.3. Aquisição e apresentação de dados voltamétricos .....	58
3.4. Eletroforese em gel .....	58
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	60
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	60
4.1. Estudo eletroquímico e eletroanalítico da 3-nitro-tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo .....	61
4.1.1. Voltametria cíclica.....	61
4.1.2. Voltametria de pulso diferencial .....	62
4.1.3. Voltametria de onda quadrada .....	63
4.1.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica .....	64
4.1.5. Determinação eletroanalítica do biomarcador 3-nitro-tirosina .....	66
4.2. Estudo eletroquímico e eletroanalítico da 3-nitro-tirosina utilizando eletrodo de platina e ouro.....	67
4.2.1. Eletrodo de platina .....	67
4.2.1.1. Voltametria cíclica .....	67
4.2.1.2. Voltametria de pulso diferencial e onda quadrada .....	69
4.2.1.3. Comparação da eletro-oxidação da 3-nitro-tirosina com a tirosina no eletrodo de platina.....	71
4.2.1.4. Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina no eletrodo de platina .....	72
4.2.2. Eletrodo de ouro .....	73
4.2.2.1. Voltametria cíclica .....	73
4.2.2.2. Voltametria de pulso diferencial e onda quadrada .....	73
4.2.2.3. Estudo de comparação da tirosina com a 3-nitro-tirosina no eletrodo de ouro .....	76
4.2.2.4. Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina no eletrodo de ouro.....	76
4.3. Mecanismo de oxidação da 3-nitro-tirosina.....	79
4.4. Estudo da interação da 3-nitro-tirosina com o dsDNA .....	79
4.4.1. Estudo da interação da 3-nitro-tirosina com o dsDNA utilizando eletrodo de carbono vítreo e voltametria de pulso diferencial .....	79
4.4.2. Eletro-oxidação da guanina na ausência/presença do dsDNA.....	85

4.4.3. Estudo da interação 3-NO <sub>2</sub> -Tyr-DNA utilizando eletroforese em gel .....	86
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>105</b>
<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO: PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO .....</b>	<b>106</b>
<b>1. Artigos em periódicos .....</b>	<b>106</b>
<b>2. Resumos em congressos .....</b>	<b>106</b>

## RESUMO

Um estudo eletroquímico da 3-nitro-tirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), em meio aquoso, foi realizado em diferentes substratos eletroquímicos, eletrodo de carbono vítreo (GCE), platina e ouro, utilizando técnicas voltamétricas, como voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), com a finalidade de investigar o seu mecanismo de oxidação, bem como sua reatividade/toxicidade frente à molécula do DNA de fita dupla (dsDNA). A eletro-oxidação da *para*-tirosina, em meio aquoso, foi também investigada e comparada com a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Potencialidades das propriedades de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr para aplicações eletroanalíticas também foram estudadas.

Os resultados eletroquímicos, no geral, demonstraram que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr sofre eletro-oxidação, em meio aquoso, em uma única etapa irreversível dependente do pH, perdendo um elétron e um próton no grupo fenólico e com formação de produtos não eletroativos que adsorvem fortemente nas superfícies de todos os eletrodos utilizados. Além disso, foi detectado que o grupo fenólico presente na estrutura da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é mais difícil de ser oxidado (~ 170 mV), quando comparado a sua eletro-oxidação na molécula da *para*-tirosina, possivelmente devido a influência do grupo nitro, um grupo retirador de elétrons. O transporte de massa da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr até a superfície do eletrodo foi investigado em eletrodo de platina e foi estabelecido que o mesmo é controlado predominantemente por difusão. Métodos eletroanalíticos para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foram propostos em GCE, ouro e platina, os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) desses métodos foram calculados e comparados. No GCE o LOD foi de 0,17 µmol L<sup>-1</sup>, no eletrodo de platina foi 6,81 µmol L<sup>-1</sup>, enquanto no eletrodo de ouro 7,33 µmol L<sup>-1</sup>, demonstrando uma melhor sensibilidade para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no GCE.

Por último, os resultados de DPV e de eletroforese em gel, demonstraram claramente uma interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr frente a molécula do dsDNA em meio fisiológico (pH = 7,0), uma vez que os resultados da DPV, com o tempo de incubação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com o DNA, detectaram uma queda significativa ou até o desaparecimento por completo do pico anódico associado com a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em E = 0,70 V, enquanto os resultados da eletroforese detectaram uma diminuição bem significativa da intensidade de fluorescência do brometo de etídio. Assim foi estabelecido a interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr possivelmente via sua intercalação na fita dupla do DNA e com a formação de um complexo 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA estável, dificultando a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na superfície do GCE, bem como a intercalação do biomarcador fluorescente, o brometo de etídio, no dsDNA.

**Palavras-chave:** 3-Nitrotirosina, Oxidação, DNA, Voltametria, Substratos eletroquímicos.

## ABSTRACT

An electrochemical study of 3-nitro-tyrosine (3-NO<sub>2</sub>-Tyr), in aqueous medium, was performed on different electrochemical substrates, glassy carbon electrode (GCE), platinum and gold electrode, using voltammetric techniques, such as cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV) and differential pulse voltammetry (DPV), and electrochemical impedance spectroscopy (EIS), to investigate its oxidation mechanism, as well as its reactivity / toxicity to the double-strands DNA molecule (dsDNA). *para*-Tyrosine electro-oxidation in aqueous media was also investigated and compared with 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Potentialities of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr oxidation properties for electroanalytical applications were also studied.

The electrochemical results, in general, showed that 3-NO<sub>2</sub>-Tyr undergoes electro-oxidation in aqueous medium in a single irreversible pH-dependent step, losing one electron and one proton in the phenolic group and forming non-electroactive products, that are adsorbed strongly on all used electrodes. In addition, the phenolic group present in the 3-NO<sub>2</sub>-Tyr structure was found to be more difficult to oxidize (~ 170 mV) when compared to its electro-oxidation in the *para*-tyrosine molecule, possibly due to the influence of the nitro group. an electron withdrawing group. The mass transport of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr to the electrode surface was investigated at platinum electrode and it was established that it is predominantly diffusion controlled. Electroanalytical methods for detection and quantification of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr were proposed at GCE, gold and platinum electrode, the detection limits (LOD) and quantification (LOQ) of these methods were calculated and compared. At GCE the LOD was 0.17 µmol L<sup>-1</sup>, in the platinum electrode was 6,81 µmol L<sup>-1</sup>, while in the gold electrode was 7,33 µmol L<sup>-1</sup>, demonstrating a better sensitivity for detection and quantification of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. at GCE.

Finally, the DPV and gel electrophoresis results clearly demonstrated a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr interaction with dsDNA molecule in physiological medium (pH = 7.0), since the DPV results over incubation time of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr with DNA, detected a significant decrease or the complete disappearance of the anodic peak associated with 3-NO<sub>2</sub>-Tyr oxidation, at E = 0.70 V, while electrophoresis results detected a very significant decrease in the ethidium bromide fluorescence. Thus, it was established the interaction of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr possibly via its intercalation in the DNA double helix and with formation of a stable 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA complex, hindering the oxidation of 3-NO<sub>2</sub>-Tyr on the GCE, as well as the intercalation of the fluorescent biomarker, ethidium bromide, on the dsDNA.

**Keywords:** 3-Nitrotyrosine, Oxidation, DNA, Voltammetry, Electrochemical substrates.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Parte da cadeia polinucleotídica de uma molécula de DNA.....	20
<b>Figura 2.</b> Modelo do DNA de dupla hélice (esquerda) e pareamento de bases do DNA (direita). Ligações de hidrogênio entre os pares de bases adenina-timina e guanina-citosina. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio.....	22
<b>Figura 3.</b> Modelos de modos de ligação de pequenas moléculas com o DNA.....	24
<b>Figura 4.</b> Cisplatina ligado no modo covalente ao DNA principalmente na posição N7 da guanina.....	25
<b>Figura 5.</b> Estruturas heterocíclicas aromáticas que interagem via intercalação com o DNA.....	27
<b>Figura 6.</b> Estrutura geral dos aminoácidos.....	29
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas e propriedades químicas dos aminoácidos que compõem as proteínas, em pH = 7,0, (—R) cadeia lateral.....	30
<b>Figura 8.</b> Estrutura da tirosina (esquerda) e 3-nitro-tirosina (direita) e suas principais diferenças em propriedades químicas.....	34
<b>Figura 9.</b> Sinal de excitação da CV – forma de onda triangular de potencial com uma faixa de potencial de +0,8 V a -0,2 V versus SCE.....	39
<b>Figura 10. (A)</b> Voltamogramas cíclicos do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1 mmol L <sup>-1</sup> , em KCl 0,5 mol L <sup>-1</sup> , para diferentes velocidades de varreduras (5-500 mV s <sup>-1</sup> ) em GCE ( $\phi = 1,6$ mm) e <b>(B)</b> Gráfico da $I_{pa}$ vs. $V^{1/2}$ referente aos CVs do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em KCl para diferentes velocidades (5-500 mV s <sup>-1</sup> ).....	40
<b>Figura 11.</b> Sinais de excitação para a voltametria de pulso diferencial.....	42
<b>Figura 12.</b> Voltamogramas de DP do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função do pH.....	43
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática da voltametria de onda quadrada.....	44
<b>Figura 14.</b> Voltamogramas de SW do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mmol L <sup>-1</sup> em função do pH <b>(A)</b> pH = 1,3 <b>(B)</b> pH = 7,0 <b>(C)</b> pH = 13,0, ( $I_t$ ) corrente total, ( $I_f$ ) corrente direta e ( $I_b$ ) corrente reversa, $V_{\text{effective}} = 100$ mV s <sup>-1</sup> .....	45
<b>Figura 15.</b> Espectro de impedância faradaica apresentados na forma de gráficos de Nyquist juntamente com o circuito equivalente eletrônico da interface eletrificada.....	46

<b>Figura 16.</b> Estrutura química dos aminoácidos eletroativos.....	48
<b>Figura 17.</b> Representação esquemática da eletroforese.....	50
<b>Figura 18.</b> Imagem do potenciostato.....	56
<b>Figura 19.</b> Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados.....	57
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas cíclicos sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 20 μmol L <sup>-1</sup> : <b>(A)</b> tampão acetato, pH = 4,4 e <b>(B)</b> tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....	61
<b>Figura 21.</b> Voltamogramas de DP sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 5 μmol L <sup>-1</sup> : <b>(A)</b> tampão acetato, pH = 4,5 e <b>(B)</b> tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .....	63
<b>Figura 22.</b> Voltamogramas de SW sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 5 μmol L <sup>-1</sup> em <b>(A e C)</b> tampão acetato, pH = 4,5 e <b>(B e D)</b> tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura. $I_t$ – corrente total, $I_f$ – corrente direta e $I_b$ – corrente reversa, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .....	64
<b>Figura 23.</b> Espectros de EIS sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 5 μmol L <sup>-1</sup> aplicando um potencial de 1,0 V em: <b>(A)</b> tampão acetato pH = 4,5 e <b>(B)</b> tampão fosfato pH = 7,0.....	65
<b>Figura 24. (A)</b> Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: <b>(a)</b> 2,04 μmol L <sup>-1</sup> , <b>(b)</b> 4,00 μmol L <sup>-1</sup> , <b>(c)</b> 6,00 μmol L <sup>-1</sup> , <b>(d)</b> 8,00 μmol L <sup>-1</sup> e <b>(e)</b> 10,00 μmol L <sup>-1</sup> <b>(B)</b> Curva analítica da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr.....	66
<b>Figura 25.</b> CVs sucessivos da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr: <b>(A)</b> 200 μmol L <sup>-1</sup> , tampão acetato, pH = 4,4, <b>(B)</b> 500 μmol L <sup>-1</sup> , tampão fosfato, pH = 7,0 e <b>(C)</b> CVs da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 500 μmol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0 em diferentes velocidades de varredura (25, 50, 100, 200 e 300 mV s <sup>-1</sup> ), (—) primeira varredura.....	68
<b>Figura 26.</b> Varreduras sucessivas (com correção de linha de base) de DP <b>(A e B)</b> e SW <b>(C-F)</b> da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 200 μmol L <sup>-1</sup> . <b>(A, C e E)</b> pH = 4,4 e <b>(B, D e F)</b> pH = 7,0. (—) primeira varredura. $I_t$ - corrente total, $I_f$ - corrente direta e $I_b$ - corrente reversa.....	70
<b>Figura 27.</b> Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) em tampão fosfato, pH = 7,0: (—) da Tyr 200 μmol L <sup>-1</sup> e (—) da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr 200 μmol L <sup>-1</sup> ...71	71
<b>Figura 28. (A)</b> Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO <sub>2</sub> -Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: <b>(a)</b> 20,00	

- $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $36,36 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $50,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $61,54 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (e)  $71,43 \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) Curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.....72
- Figura 29.** CVs sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato, pH = 7,0, (—) linha de base.....73
- Figura 30.** Varreduras sucessivas (com correção de linha de base) de DP (A e B) e SW (C-F) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (A, C e E) pH = 4,4 e (B, D e F) pH = 7,0. (—) primeira varredura.  $i_t$  - corrente total,  $i_f$  - corrente direta e  $i_b$  - corrente reversa.....75
- Figura 31.** SWVs (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato, pH = 7,0: (—) Tyr e (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.....76
- Figura 32. (A)** Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: (a)  $20,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $36,36 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $50,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $71,43 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (e)  $80,00 \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) Curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.....77
- Figura 33.** Proposta de mecanismo de oxidação para 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.....79
- Figura 34.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato, pH = 7,0 após (—) 5 min e (—) 3 h de incubação.....80
- Figura 35.** Voltamogramas de DP do dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão fosfato, pH = 7,0, após, (—) 5 min e (—) 2 h de incubação.....81
- Figura 36.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em pH = 7,0, após 5 min de incubação da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (—) dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}/165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) .....82
- Figura 37.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em pH = 7,0, da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  após 3 h, (—) dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 2 h e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}/165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 1 h.....83
- Figura 38.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em pH 7,0, da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  após 3 h, (—) dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 2 h e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}/165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 2 h.....84
- Figura 39.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), obtidos em tampão fosfato, pH 7,0: (—) Guanina  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (—) Guanina-DNA ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}/200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).....86
- Figura 40.** Eletroforese em gel de agarose (0,7 %) da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA após 2 h de incubação. Controles do dsDNA  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Poço

1 e 5) e mistura de dsDNA  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Poço 2, 3 e 4) e dsDNA  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (poço 6, 7 e 8).....87

**Figura 41.** Eletroforese em gel de agarose (0,7 %) da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA após 24 h de incubação. Controles do dsDNA  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Poço 1) e mistura de dsDNA  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Poço 2, 3 e 4) .....88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de moléculas que interagem com o DNA via sulco.....	28
<b>Tabela 2.</b> Composição das soluções de eletrólito suporte.....	55
<b>Tabela 3.</b> Substâncias e seus respectivos potenciais na DPV.....	74
<b>Tabela 4.</b> Comparação de métodos eletroanalíticos para a determinação da 3- NO <sub>2</sub> -Tyr.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-NO<sub>2</sub>-Tyr – 3-nitro-tirosina

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata / cloreto de prata

AFM – Microscopia de força atômica (do inglês “*Atomic Force Microscopy*”)

CV- Voltametria cíclica (do inglês “*Cyclic Voltammetry*”)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”)

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês “*Differential Pulse Voltammetry*”)

dsDNA – DNA fita dupla (do inglês “*Double stranded*”)

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês “*Spectroscopy Impedance Electrochemical*”)

ELISA – Ensaio enzima-ligado de imunoabsorção (do inglês “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”)

FLD – Detecção por fluorescência (do inglês “*Fluorescence Detector*”)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “*Glassy Carbon Electrode*”)

GCE / MWCNT – Eletrodo de carbono vítreo / Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês “*Multi-Walled Carbon Nanotubes*”)

HMDE – Eletrodo gotejante de mercúrio (do inglês “*Hanging mercury drop electrode*”)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)

HOPG – Grafite pirolítico altamente orientado (do inglês “*Highly Oriented Pyrolytic Graphite*”)

HPLC-ECD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography – Electrochemical Detection*”)

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (do inglês “*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*”)

LOD – Limite de detecção (do inglês “*Limit of Detection*”)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês “*Limit of Quantitation*”)

MS – Espectrometria de massas (do inglês “*Mass Spectrometry*”)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (do inglês “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*”)

pH – Potencial de hidrogeniônico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “*Ribonucleic Acid*”)

RNS – Espécies reativas de nitrogênio (do inglês “*Reactive Nitrogen Species*”)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês “*Reactive Oxygen Species*”)

SCE – Eletrodo de calomelano saturado (do inglês “*Saturated Calomel Electrode*”)

STM – Microscopia de tunelamento por varredura (do inglês “*Scanning Tunneling Microscope*”)

SWV – Voltametria de onda quadrada (do inglês “*Square Wave Voltammetry*”)

TAE - Tris base [tris(hidroximetil)aminometano]

Tyr- Tirosina

UV-Vis – Espectroscopia no ultravioleta visível

---

# **CAPÍTULO 1**

## ***INTRODUÇÃO***

## 1.1. INTRODUÇÃO

Espécies altamente reativas de nitrogênio (RNS do inglês “*Reactive Nitrogen Species*”) e de oxigênio (ROS do inglês “*Reactive Oxygen Species*”) a partir do metabolismo celular são produzidos no organismo, em baixas concentrações, e desempenham inúmeras funções, tais como na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (DU et al., 2004; OLIVEIRA, BRETT, 2012; VASCONCELOS et al., 2007). No entanto, o excesso desses radicais, geralmente produzidos por agentes externos como a radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos, pode causar danos oxidativos em moléculas biológicas importantes, DNA e proteínas, e mutações, com consequências diretas em muitos processos patológicos (DU et al., 2004; OLIVEIRA, BRETT, 2012; VASCONCELOS et al., 2007).

Reações com RNS podem nitrar aminoácidos aromáticos, como por exemplo a tirosina, gerando 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. A produção *in-vivo* da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr está associada ao aparecimento de inúmeras doenças, tais como lesão pulmonar aguda, neurodegeneração, aterosclerose e alguns tipos de câncer (SARVER et al., 2001; DU et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2007; MAHMOUDI et al., 2016). Conseqüentemente, a interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA vem sendo investigada para determinar sua toxicidade/carcinogênese (MIHM et al., 2000; MURATA; KAWANISHI, 2004). Recentemente foi levantado que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr pode contribuir para disfunção endotelial vascular através de danos no DNA e/ou apoptose (MIHM et al., 2000) e que a sua geração *in-vivo* pode favorecer a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, um indicador de dano oxidativo no DNA (MURATA; KAWANISHI, 2004). Assim, ainda se faz necessário a investigação das propriedades químicas da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, enfatizando suas possibilidades reacionais *in-vivo*. Além disso, 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 (SARVER et al., 2001; SHAROV et al., 2006; WANG et al., 2007; ERDAL et al., 2008; GUO et al., 2009; KILCIKSIZ et al., 2011; LI et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017).

Para postular mecanismos de reações redox de diferentes espécies, técnicas voltamétricas, como voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV), bem como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), utilizando principalmente eletrodos sólidos de carbono, ouro ou platina, são bastante utilizadas. Assim, inúmeros mecanismos têm sido postulados na literatura por estudos eletroquímicos e co-relacionados com dados bioquímicos que ocorrem *in-vivo* (PONTINHA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA, 2015). Além disso, considerando a alta sensibilidade das técnicas voltamétricas de pulso, como DPV e SWV, elas têm grande relevância para o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas (BRETT, OLIVEIRA-BRETT, 1993; PACHECO et al., 2013).

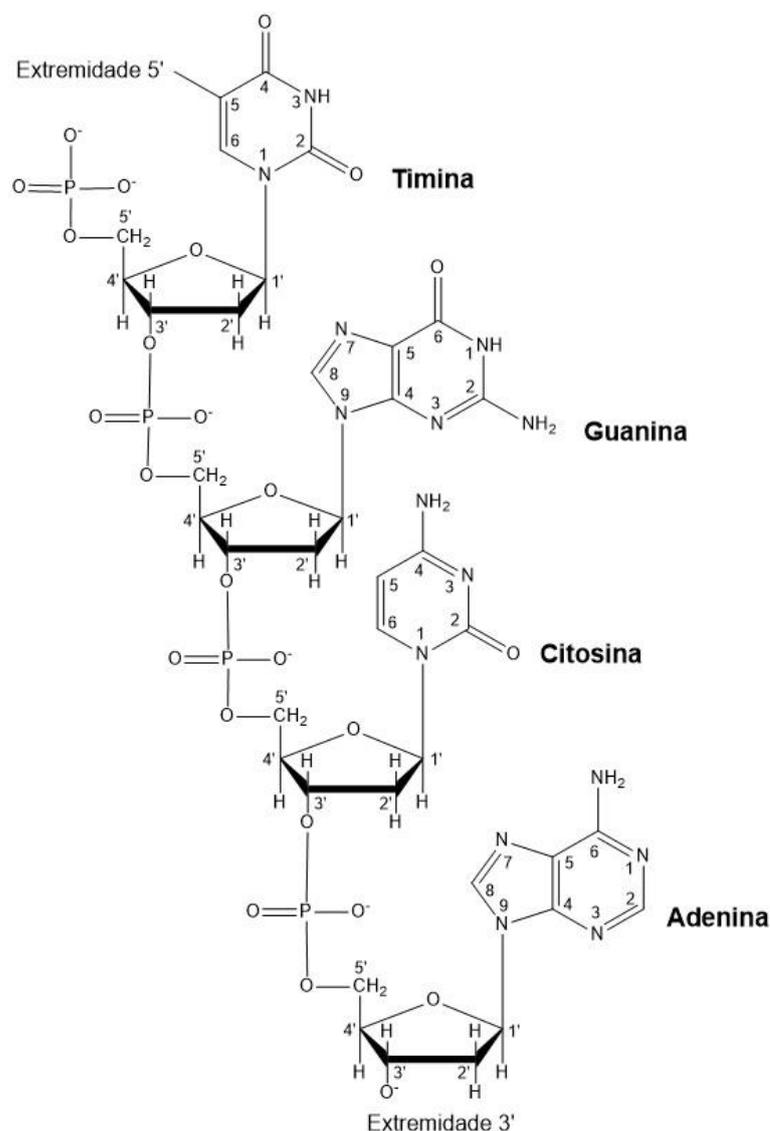
Este trabalho tem como objetivo estudar o comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr bem como sua interação com o DNA. Para isso, este estudo foi dividido em três etapas. Primeiramente, foi investigado a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em GCE utilizando técnicas voltamétricas como CV, DPV, SWV e EIS a fim de certificar suas propriedades intrínsecas bem como sua estabilidade no meio fisiológico. Na segunda etapa, um método eletroanalítico foi desenvolvido para a detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr usando SWV em meio neutro, pH = 7,0. Além disso, o comportamento de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi investigado em outros substratos eletroquímicos como em eletrodo de platina e ouro, com a finalidade de comparar e confirmar os resultados obtidos em GCE. Para ambos os substratos um método eletroanalítico utilizando SWV foi desenvolvido para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0. Por último, foi estudado a interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA utilizando DPV e como complementação foi utilizado a técnica de eletroforese em gel. Todas as etapas tiveram como objetivo principal postular um mecanismo de oxidação para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr bem como observar o grau de toxicidade/reatividade da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com o dsDNA.

## 1.2. Ácido desoxirribonucleico: Estrutura, propriedade e funções

### 1.2.1. Estrutura primária

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero formado por monômeros de nucleotídeos. Os nucleotídeos do DNA consistem de três espécies químicas unidas por ligações covalentes, uma base nitrogenada (timina, guanina, citosina ou adenina), a desoxirribose e um grupo fosfato, **Fig. 1**. A estrutura denominada primária do DNA é justamente a ordem das bases na sequência de polinucleotídeos (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

**Figura 1.** Parte da cadeia polinucleotídica de uma molécula de DNA.



O DNA possui bases que são classificadas de dois tipos: as bases purínicas, que são compostos aromáticos de anéis condensados, a adenina e a guanina, **Fig. 1**, e as bases pirimidínicas, compostos aromáticos de um único anel, a citosina e a timina, **Fig.1** (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

O açúcar presente na molécula de DNA é a desoxirribose, que contém dois hidrogênios na posição C-2', **Fig. 1**. Quando o açúcar é ligado covalentemente com uma base purínica ou pirimidínica há a formação de um composto denominado nucleosídeo. Esta ligação é feita pelo carbono C-1' do açúcar ao nitrogênio N-1 das pirimidinas ou ao nitrogênio N-9 das purinas através de uma ligação covalente chamada  $\beta$ -glicosídica (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

Por outro lado, quando o ácido fosfórico é esterificado com um dos grupos hidroxila da parte do açúcar de um nucleosídeo, se tem a formação de um nucleotídeo. A partir da polimerização desses via ligação repetida 3',5' – fosfodiéster, forma-se a estrutura primária do DNA, **Fig. 1** (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

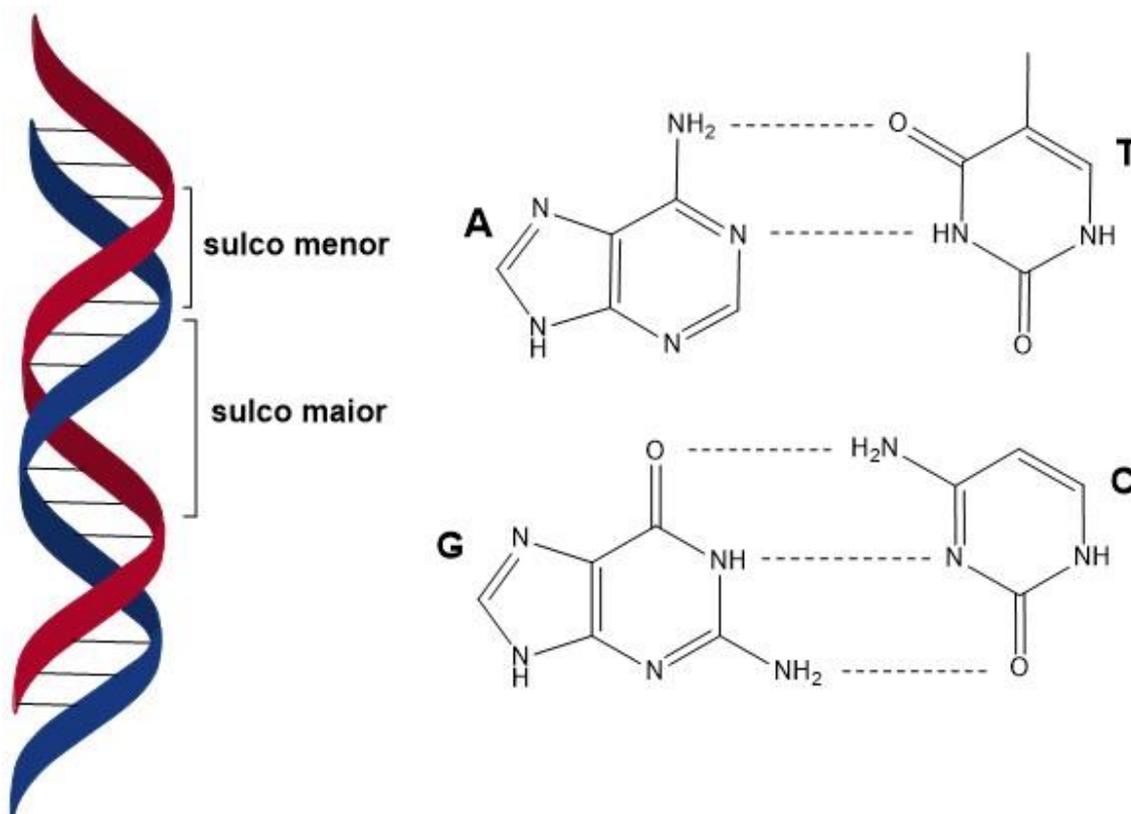
### 1.2.2. Estrutura secundária do DNA: A fita dupla

A molécula do DNA é uma fita dupla (dsDNA) também denominada de estrutura secundária, na qual duas longas cadeias de polinucleotídeos se enrolam uma na outra, **Fig. 2**. Pontes de hidrogênio entre as bases em fitas opostas estabelecem o alinhamento da hélice, com os pares de base em planos perpendiculares ao eixo e as moléculas de desoxirribose e fosfato na parte externa da dupla hélice, **Fig. 2** (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

Na década de 50, análises quantitativas realizadas pelo pesquisador Chargaff mostrou claramente que a quantidade de adenina sempre era equivalente a quantidade de timina e a quantidade de guanina sempre equivalente à de citosina na dupla hélice do DNA (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017). Esta condição é estabelecida uma vez que as bases dos polinucleotídeos para formação da hélice estão ligadas por ligações de hidrogênio com emparelhamento exclusivo de bases

complementares, onde A emparelha apenas com T (AT) e C emparelha apenas com G (CG), **Fig. 2** (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

**Figura 2.** Modelo do DNA de fita dupla (esquerda) e pareamento de bases do DNA (direita). Ligações de hidrogênio entre os pares de bases adenina-timina e guanina-citosina. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio.



### 1.2.3. Funções biológicas do DNA

O núcleo de cada célula possui no mínimo uma molécula de dsDNA, responsável pela síntese de proteínas e de carregar a informação genética e repassar de uma geração para outra (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

A replicação do DNA é um processo que ocorre *in-vivo* devido exclusivamente a existência da estrutura secundária do DNA. Durante a replicação do DNA as ligações de hidrogênio entre as bases G-C e A-T são quebradas e as fitas separadas serão posteriormente atacadas por nucleotídeos do fluido celular, para formação das fitas duplas de duas novas moléculas de

DNA. Essa replicação do DNA semiconservativa é realizada por um complexo de proteínas múltiplas denominadas de replissomo (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

O DNA também é responsável pela síntese de proteínas, uma vez que é utilizado como molde para produção de moléculas de RNA. As moléculas de RNA, com uracila substituindo a timina, transportam a informação genética para fora do núcleo até a região que ocorrerá a produção das proteínas na célula, sendo também chamadas de moléculas mensageiras (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

Vários fatores também podem causar a desnaturação do DNA, isto é a separação das fitas, onde as ligações de hidrogênio e as interações do empilhamento são rompidas, como, por exemplo, pH muito alto ou muito baixo e aumento da temperatura que desestabiliza a dupla hélice (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

A desnaturação do DNA pode ser medida e monitorada por diferentes caminhos. Um dos métodos envolve a medição de um aumento característico na sua absorvância na região do UV (260 nm) denominado hipercromicidade que tem como resultado o desempilhamento das bases (SINDEN, 1994; ATKINS; JONES, 2011; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

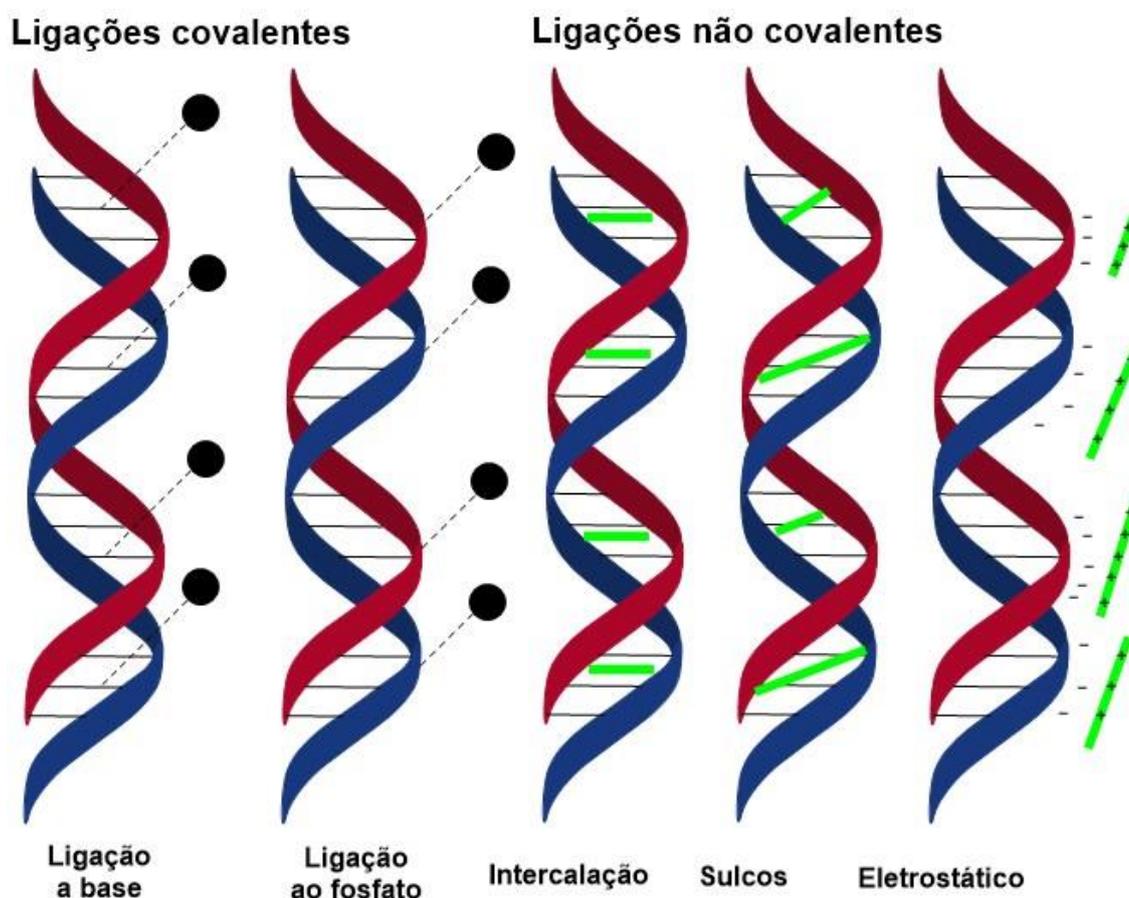
#### **1.2.4. Modos de interação de pequenas moléculas com o DNA**

O estudo dos mecanismos de reação de diferentes espécies químicas, proteínas, pequenas moléculas, íons e radicais, com o DNA é bastante relevante, para a compressão de diferentes mecanismos/processos que ocorrem *in-vivo*, como celulares, patológicos e de diferentes fármacos que atuam diretamente no DNA, como muitos antineoplásicos (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al. 2018).

As pequenas moléculas podem interagir com a molécula do DNA, no geral de dois modos de ligação, covalente que ocorre através da interação direta no DNA, geralmente no grupo fosfato ou nas suas bases nitrogenadas. E não covalente que ocorre através da intercalação, interações eletrostáticas ou interações nos sulcos da molécula na estrutura do DNA de fita dupla, **Fig. 3**

(SIRAJUDDIN et al., 2013; BARRA; NETTO, 2015; OLIVEIRA et al., 2017; CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017).

**Figura 3.** Modelos de modos de ligação de pequenas moléculas com o DNA.



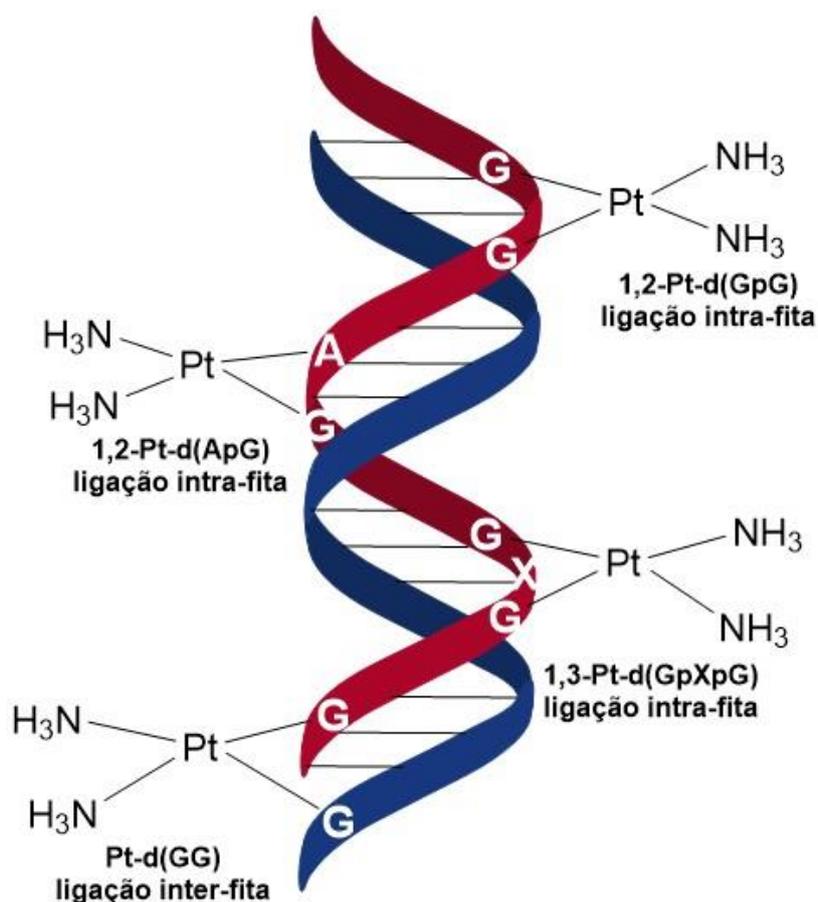
#### 1.2.4.1. Modo de ligação covalente

O modo de ligação covalente de pequenas moléculas com o DNA, geralmente ocorre no grupo fosfato ou nas bases do DNA, um bom exemplo é o antineoplásico cisplatina [cis-diclorodiaminaplatina (II)], amplamente utilizada no tratamento de diferentes tipos de câncer, câncer de bexiga, cabeça, pescoço, pulmão, ovário e testículo, que quando entra na célula perde os cloretos e em seguida liga-se covalentemente ao DNA nucleico para formar ligações Pt-DNA. A posição mais favorável na base do DNA para reagir com a cisplatina é o local N7 do resíduo de desoxiguanosina, **Fig. 4**. Inicialmente a cisplatina forma apenas

uma ligação covalente e numa segunda reação pode interagir com uma segunda guanina formando um reticulado no DNA. Se as duas bases estiverem na mesma fita a ligação covalente é denominada de intra-fita, em duas cadeias diferentes é denominada de inter-fitas. A cisplatina também reage com resíduos de desoxiadenosina, mas com baixa afinidade de interação, **Fig. 4**, (WANG; ZHU, 2018).

**Figura 4.** Cisplatina ligado no modo covalente ao DNA principalmente na posição N7 da guanina.

**Fonte:** Adaptado de WANG; ZHU, 2018.



Alguns agentes alquilantes são utilizados para o tratamento do câncer e envolvem reações diretamente na guanina no DNA, onde grupos alquilas são adicionados covalentemente na posição N7 da guanina devido sua alta reatividade. Alguns exemplos de agentes alquilantes são: temozolomida, dacarbazina, clorambucil, ciclofosfamida, carmustina, lomustina, etc (SIRAJUDDIN et al., 2013). Por outro lado, agentes alquilantes, tais como

haletos de metila, dietilnitrosamina, 1,2-dimetil-hidrazina, N-etil-N-nitrosourea que são adquiridos pela dieta alimentar são consequentemente tóxicos e hoje já são associados ao aparecimento de diferentes processos patológicos em humanos (NASCIMENTO et al., 2018; MENDES et al., 2019).

#### **1.2.4.2. Modo de ligação não-covalente**

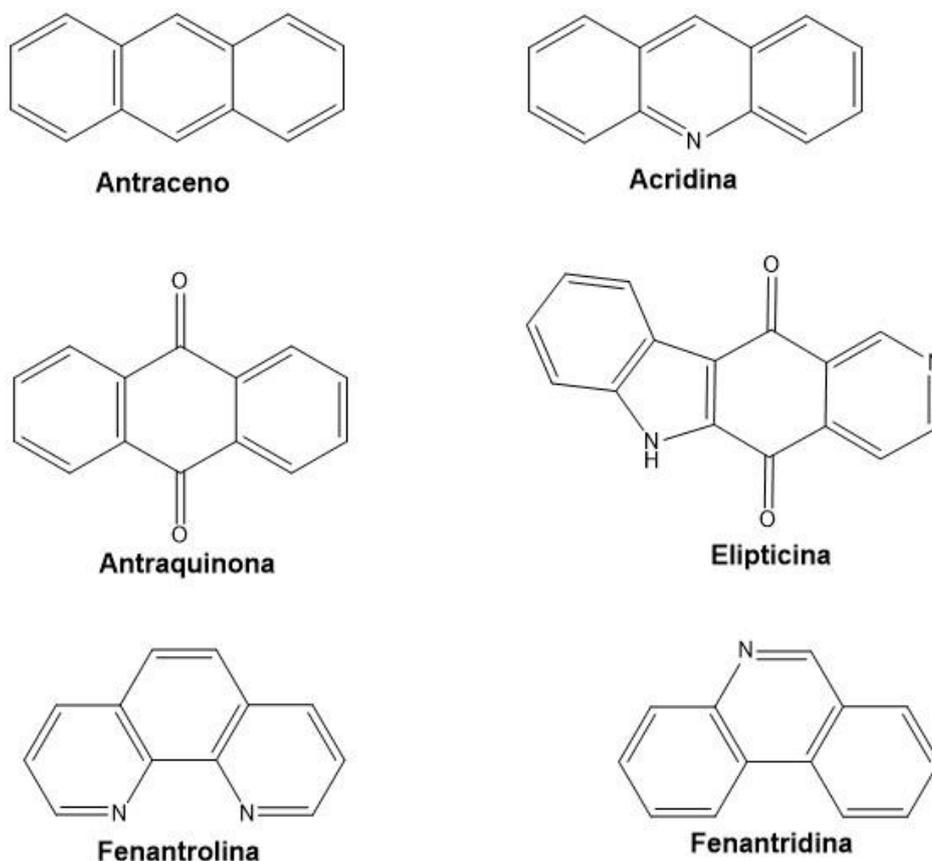
Diferentes espécies, tais como pequenas moléculas e íons, podem reagir diretamente com o DNA via ligação não-covalente, por exemplo via intercalação, interação nos sulcos e ligação externa que se refere ao exterior da fita, **Fig. 3** (NI; LIN & KOKOT, 2010). O estabelecimento dessas interações é de extrema relevância bioquímica, pois poderá estabelecer o grau de toxicidade de possíveis agentes carcinógenos, que incluem produtos do próprio metabolismo celular, bem como fontes exógenas, como espécies genotóxicas presentes na dieta, uma vez que também provocam alterações significativas no DNA, tais como mudanças conformacionais na estrutura da dupla fita, alteração na tensão de torção do DNA e pode interromper interações de importantes enzimas com o DNA, responsáveis por exemplo pelos processos de replicação celular (SIRAJUDDIN et al., 2013). Todos esses fatores podem ter efeitos substanciais na expressão gênica (SIRAJUDDIN et al., 2013).

##### **1.2.4.2.1. Intercalação**

A intercalação foi vista pela primeira vez na literatura por Lerman para explicar a forte afinidade que alguns corantes heterocíclicos aromáticos têm com a molécula de DNA, **Fig. 5** (REHN; PINDUR, 1996; SHUI et al., 2000; MARTÍNEZ; GARCÍA, 2005). Os intercaladores estão ligados perpendicularmente ao esqueleto do DNA por forças intermoleculares (ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e/ou transferência de cargas), formando um complexo estável DNA-intercalador, entretanto sem quebrar as ligações de hidrogênio entre as bases, **Fig. 3** (WARING; BAILLY, 1994; REHN; PINDUR, 1996; BAGINSKI et al., 1997; SHUI et al., 2000; MARTÍNEZ; GARCÍA, 2005). Algumas espécies que intercalam no DNA são utilizadas no tratamento quimioterápico para inibir a replicação do DNA em células cancerígenas de rápido crescimento, pois esses intercaladores

provocam alterações estruturais no DNA que estabiliza, alonga, endurece e desenrola a dupla hélice do DNA (BAUER; VINOGRAD, 1970).

**Figura 5.** Estruturas heterocíclicas aromáticas que interagem via intercalação com o DNA.



#### 1.2.4.2.2. Interação nos sulcos

As interações nos sulcos ocorrem com a interação direta da molécula com as bases nitrogenadas localizadas no sulco menor ou maior, **Fig. 2**. Os sulcos maior ou o menor diferem consideravelmente no potencial eletrostático e características da composição das bases, como exemplo, nas ligações de hidrogênio, nos efeitos estéreos e na hidratação (POLICARPI, 2008). Alguns pequenos compostos se ligam ao sulco menor do DNA a partir da interação de Van der Waals e ligação de hidrogênio. Geralmente são fármacos que possui vários anéis aromáticos como o pirrol, furano ou benzeno, onde estão unidos por ligações que tem capacidade de torção, favorecendo a promoção de interações de Van der Waals (MEI; BARTON, 1986; SILVA, 2016). Além de que, esses

fármacos podem fazer ligações de hidrogênio com as bases de preferência com a adenina e timina (MEI; BARTON, 1986). Esta preferência se dá provavelmente a melhores interações de Van der Waals entre as paredes do ligante e do sulco nessa região, já que as regiões AT são mais estreitas que as regiões do sulco GC e devido ao impedimento estérico apresentado pelo grupo amino C2 da base guanina (MEI; BARTE, 1986). As tiazotropinas constituem uma classe de moléculas biologicamente ativas conhecidas por formarem complexos de ligação dentro do sulco menor do DNA e outros exemplos de alguns ligantes clássicos que interagem por via sulco são Hoechst 33258, berenil, netropsina, distamicina A e seus derivados que são mostrados na tabela abaixo, **Tabela 1**, (SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016).

**Tabela 1.** Exemplos de moléculas que interagem com o DNA via sulco.

Molécula	Interação	Referência
Tiazotropinas	Via sulco	SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016
Hoechst 33258	Via sulco	SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016
Berenil	Via sulco	SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016
Netropsina	Via sulco	SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016
Distamicina A	Via sulco	SALVIA et al., 2013; SILVA, 2016

#### 1.2.4.2.3. Ligação externa (eletrostática)

A ligação externa é um tipo de ligação de natureza eletrostática. Esse tipo de ligação ocorre geralmente a partir da interação de cargas negativas do fosfato presente na estrutura do DNA e cargas positivas de pequenas moléculas ou íons (REHMAN et al., 2015; OLIVEIRA; BRETT, 2008). Cátions metálicos como  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  e  $Ni^{2+}$  são considerados possíveis cancerígenos, um vez que experimentos *in-vitro* demonstraram que os mesmos podem interagir com o DNA por afinidade eletrostática nos grupos fosfatos e também provocando com o tempo de exposição outros tipos de interações, como danos oxidativos nas bases (OLIVEIRA; BRETT, 2008).

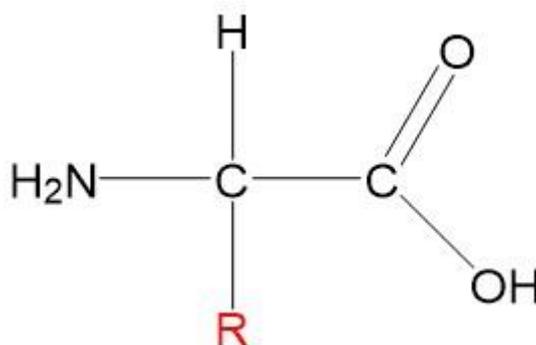
Assim, devido a grande relevância deste tema inúmeras técnicas analíticas têm sido utilizadas na investigação das interações de diferentes

espécies químicas com o DNA, tais como espectrometria UV-Vis, infravermelho e Raman, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa, microscopia de força atômica (AFM) e de varredura por tunelamento (STM), técnicas eletroquímicas como a voltametria de pulso diferencial (DPV), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), eletroforese em gel, técnicas de modelagem molecular e DNA Footprinting (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Dentre essas técnicas, a DPV tem se destacado por ser uma técnica seletiva e altamente sensível (CHIORCEA-PAQUIM et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018). A DPV será discutida mais detalhadamente na *Seção 1.5.2*.

### 1.3. Aminoácidos: estrutura e funções

Os aminoácidos têm como função agir como transportadores de nitrogênio, neurotransmissores e precursores de outras moléculas biológicas, sendo a maioria encontrados em proteínas. A estrutura geral dos aminoácidos é composta por um grupo amina e carboxila em que ambos estão ligados a um carbono assimétrico ou também denominado de carbono alfa ( $\alpha$ ). Este carbono  $\alpha$  também está ligado a um hidrogênio e ao grupo de cadeia lateral, representado pela letra R, **Fig. 6** (—), que determina a identidade do aminoácido específico. Portanto, a cadeia lateral é o que diferencia um aminoácido do outro, em diferentes características, por exemplo estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando significativamente suas propriedades químicas, **Fig. 7** (LEHNINGER et al., 2014; CAMPBELL; FARRELL, 2017).

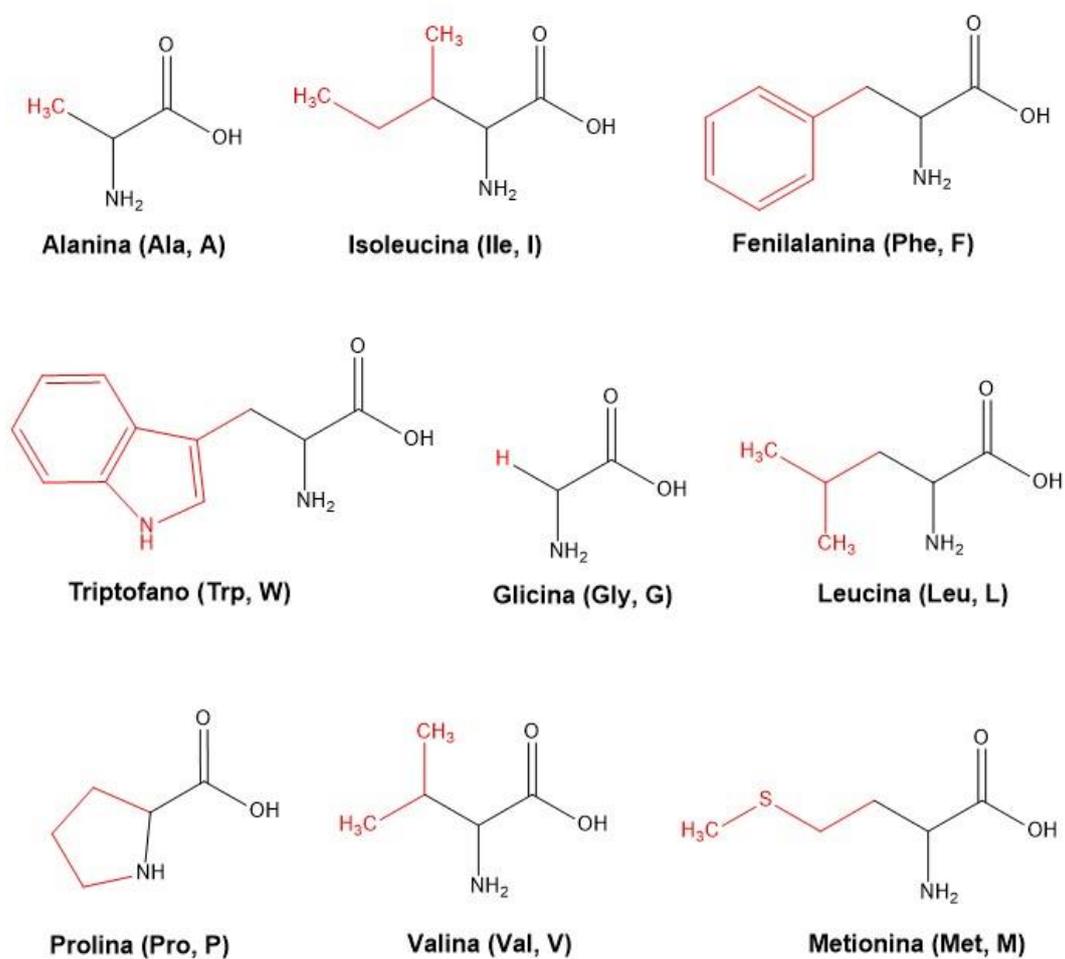
**Figura 6.** Estrutura geral dos aminoácidos.



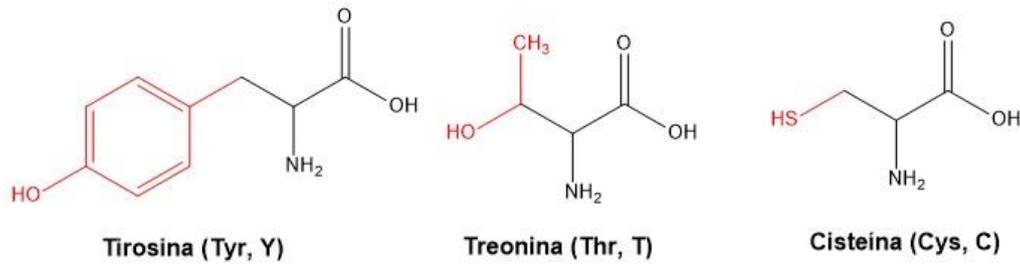
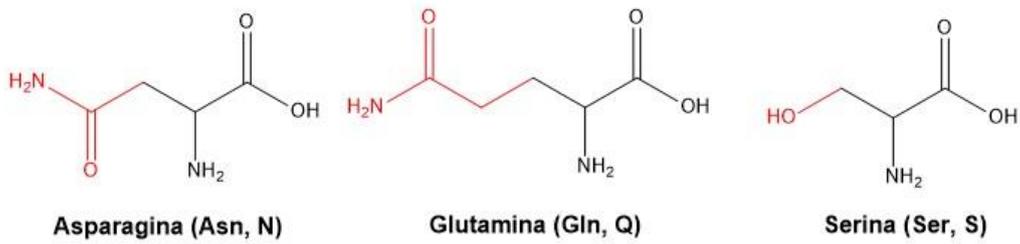
Os aminoácidos são divididos em quatro grupos a partir de suas cadeias laterais (grupos R) (CAMPBELL; FARREL, 2017), **Fig. 7**, tais como:

**Figura 7.** Estruturas químicas e propriedades químicas dos aminoácidos que compõem as proteínas, (—) cadeia lateral.

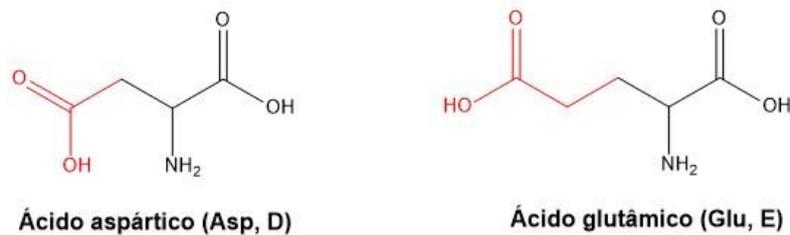
**Aminoácidos com cadeias laterais apolares não-carregadas**



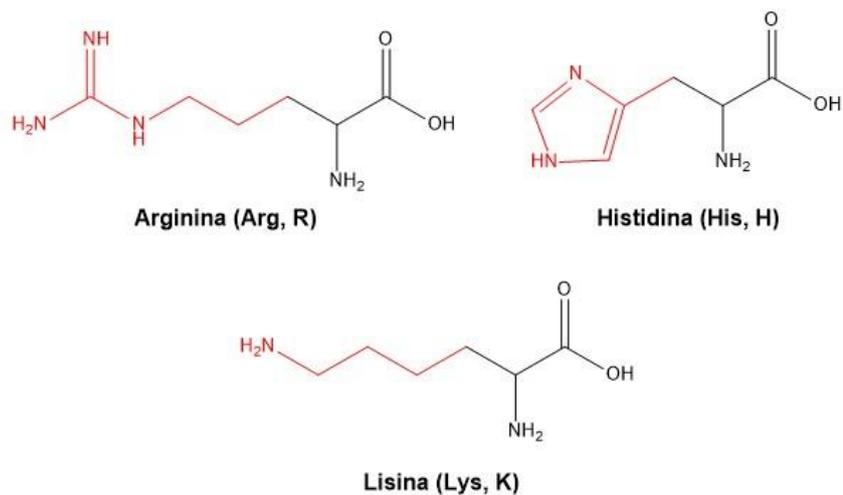
### Aminoácidos com cadeias laterais polares não-carregadas



### Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos)



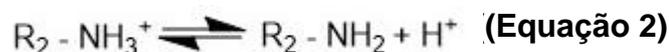
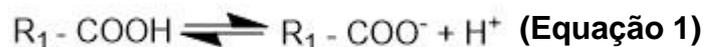
### Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos)



- Aminoácidos com cadeias laterais apolares não carregadas: os grupos R são apolares e hidrofóbicos.

- Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas: os grupos R são mais solúveis em água, pois possui grupos funcionais que realizam ligações de hidrogênio com a água deixando-os mais hidrofílicos.
- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente (ácidos): possui grupos carboxila em suas cadeias laterais em que esse grupo pode perder um próton, formando o ânion carboxilato que por esse motivo essa classe é carregada negativamente em meio neutro. Apresentam grupos R hidrofílicos.
- Aminoácidos com cadeias laterais carregadas positivamente (básicos): possui grupos amina que são carregadas positivamente em pH neutro. Apresentam grupos R hidrofílicos.

Os aminoácidos podem agir tanto como ácidos quanto como bases em solução aquosa, pois os grupos carboxila e amina da estrutura geral estão carregados em pH neutro. Variando o pH do meio, esses grupos apresentam vários equilíbrios envolvendo a transferência de próton:



Como o estado de ionização depende do pH do meio, podem predominar o grupo amina (forma catiônica) ou o grupo carboxila (forma aniônica) com a variação do pH do meio. Diante disso, tanto os aminoácidos livres quanto os aminoácidos combinados por meio de ligações peptídicas podem agir como tampões (CAMPBELL; FARRELL, 2017).

### 1.3.1. Oxidação de aminoácidos

Os aminoácidos são alvos primários de oxidação *in-vivo* dentro das células por causa da sua abundância e geralmente ocorre através de ROS e RNS, que são produzidas por reações metabólicas na parte interna das células a partir dos produtos de reações de estresse oxidativo (STADTMAN; LEVINE, 2003) ou na presença de fortes oxidantes, onde isso pode acarretar danos ou a modificações estruturais nesses aminoácidos (STADTMAN, 1992; STADTMAN,

LEVINE, 2003).

As ROS e RNS são geradas por vias endógena ou exógena dentro das células. Por via endógena, tem consequência direta do metabolismo aeróbico nas mitocôndrias, peroxissomas, NADPH oxidase, citocromo P450, etc. E por via exógena, é devido a exposição ultravioleta, quimioterápicos e xenobióticos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O dano celular nos aminoácidos resulta de ataque das ROS e RNS, onde são conhecidos por causarem inúmeras doenças como neurológicas, pulmonares, cardiovasculares, doenças autoimunes, entre outras (SHACTER, 2000; STADTMAN, 1992; STADTMAN, LEVINE, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A oxidação dos aminoácidos ocorre principalmente nas suas cadeias laterais. Portanto, toda a estrutura do aminoácido é modificada afetando sua atividade *in-vivo*. A tirosina é um aminoácido não essencial (próprio organismo sintetiza) e é levemente hidrofílica e isso é explicado pelo seu anel aromático hidrofóbico contendo apenas um grupo hidroxila. A Tyr pode sofrer oxidação por RNS e ter sua estrutura modificada, formando a 3-nitro-tirosina [ácido (2-amino-3-(4 hidroxil-3-nitrofenil) propanoico)] (TOPKAYA *et al.*, 2018).

#### 1.4. 3-nitro-tirosina (3-NO<sub>2</sub>-Tyr)

A 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é uma modificação causada pela ação de agentes nitrantes, por exemplo RNS. A Tyr é modificada no C3 do anel fenólico com a adição do grupo nitro, **Fig. 8** (ABELLO *et al.*, 2009).

A adição de um grupo nitro infere propriedades físico-químicas específicas ao aminoácido modificado e as proteínas correspondentes que podem ter importantes consequências funcionais (ABELLO *et al.*, 2009). O pKa do fenol OH para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr cai para aproximadamente 7, resultando que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr torna-se cerca de 1000 vezes mais ácida que a Tyr (KONG, 2017). Uma carga fortemente negativa, dependendo do seu meio, pode perturbar a estrutura da proteína e possivelmente alterar a sua função. Isso pode ser mediado via perda ligações de hidrogênio, repulsão de carga negativa-negativa, estabilização da estrutura da proteína por fazer uma nova interação de carga negativa-positiva

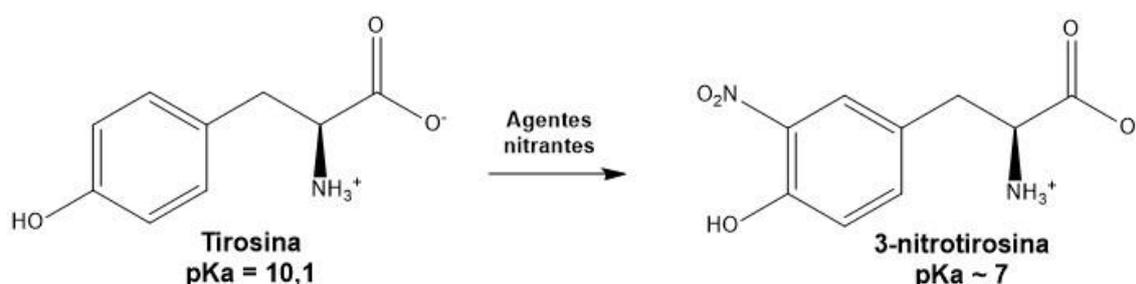
ou alterações das propriedades químicas/físicas de uma superfície da proteína (ZHAN et al., 2013).

Pode-se destacar outra diferença nas propriedades químicas entre a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e a Tyr, que é a dependência do pH para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Essa dependência do pH para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é observada no perfil de emissão e excitação. A Tyr emite a 303 nm, enquanto a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr emite uma cor amarela intensa em função do aumento do pH. Contudo, a principal queda do pKa do grupo OH e o perfil de absorvância são informações gerais importantes das propriedades químicas da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e Tyr (ZHAN et al., 2013; KONG, 2017).

A conversão da tirosina para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr pode resultar em sérias consequências para uma célula se proteínas específicas ou enzimas são modificadas, que podem levar a danos celulares adicionais, possivelmente resultando em morte celular programada ou apoptose (SARVER et al., 2001).

**Figura 8.** Estrutura da tirosina (esquerda) e 3-nitro-tirosina (direita) e suas principais diferenças em propriedades químicas.

**Fonte:** adaptado de HASEEB, 2013; TOPKAYA et al., 2018.



Várias doenças estão associadas a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, tais como, doenças cardiovasculares, câncer, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, doença de Alzheimer e doenças inflamatórias (DU et al., 2004). Assim na literatura recente é ainda de extrema importância estabelecer as propriedades químicas da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e suas diferenças frente a Tyr. As propriedades redox da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr têm sido investigadas utilizando técnicas eletroanalíticas (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001; DU et al., 2004; RICHARDS et al., 2006; CONVENTZ et al., 2007; ABELLO et al., 2009; ACAR et al., 2015; TEIXEIRA et

al., 2017; TOPKAYA et al., 2018) e esses trabalhos serão mencionados mais detalhadamente na *Seção 1.7*.

Os possíveis mecanismos de interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com biomoléculas também vêm sendo investigados na literatura por diferentes técnicas (MIHM et al., 2000; MURATA; KAWANISHI, 2004). Mihn M.J. e colaboradores demonstraram que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr pode contribuir para disfunção endotelial vascular através de danos no DNA e/ou apoptose (MIHM et al., 2000). Já Murata M. e colaboradores demonstraram que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr contendo peptídeos podem aumentar a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, um indicador de dano oxidativo no DNA (MURATA; KAWANISHI, 2004). Recentemente a interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com polinucleotídeos foi demonstrada utilizando DPV e eletrodo de grafite (TOPKAYA et al., 2018). Deste modo, se faz necessário a investigação das propriedades químicas da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, enfatizando as possibilidades reacionais dessa espécie com moléculas biológicas, como o DNA, no organismo.

Além disso, a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr livre, bem como ligada a proteínas são produtos relativamente estáveis e podem ser consideradas como importantes biomarcadores de estresse oxidativo geral ou estados específicos da doença (SARVER et al., 2001). Portanto, diferentes métodos que quantifiquem com precisão e sensibilidade a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr vêm sendo desenvolvidos (SARVER et al., 2001; SHAROV et al., 2006; WANG et al., 2007; ERDAL et al., 2008; GUO et al., 2009; KILCIKSIZ et al., 2011; LI et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017). A técnica mais favorita para determinar a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é a HPLC (TEIXEIRA et al., 2017) acoplada com detector ultravioleta-visível (UV-Vis) (SHAROV et al., 2006; ERDAL et al., 2008; KILCIKSIZ et al., 2011) e sistema de detecção de fluorescência (FLD) (GUO et al., 2009), pois esses métodos cromatográficos apresentam boa sensibilidade e especificidade (TEIXEIRA et al., 2017). Espectrometria de massa (MS) ou espectrometria de massa acoplada com cromatografia líquida (LC-MS / MS) também é uma técnica utilizada devido a sua capacidade de detectar baixos níveis de concentração do analito (WANG et al., 2007; LI et al., 2015). No entanto, MS requer habilidades operacionais para a etapa de preparação da amostra. Bem como, a LC-MS/MS ser uma técnica considerada de alto custo devido a sua necessidade de isótopos de interesse. Além de métodos baseados em cromatografia, outros métodos existentes são

métodos baseados em anticorpos, como, por exemplo, ensaio enzima-ligado de imunoabsorção (ELISA) que serve para a detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tecidos e fluidos (SUN et al., 2007; WEBER et al., 2012). Um estudo eletroquímico com a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi o preparo de um sensor eletroquímico GCE/MWCNT (nanotubos de carbono de paredes múltiplas) que apresenta maior sensibilidade e especificidade para a determinação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (SILVA, 2017). HPLC com detecção eletroquímica (HPLC-ECD) é outro método que pode ser utilizado para a detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (DU et al., 2004).

## 1.5. Técnicas voltamétricas

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde se obtém informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química eletroativa a partir do registro de curvas potencial vs. corrente, denominada de voltamograma, realizadas durante a eletrólise dessa espécie química em uma célula eletroquímica em que contém pelo menos dois eletrodos: o eletrodo de trabalho, o qual ocorre o processo redox, e o eletrodo de referência. A oxidação ou redução das espécies na superfície do eletrodo ocorrerá numa região de potencial termodinamicamente ou cineticamente favorável (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006). Para sistemas controlados pelas leis da termodinâmica, o potencial do eletrodo pode ser usado para estabelecer a concentração das espécies eletroativas na superfície [ $C_o(0, t)$  e  $C_r(0, t)$ ] de acordo com a equação de Nernst, **Equação 3**, onde  $E^\circ$  é o potencial padrão para a reação redox,  $R$  é a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )  $T$  é a temperatura em Kelvin,  $n$  é o número de elétrons transferidos na reação e  $F$  é a constante de Faraday ( $96,487 \text{ C (coulombs)}$ ) (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

$$E = E^\circ + 2,3 RT / nF \log C_o(0, t) / C_r(0, t) \text{ (Equação 3)}$$

Na voltametria, estuda-se o processo eletroquímico, o qual é importante considerar, o transporte de massa da espécie até a superfície do eletrodo e a reação redox que ocorrerá no substrato eletroquímico utilizado. Sendo assim, a corrente gerada propriamente pela reação redox será influenciada por diferentes fatores, como a transferência de massa, transferência de carga e reações

químicas que ocorrem antes ou depois a transferência de elétrons, que podem ser homogêneas (protonação, dimerização, etc.) e heterogêneas (decomposição catalíticas, dessorção, adsorção, cristalização) (PACHECO et al., 2013).

É imprescindível que o transporte de massa seja contínuo, senão, a concentração da espécie eletroativa de interesse na superfície do eletrodo irá decrescer rapidamente, impossibilitando a relação com a concentração do analito no seio da solução. O transporte de massa pode ocorrer de três formas distintas: por migração, por convecção e por difusão. Na voltametria, considera-se que o transporte de massa seja feito basicamente por difusão, onde a espécie química de interesse chega na superfície do eletrodo por movimentação espontânea devido a formação de um gradiente de concentração (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006; PACHECO et al., 2013).

A corrente resultante da oxidação ou da redução das espécies eletroativa investigada é denominada de corrente faradaica, uma vez que obedece a lei de Faraday (1 mol da espécie eletroativa envolve  $n \times 96487$  C), sendo uma medida direta da velocidade da reação. A corrente total é o somatório da corrente faradaica da espécie e da corrente capacitiva. A corrente capacitiva relacionada com a carga/descarga da capacitância de dupla camada, seria como um capacitor devido acúmulo ou remoção de cargas na superfície do eletrodo de trabalho e no eletrólito. Entretanto a corrente capacitiva não está relacionada a nenhum processo redox com transferência de carga (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Para os testes voltamétricos geralmente é usado um sistema de três eletrodos numa célula eletroquímica. Os três tipos são: o eletrodo de referência, o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho que são imersos numa solução da amostra. O eletrodo de trabalho é o eletrodo que ocorre a reação de interesse, o eletrodo de referência fornece um potencial estável e reprodutível quando comparado ao eletrodo de trabalho e isso se deve a composição deste eletrodo com uma solução do par redox Ag/AgCl. Para minimizar a contaminação da solução da amostra, o eletrodo de referência pode ser isolado da amostra através de uma ponte intermediária utilizando um eletrodo auxiliar que pode ser algum material condutor inerte, como fio de platina ou haste de grafite (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006).

Os eletrodos de trabalho a base de carbono existem em diferentes formatos, tais como, grafite, carbono vítreo, nanotubo, fibra de carbono, diamante, etc e o de carbono vítreo é um dos mais usados na eletroquímica. Ele é duro, microestruturalmente isotrópico (o mesmo em todas as direções), onde apresenta condutividade elétrica e térmica menor quando comparado ao HOPG e outros grafites. Além disso, geralmente necessita de um polimento mecânico e/ou um tratamento eletroquímicos para a ativação da sua superfície visto que exposto a atmosfera sua superfície é desativada gradualmente (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006; SWAIN, 2007).

Os eletrodos de metais sólidos como o ouro e a platina são bastante explorados na eletroanálise, pois apresentam uma cinética de transferência eletrônica rápida para muitos sistemas redox como também possui uma janela de potencial anódico relativamente ampla quando comparado ao HMDE. Esses eletrodos geralmente também necessitam de um polimento mecânico e/ou um tratamento eletroquímico, para se obter uma cinética de transferência de elétrons mais rápida (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006; SWAIN, 2007).

A voltametria é largamente usada por químicos e bioquímicos para estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção em superfícies e para a determinação do mecanismo de elétrons e prótons e tem como importância a elucidação do mecanismo redox de diferentes espécies químicas como fármacos e moléculas biológicas fazendo uma comparação com os processos celulares que ocorrem *in-vivo*, em que muitos mecanismos ainda não são bem esclarecidos (OLIVEIRA-BRETT et al., 2002; SKOOG et al., 2006; OLIVEIRA-BRETT et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2010; CORDUNEANU et al., 2010);

### **1.5.1. Voltametria cíclica**

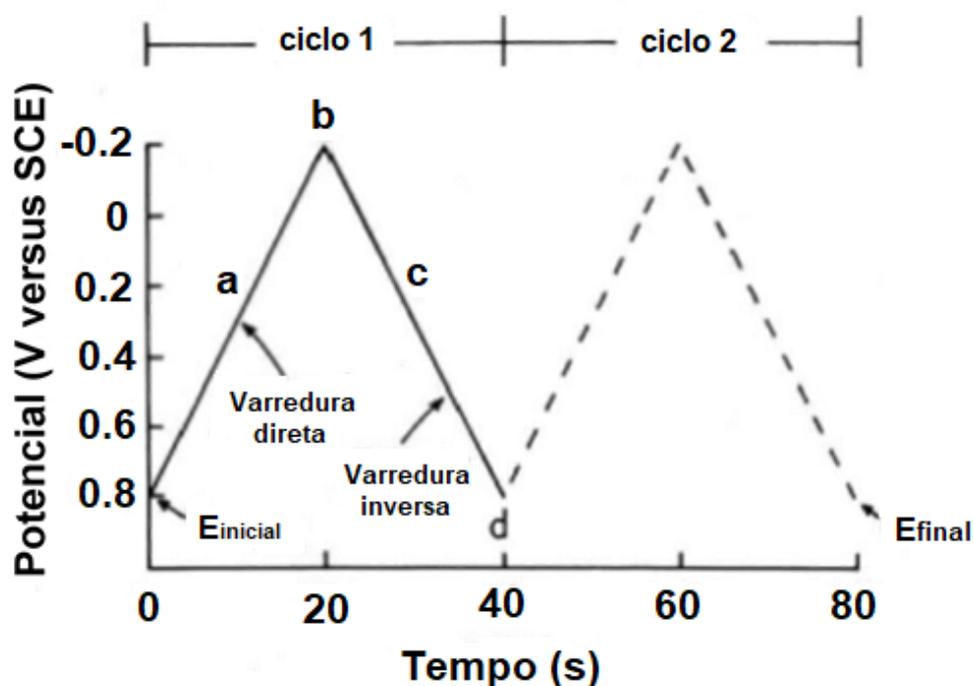
A voltametria cíclica (CV) é a técnica mais usada para fins qualitativos sobre os processos eletroquímicos que tem como características fornecer rapidamente informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferências de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; WANG, 2006; PACHECO et al., 2013). Na CV, a varredura de potencial é

aplicada linearmente no sentido direto e no sentido inverso no eletrodo de trabalho em repouso medindo-se a corrente resultante (SKOOG et al., 2006).

O sinal de excitação (potencial vs. tempo) na CV é uma varredura de potencial linear com uma forma de uma onda triangular, pois produz a varredura no sentido direto e no sentido inverso. Na **Figura 9**, é observado o sinal de excitação, onde tem início em + 0,80 V a - 0,20 V no sentido catódico e posteriormente o sentido da varredura é invertida no sentido anódico de potencial voltando para + 0,80 versus SCE (KISSINGER; HEINEMAN, 1983).

**Figura 9.** Sinal de excitação da CV – forma de onda triangular de potencial com uma faixa de potencial de +0,8 V a -0,2V versus SCE.

**Fonte:** Adaptado de KISSINGER; HEINEMAN, 1983



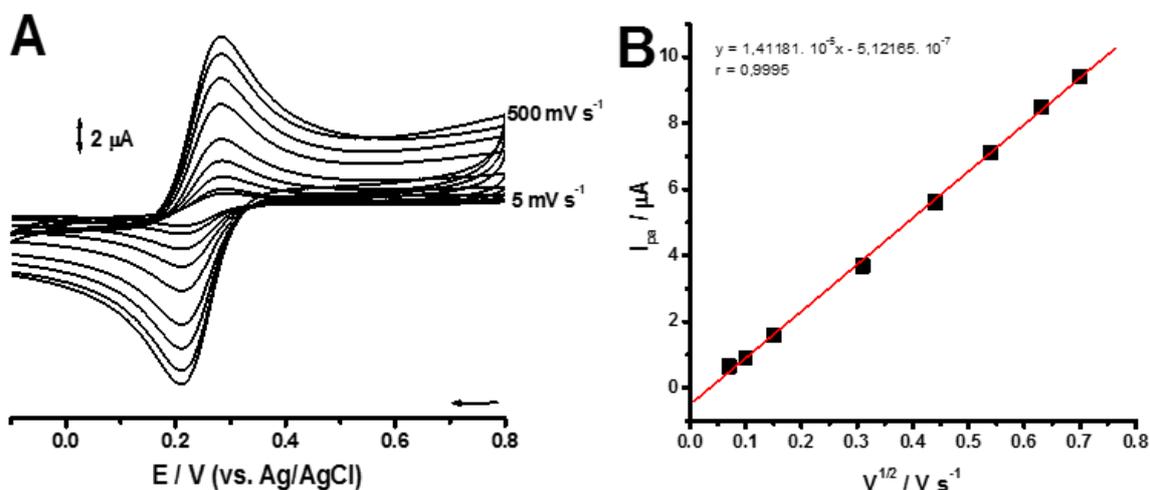
A CV tem como característica principal a inversão da varredura de potencial (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001), visto que importantes parâmetros eletroquímicos podem ser facilmente determinados como, potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ), correntes de picos catódico e anódico ( $I_{pc}$  e  $I_{pa}$ ) e os potenciais de meia onda ( $E_{1/2}$ ) (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993; FAULKNER, 2001; WANG, 2006).

**Exemplo:**

Na **Figura 10A**, está representado um voltamograma cíclico típico referente ao comportamento do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , em GCE, onde é observado a existência de dois processos redox, um pico catódico na varredura em sentido direto, a  $E_{pc} = + 0,22 \text{ V}$ , que corresponde à redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e um pico anódico na varredura em sentido inverso, a  $E_{pa} = + 0,28 \text{ V}$ , que corresponde à oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . A diferença entre o potencial do pico anódico e do pico catódico é de  $\sim 60 \text{ mV}$ , indicando que a reação redox é reversível. Além disso, considerando a equação utilizada apenas para sistemas reversíveis  $|E_{pa} - E_{pc}| \sim 2,3 \text{ RT/nF}$  (ou  $59/n \text{ mV}$  em  $298 \text{ K}$ ), observa-se que o processo ocorre com a transferência de apenas um elétron (OLIVEIRA BRETT; BRETT, 1996; SKOOG et al., 2006).

**Figura 10. (A)** Voltamogramas cíclicos do  $[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , em  $\text{KCl}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , para diferentes velocidades de varreduras ( $5\text{-}500 \text{ mV s}^{-1}$ ) em GCE ( $\phi = 1,6 \text{ mm}$ ) e **(B)** Gráfico da  $I_{pa}$  vs.  $V^{1/2}$  referente aos CVs do  $[\text{Fe}(\text{CN})]^{3-}$  em  $\text{KCl}$  para diferentes velocidades ( $5\text{-}500 \text{ mVs}^{-1}$ ).

**Fonte:** PRÓPRIO AUTOR



Também é demonstrado que a corrente do pico anódico cresce linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $R = 0,999$ ) indicando que o transporte de massa do íon  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  a superfície do eletrodo

é controlado predominantemente por difusão, **Fig. 10B**, (OLIVEIRA BRETT; BRETT, 1996).

Para um sistema reversível controlado por difusão temos a equação de Randles-Sevcik, **Equação 4**.

$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} C_0 v^{1/2} \text{ (Equação 4)}$$

Onde  $I_{pa}$  é a corrente do pico anódico, em amperes (A);  $n$  é o número de elétrons transferidos no processo ( $n = 1$ );  $A$  é a área do eletrodo em  $\text{cm}^2$ ;  $D_0$  é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa em  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $C_0$  é a concentração da espécie oxidada no seio da solução em  $\text{mol cm}^{-3}$  e  $v$  é a velocidade de varredura em  $\text{V s}^{-1}$ . A inclinação da reta referente ao gráfico  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  foi também determinada, **Fig. 10B**.

Já a equação de Randles-Sevcik para sistemas irreversíveis controlados predominantemente por difusão, **Equação 5**, (QUEIROZ et al., 2017; GUIDELLI et al., 2014; GUIDELLI et al., 2014; SHIMIZU et al., 2016), temos:

$$I_{p1a} \text{ (A)} = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_a + n)^{1/2} A [O]_{\infty} D_0^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 5)}$$

Onde  $n$  é o número de elétrons transferidos durante a oxidação da espécie química,  $A$  é a área eletroativa de GCE em  $\text{cm}^2$ ,  $D_0$  é o coeficiente de difusão em  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ,  $[O]_{\infty}$  é a concentração do analito em  $\text{mol cm}^{-3}$  e  $v$  é a velocidade de varredura em  $\text{Vs}^{-1}$ .

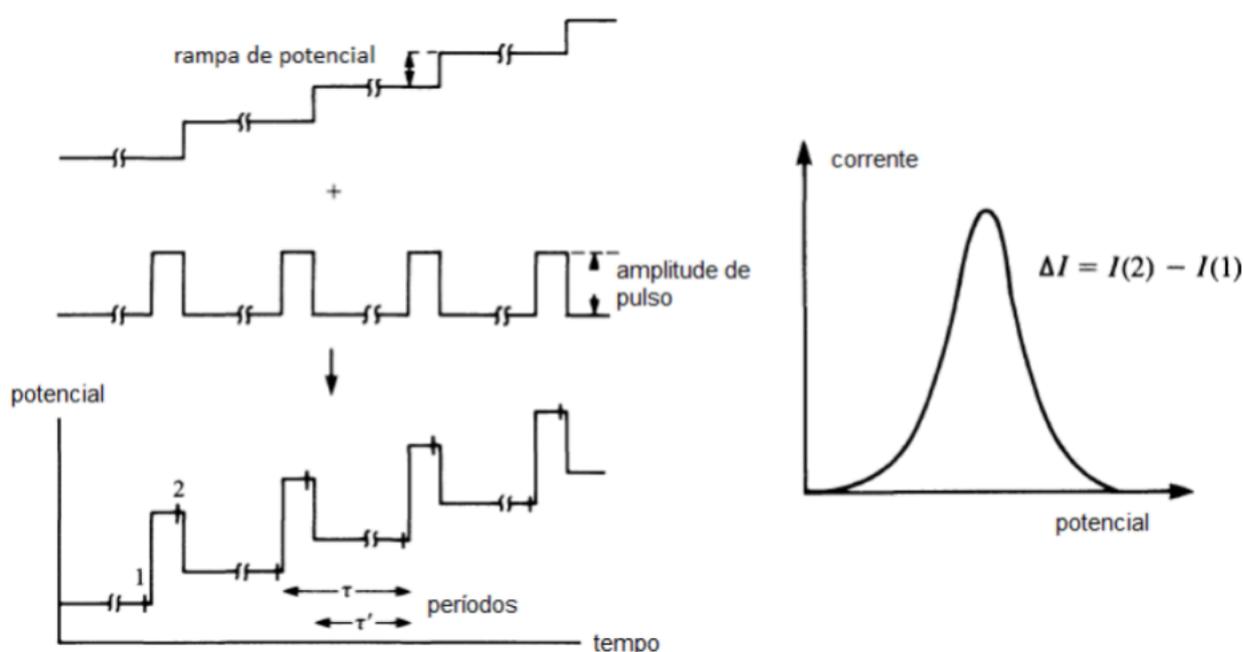
### 1.5.2. Voltametria de pulso diferencial

Barker e Jenkin foram os pioneiros a introduzir as técnicas de pulso com a finalidade de diminuir o limite de detecção nos testes eletroquímicos, onde há um aumento da corrente faradaica permitindo quantificar em concentrações baixíssimas na ordem de  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  da espécie química de interesse. Para isso, uma sequência de pulsos de potencial são aplicados por cerca de 50 ms ao eletrodo de trabalho, onde se obtêm a discriminação das correntes capacitiva e faradaica. A corrente capacitiva decai rapidamente (exponencialmente) enquanto a corrente faradaica decai mais lentamente (WANG, 2006).

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos superpostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho, **Fig. 11**, onde a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e a outra no final do pulso. A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda e essa diferença de corrente por pulso tem como resultado uma curva diferencial com um pico, **Fig. 11** (SKOOG et al., 2006; ALEIXO, 2002; PACHECO et al., 2013).

**Figura 11.** Sinais de excitação para a voltametria de pulso diferencial.

Fonte: PACHECO et al., 2013.



Uma das vantagens da DPV em forma de derivada é que os picos associados com os processos redox podem ser identificados para espécies com potenciais de meia onda muito próximos que se diferenciam entre 0,04 V e 0,05 V, mostrando alta seletividade quando comparada a CV, cuja necessita uma diferença de potencial em torno de 0,2 V entre os processos para uma boa resolução/separação das curvas (OLIVEIRA-BRETT; BRETT, 1996; SKOOG et al., 2006; WANG, 2006).

No voltamograma de DP é possível determinar o mecanismo da reação de transferência de carga a partir da largura a meia altura  $W_{1/2}$  em que para pequenas amplitudes de pulso,  $W_{1/2}$  é inversamente proporcional ao número de

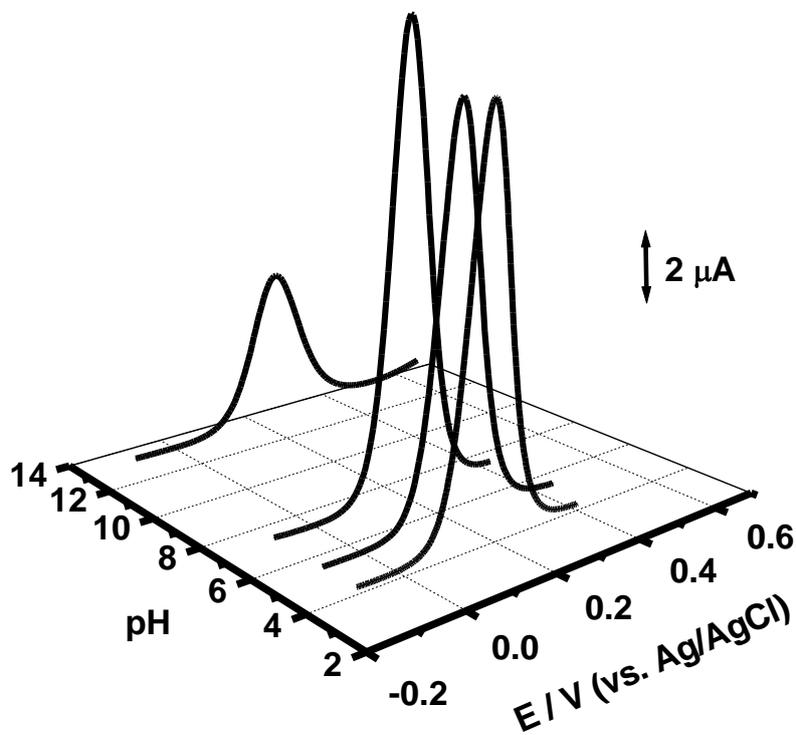
elétrons transferidos ( $W_{1/2} = 3,52RT/nF$  ou  $W_{1/2} = 90/n$ ) (OLIVEIRA-BRETT; BRETT, 1996; SKOOG et al., 2006).

**Exemplo:**

A influência do pH na oxidação do ferrocianeto usando DPV em soluções de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$   $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , preparadas em diferentes eletrólitos suporte,  $4 < \text{pH} < 13$ , **Fig. 12**.

**Figura 12.** Voltamogramas de DP do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$   $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função do pH.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR



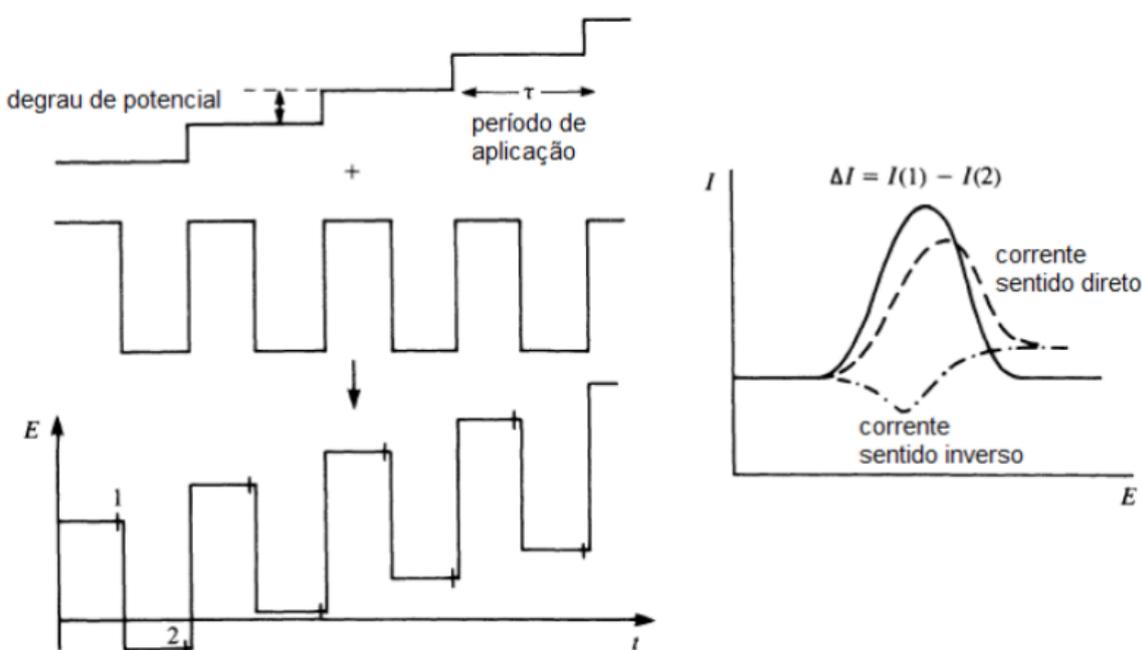
É claramente demonstrado que o pico anódico do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  é independente do pH e considerando o valor da sua largura a meia-altura ( $W_{1/2}$ )  $\sim 100 \text{ mV}$  e  $W_{1/2} = 3,52RT/nF$ , que o processo anódico ocorre com a transferência de apenas de um elétron e sem a participação de prótons (OLIVEIRA BRETT; BRETT, 1996).

### 1.5.3. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma técnica de pulso que apresenta grande velocidade e elevada sensibilidade. Uma onda quadrada simétrica é aplicada ao eletrodo de trabalho, onde a corrente é medida duas vezes durante cada ciclo de onda quadrada (no final do pulso direto e no final do pulso inverso), **Fig. 13**.

**Figura 13.** Representação esquemática da voltametria de onda quadrada.

Fonte: PACHECO et al., 2013.



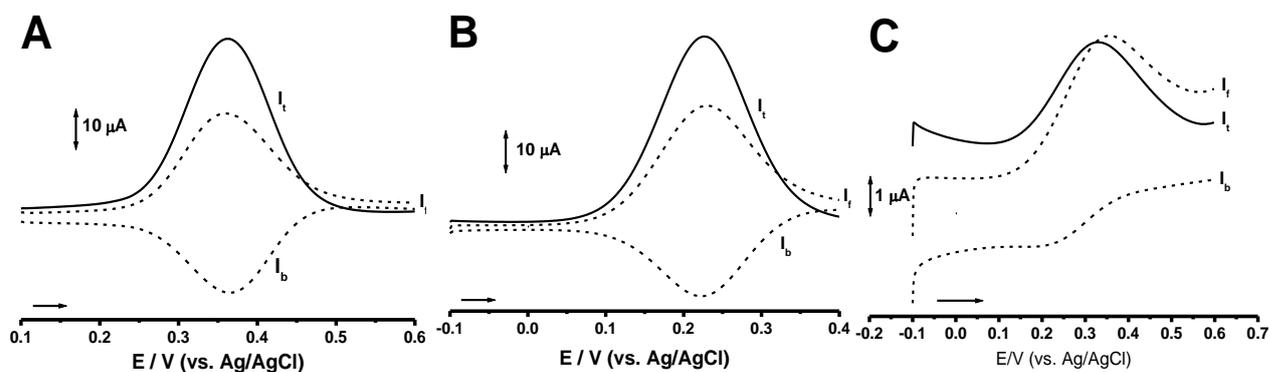
O voltamograma de SW baseia-se da diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado. O pico de corrente resultante da SWV é caracterizado por um potencial de  $E_{1/2}$  e largura  $W_{1/2}$ , onde a corrente é proporcional a concentração. Esta técnica tem como maior vantagem a velocidade de obtenção dos resultados, pois frequências de 1 a 100 ciclos de onda quadrada por segundo permitem o uso de velocidades de varredura de potenciais bem rápidas quando comparada a DPV em que a velocidade de varredura varia de 1 a 10  $\text{mV s}^{-1}$ . Isso faz com que na SWV diminua o tempo de análise sem haver perda da resolução dos picos (PACHECO et al., 2013).

**Exemplo:**

Ensaio utilizando a técnica de SWV para uma solução de ferrocianeto de potássio em diferentes eletrólitos suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 1,3$ ; tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$  e  $\text{KCl/NaOH}$ ,  $\text{pH} = 13,0$ , **Fig. 14**. A principal vantagem da SWV é a possibilidade de ver numa única varredura, se a reação de transferência de elétrons é reversível ou não (OLIVEIRA BRETT; BRETT, 1996). A reversibilidade do pico anódico do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  é demonstrada no voltamograma SW registrado para  $\text{pH} = 1,3$ , **Fig. 14A**, através da representação das curvas das componentes da corrente direta e reversa obtidas a partir da corrente total de varredura. O mesmo é possível observar em relação ao voltamograma registrado em  $\text{pH} = 7$ , **Fig. 14B**. Enquanto em meio básico foi observado uma ligeira perda de reversibilidade, **Fig. 14C**.

**Figura 14.** Voltamogramas de SW do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em função do pH (A)  $\text{pH} = 1,3$  (B)  $\text{pH} = 7,0$  (C)  $\text{pH} = 13,0$ , ( $I_t$ ) corrente total, ( $I_f$ ) corrente direta e ( $I_b$ ) corrente reversa,  $V_{\text{effective}} = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Fonte: PRÓPRIO AUTOR



#### 1.5.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica bastante utilizada para diferentes aplicações, investigação de mecanismos redox, análise de corrosão, propriedades de adsorção de moléculas em interfaces e funcionamento de baterias. Além disso, recentemente a EIS vem sendo utilizada em diferentes estudos bioquímicos (RANDVIIR; BANKS, 2013).

A impedância é definida como uma relação complexa entre a tensão e a corrente em um circuito de corrente alternada, onde **(Equação 6)**:

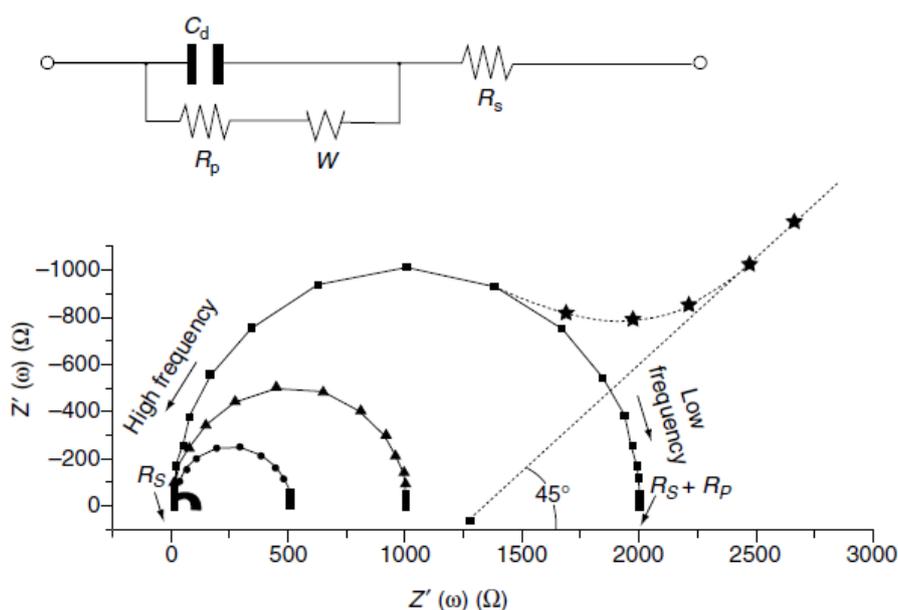
$$Z(j\omega) = \frac{V(j\omega)}{I(j\omega)} \quad \text{(Equação 6)}$$

$Z$  é a impedância,  $V$  é o potencial,  $I$  é a corrente,  $j$  é um componente imaginário e  $\omega$  é a frequência (RANDVIIR; BANKS, 2013).

Os dados de impedância podem ser coletados de diferentes maneiras, como exemplo os espectros de impedância da **Fig. 15**, conhecido como gráfico de Nyquist, onde os componentes da impedância real e imaginária são plotados um contra o outro e contém informações geralmente abrangentes sobre a interface eletrificada e a reação de transferência de carga. Onde  $C_d$  é a capacitância da dupla camada,  $R_s$  é a resistência ôhmica da solução eletrolítica,  $R_p$  é a resistência da transferência de elétrons e  $W$  é a impedância de Warburg resultante da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo.

**Figura 15.** Espectro de impedância faradaica apresentados na forma de gráficos de Nyquist juntamente com o circuito equivalente eletrônico da interface eletrificada.

**Fonte:** WANG, 2006.



Geralmente em processos redox controlados predominantemente via difusão o gráfico de Nyquist, **Fig. 15**, tem como característica uma região de semicírculo no eixo, seguida por uma linha reta. A parte do semicírculo corresponde ao processo limitado pela transferência de elétrons observado em frequências mais altas enquanto a linha reta, em uma faixa de baixa frequência, representa o transporte de massa difusional da espécie química investigada, do seio da solução até a superfície do substrato eletroquímico. Os processos de transferência de elétrons muito lentos são caracterizados por uma grande região semicircular (WANG, 2006; RANDVIIR; BANKS, 2013).

O modelo de circuito equivalente eletrônico de Randles e Erschler é essencialmente útil na modelagem dos fenômenos interfaciais, **Fig. 15**, e inclui a capacitância da dupla camada  $C_d$ , a resistência ôhmica da solução eletrolítica  $R_s$ , a resistência da transferência de elétrons  $R_p$  e a impedância de Warburg  $W$ , resultante da difusão de íons da solução para a superfície do eletrodo.

## 1.6. Estudo eletroquímico dos aminoácidos

Foi visto na literatura pela primeira vez em 1960 um estudo eletroquímico dos aminoácidos utilizando voltametria. Foi estudado o processo de oxidação da cisteína (Cys) em cistina (CySS) utilizando diferentes substratos eletroquímicos como ouro e platina (PRADAC; KORYTA, 1968). Mas, foi em 1980 que foi apresentado a oxidação direta de proteínas em eletrodos sólidos, a partir dos resíduos de aminoácidos (REYNAUD et al., 1980; BRABEC et al., 1980; BRABEC et al., 1981).

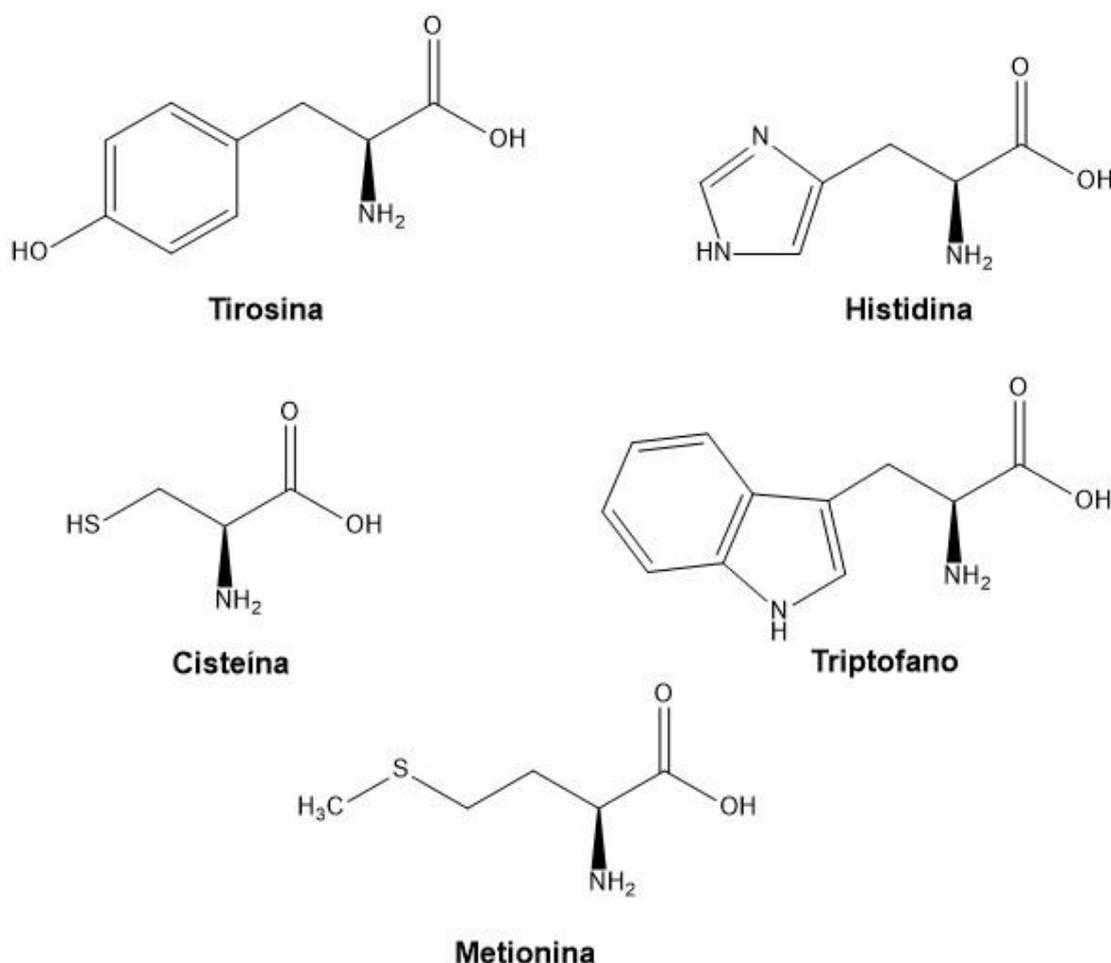
Os aminoácidos que são eletroativos em eletrodos de carbono são: a tirosina (OLIVEIRA et al., 2013; REYNAUD et al., 1980; SANTARINO et al., 2014), a histidina (ZHOU et al., 2017), a cisteína (CAO et al., 2018), o triptofano (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA, SANTARINO, OLIVEIRA BRETT, 2013) e a metionina (ARDAKANI et al., 2007; REYNAUD et al., 1980; ZHOU et al., 2007), **Fig. 16**.

A tirosina e o triptofano apresentam em suas estruturas os grupos fenol e indol, respectivamente, que podem sofrer oxidação eletroquimicamente. O triptofano, por exemplo, sofre oxidação em uma única etapa com a transferência

de dois elétrons e dois prótons (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; REYNAUD et al., 1980).

No caso dos aminoácidos, histidina, cisteína e metionina sofre oxidação eletroquimicamente devido suas cadeias laterais em que os centros eletroativos são: imidazol, tiol e o átomo de enxofre que pode ser oxidado, respectivamente (ARDAKANI et al., 2007; REYNAUD et al., 1980; ZHOU et al., 2007).

**Figura 16.** Estrutura química dos aminoácidos eletroativos.



### 1.7. Estudo eletroquímico da 3-nitro-tirosina

De acordo com a similaridade nas reações eletroquímicas e biológicas, pode-se presumir que os mecanismos redox que ocorrem no eletrodo e no organismo humano, respectivamente, compartilham princípios similares. Moléculas biologicamente importantes podem ser investigadas eletroanaliticamente por voltametria para estabelecer as propriedades redox

dessas espécies e potencialidades eletroanalíticas para suas detecções e quantificações (ACAR et al., 2016).

Um método eletroanalítico para quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em amostras biológicas, plasma e líquido cefalorraquidiano, utilizando SWV por redissolução adsortiva e eletrodo gotejante de mercúrio (HMDE), foi proposto. Os resultados demonstraram um processo catódico controlado predominante por adsorção e em relação a quantificação da espécie um baixo LOD de 0,25 nmol L<sup>-1</sup> e LOQ de 1,5 nmol L<sup>-1</sup> (ACAR et al., 2016).

Outro estudo envolvendo eletroquímica foi a detecção da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e sua interação com oligonucleotídeos de DNA, utilizado DPV e eletrodo de grafite, o qual o objetivo principal deste trabalho foi a aplicação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr como biomarcador para detecção da hibridização do DNA (TOPKAYA et al., 2018).

Outros estudos eletroquímicos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foram realizados sob GCE, em condições experimentais específicas, em tampão acetato e fosfato, por CV e DPV, para investigar o seu comportamento redox e para aplicar um sensor eletroquímico de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (GCE/MWCNT), para sua quantificação. Os resultados demonstraram um pico catódico associado a eletro-redução do grupo nitro da molécula, bem como um único pico anódico, ambos dependentes do pH do meio. Além disso, o processo catódico apresentou uma boa resposta de corrente vs. a concentração da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no eletrodo de GCE/MWCNT, numa faixa linear de resposta de 10 a 100 µmol L<sup>-1</sup> com um coeficiente de correlação de 0,989. O LOD foi de 0,42 µmol L<sup>-1</sup> e o LOQ foi de 1,38 µmol L<sup>-1</sup> (SILVA, 2017).

## 1.8. Eletroforese

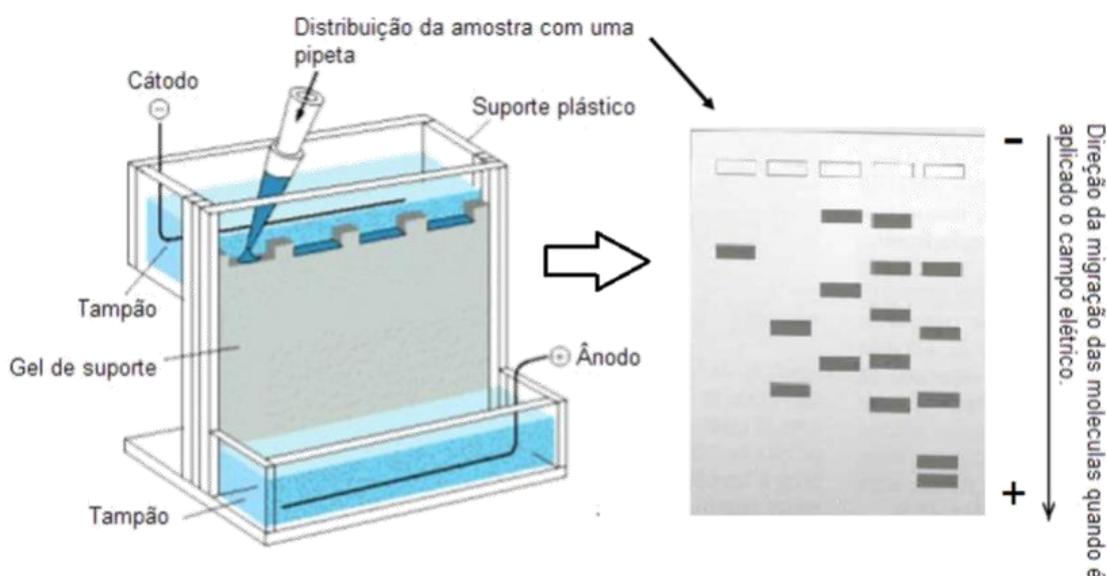
Eletroforese é uma técnica hoje de grande relevância em diferentes áreas do conhecimento como a bioquímica, biologia molecular e química analítica, uma vez que estuda por exemplo as interações do DNA com diferentes espécies químicas com alta simplicidade, rapidez e sensibilidade (HAMES, 1998). Além disso, o uso da eletroforese permite hoje a caracterização e identificação de fungos, vírus, bactérias, estudo de interação patógeno-hospedeiro, além das inúmeras áreas da genética médica e forense (TANKSLEY; ORTON, 1983;

ACQUAAD, 1992; FERREIRA; GRATTAPAGLIA,1998; ALFENAS et al., 1999; BRAMMER, 2001).

A técnica de eletroforese é relativamente simples e o princípio base é a migração de moléculas ionizadas em relação as suas cargas (positivas e negativas) e pesos num campo elétrico, onde moléculas carregadas negativamente se direcionam para o eletrodo carregado positivamente (ânodo) e as moléculas carregadas positivamente para o eletrodo carregado negativamente (cátodo), **Fig. 17**. Por exemplo, as proteínas uma vez que são capazes de adquirirem carga positiva ou negativa em função do pH. Assim, durante a análise é de extrema relevância manter o pH do meio tamponado (BRAMMER, 2001). O sistema tampão utilizado é geralmente dividido em duas partes: o tampão do gel usado na preparação do gel e o tampão da cuba eletrolítica, cuja se encontram os eletrodos, **Fig. 17**.

**Figura 17.** Representação esquemática da eletroforese.

**Fonte:** BRAMMER, 2001.



A técnica eletroforese pode ser conduzida em solução por gradiente de densidade ou em diferentes meios suporte, como, membranas de acetato de celulose, sílica gel, papel de filtro, amido ou poliacrilamida, gel de agarose, entre outros, que são obrigatoriamente quimicamente e fisicamente inertes não interferindo na mobilidade da espécie investigada no meio (BRAMMER, 2001).

Normalmente, a agarose é usada principalmente para separar macromoléculas maiores, como, por exemplo, os ácidos nucleicos, enquanto um gel de poliacrilamida é amplamente empregado para separar proteínas (HAMES, 1998). Outro ponto importante é a grau de porosidade nos géis, uma vez que determina a resolução das bandas (BRAMMER, 2001).

A técnica de eletroforese em gel funciona a voltagem (V), corrente (I) e potência (W) constantes, fornecidas por uma fonte apropriada de energia. A eletroforese também pode ser realizada unidirecional, a corrente em um único sentido ou bidirecional em que pulsos elétricos são emitidos em mais de um sentido. A porosidade do gel pode ser contínuo ou descontínuo e a posição vertical ou horizontal. (HAMES, 1981; ALFENAS et al., 1999; BRAMMER, 2001).

Em uma eletroforese em gel há vários sistemas de revelação das bandas, que é o caso de moléculas de DNA ou de RNA. A detecção das bandas é feita através da fluorescência, emitida pelo corante, por exemplo o brometo de etídio, na presença da luz ultravioleta. Outras formas para detectar as bandas é através de radioatividade, quimiluminescência e de nitrato de prata (BRAMMER, 2001).

---

# **CAPÍTULO 2**

## ***OBJETIVOS***

## 2.1. Objetivo geral

- Estudo eletroquímico e eletroanalítico do biomarcador de estresse oxidativo 3-nitro-tirosina em diferentes substratos eletroquímicos e de sua interação com o dsDNA.

## 2.2. Objetivos específicos

- Investigar a oxidação da 3-nitro-tirosina em meio aquoso, em eletrodo de carbono vítreo, utilizando técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica.
- Investigar a oxidação da 3-nitro-tirosina em meio aquoso, em eletrodo de platina, utilizando técnicas voltamétricas.
- Investigar a oxidação da 3-nitro-tirosina em meio aquoso, em eletrodo de ouro, utilizando técnicas voltamétricas.
- Investigar potencialidades das propriedades redox da 3-nitro-tirosina para aplicações eletroanalíticas.
- Investigar a interação 3-nitro-tirosina-dsDNA utilizando voltametria de pulso diferencial e eletroforese em gel.

---

# **CAPÍTULO 3**

## ***EXPERIMENTAL***

### 3.1. Reagentes, materiais e metodologia

A Tyr, 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e o dsDNA, proveniente do timo de vitela (calf thymus) tipo II (“altamente polimerizado” 62% de Na/13% de água e comprimento de 10,000 – 15,000 bp), foram obtidos da Sigma-Aldrich, onde foram usados sem qualquer tipo de purificação adicional. Soluções estoque da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> foram preparadas diretamente em tampão acetato, pH = 4,5 e tampão fosfato, pH = 7,0 e foram guardadas ao abrigo da luz e só foram retiradas para as medidas eletroquímicas. A solução estoque da Tyr 500 μmol L<sup>-1</sup> foi preparada diretamente em tampão fosfato, pH = 7,0 e por não ser facilmente solúvel na solução tampão foi deixado no ultrassom durante 15 minutos. As determinadas concentrações usadas nas medidas voltamétricas foram obtidas por diluição das soluções estoque no eletrólito suporte pretendido, diretamente na célula eletroquímica.

Soluções estoque de dsDNA foram preparadas em água deionizada e a concentração estabelecida por espectrofotometria UV: 1 uA (260 nm) = 50 μg mL<sup>-1</sup> de dsDNA.

As soluções eletrolíticas foram preparadas utilizando eletrólitos suporte com diferentes valores de pH (**Tabela 2**), onde foi usado reagentes de grau analítico e água purificada de um sistema Millipore Milli-Q (condutividade ≤ 0,1 μS cm<sup>-1</sup>) de força iônica I = 0,1 mol L<sup>-1</sup> de acordo com a literatura (BEYNON; EASTERBY, 1996). Para a aferição do pH foi utilizado um medidor de pH Metrohm Herisau (Suíça).

**Tabela 2.** Composição das soluções de eletrólito suporte.

Eletrólitos suporte (diluições para 100 mL)	pH
0,2 mol L <sup>-1</sup> KCl (25 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> HCl (6,5 mL)	2,0
0,2 mol L <sup>-1</sup> NaOAc (3,7 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> HAcO (46,3 mL)	3,4
1 mol L <sup>-1</sup> NaOAc (7,2 mL) + 1 mol L <sup>-1</sup> HAcO (12,5 mL)	4,5
0,2 mol L <sup>-1</sup> NaOAc (41,2 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> HAcO (8,8 mL)	5,4
0,2 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (6,15 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (43,85 mL)	6,1

0,2 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (30,5 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19,5 mL)	7,0
0,2 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (47,35 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,65 mL)	8,0
0,025 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O (50 mL) + 0,1 mol L <sup>-1</sup> NaOH (3,0mL)	9,2
0,2 mol L <sup>-1</sup> KCl (25 mL) + 0,2 mol L <sup>-1</sup> NaOH (6,0 mL)	12,0

Foram utilizadas pipetas eletrônicas (EP), EP-10 µmol L<sup>-1</sup> e EP-100 µmol L<sup>-1</sup> Plus Motorizada (Rainin Instrument Co. Inc., Woburn, EUA). As medições de pH foram realizadas utilizando um eletrodo de vidro combinado Scott Gerate em um pH-metro Metrohm Herisau (Suíça). Todos os experimentos foram feitos à temperatura ambiente.

### 3.2. Parâmetros voltamétricos e célula eletroquímica

Os testes foram realizados utilizando um potenciostato de modelo Autolab PGSTAT 302 N, **Fig. 18**, com os software GPES 4.9, Metrohm / Autolab Utrecht, Holanda e o software NOVA versão 2.0, EcoChemie Utrecht, Holanda. Os parâmetros usados para a DPV são: amplitude de pulso  $\Delta E = 50$  mV, largura de pulso  $\Delta t = 70$  ms e a velocidade de varredura  $v = 5$  mV s<sup>-1</sup>. Para a SWV as condições experimentais foram: amplitude de pulso  $\Delta E = 20$  mV, frequência de 20 Hz e incremento potencial de 5 mV, correspondendo a uma velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>. Para a CV foram os seguintes parâmetros: degrau de potencial  $\Delta E_s = 5$  mV e  $v = 100$  mV.

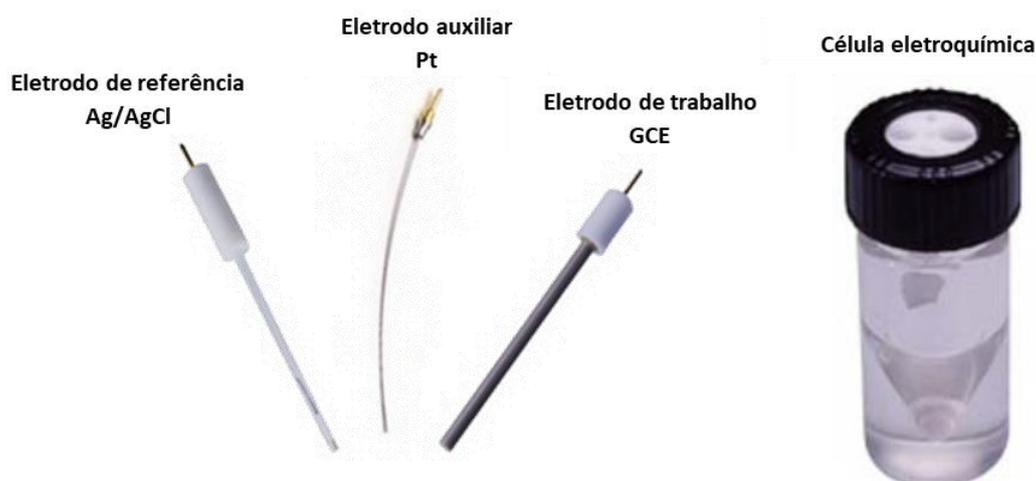
**Figura 18.** Imagem do potenciostato.



As medições foram feitas utilizando um sistema de três eletrodos contendo um eletrodo de trabalho (GCE) ( $d = 1,6 \text{ mm}$ ), ouro e platina, um contra-eletrodo de fio de Pt e um Ag/AgCl ( $3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ) como eletrodo de referência em uma célula eletroquímica de compartimento único de 5 mL, **Fig. 19**.

Os parâmetros utilizados durante os testes de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a aquisição e o tratamento de dados obtidos foram efetuados por intermédio do software FRA (“Frequency Response Analyser”) inserido no software NOVA versão 2.0. Para os espectros de impedância obtidos sempre foi aplicado um sinal perturbador de amplitude 5 mV num intervalo de frequência de 65000 Hz a 0,009 Hz com cinco valores de frequência por década.

**Figura 19.** Imagem da célula eletroquímica e dos eletrodos utilizados.



O GCE foi polido usando spray diamante (tamanho de  $1 \mu\text{m}$ , Kement, Kent, UK) antes de cada medida eletroquímica. Depois do polimento, o eletrodo foi enxaguado cuidadosamente com água deionizada. Após esse tratamento mecânico, o GCE foi mergulhado no eletrólito suporte e vários voltamogramas foram registrados até que um voltamograma de linha de base de estado estável fosse obtido. Este método garantiu resultados experimentais reprodutíveis.

O eletrodo de ouro e platina foi polido usando alumina (granulometria 0,3 micron) antes de cada medida eletroquímica. Após o polimento, tanto o eletrodo de ouro como o de platina foram enxaguados com cuidado com água deionizada

para remover o excesso de alumina. Feito isso, os eletrodos foram mergulhados no eletrólito suporte e varreduras foram realizadas até que um voltamograma de linha de base de estado estável fosse obtido assegurando resultados experimentais reproduzíveis.

### **3.3. Aquisição e apresentação de dados voltamétricos**

Em todos os resultados de DPV e SWV foram realizados a correção de linha de base pela aplicação de média móvel com uma janela de step de 5 mV incluída no software GPES versão 4.9. Este procedimento matemático melhora a visualização e identificação de picos sobre a linha de base, apesar que a corrente de pico seja em alguns casos reduzida (<10%) quando comparada a curva não tratada. Assim, este procedimento matemático dos voltamogramas originais de DP e SW foram utilizados na apresentação de todos os voltamogramas experimentais de DP e SW para uma melhor identificação dos picos. Os valores de corrente foram obtidos dos voltamogramas originais não tratados depois da subtração da linha de base.

### **3.4. Eletroforese em gel**

As medições de eletroforese horizontal foram efetuadas em gel de agarose com voltagem constante de 80 V durante o tempo de corrida de 2 h. Antes do preparo do gel, foi feito o tampão Tris base [tris(hidroximetil)aminometano] TAE 1x. Este TAE 1x foi preparado a partir da diluição em água deionizada do TAE 25x que foi preparado utilizando 121 g de Tris base, 28,5 mL de ácido acético glacial e 9,25 g de EDTA sal dissódico, diluídos para 1000 mL de solução com água deionizada. Em sequência, esta solução foi medida utilizando-se o pHmetro da Metrohm 827 pH lab.

Após a preparação do tampão, o gel foi preparado utilizando 0,7 g de agarose misturado em 200 mL do TAE 1x. Após a mistura, o sistema ficou sob aquecimento a 120 °C numa chapa aquecedora até que toda a agarose fosse dissolvida no tampão. Posteriormente, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e, quando estava morna, foi jogada cuidadosamente na tina, onde foi adicionado o pente com a quantidade de dentes desejada.

Depois do total resfriamento do sistema, a tina foi inserida na cuba de eletroforese Loccus LCH-20x25, contendo 1,5 L do TAE 1x. Após a submersão

total da tina no tampão, o pente foi retirado com cuidado e cada poço foram inseridos 10  $\mu$ L da amostra a ser analisada junto com 10  $\mu$ L da solução Loading da Sigma-Aldrich.

Para a revelação das amostras após o fim da corrida, a tina foi inserida em 400 mL de uma solução de brometo de etídio (EtBr) 1 mg/mL durante 15 h. Após esse tempo, as amostras foram reveladas no transiluminador da Loccus modelo LTB-20x20 HE.

---

# **CAPÍTULO 4**

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

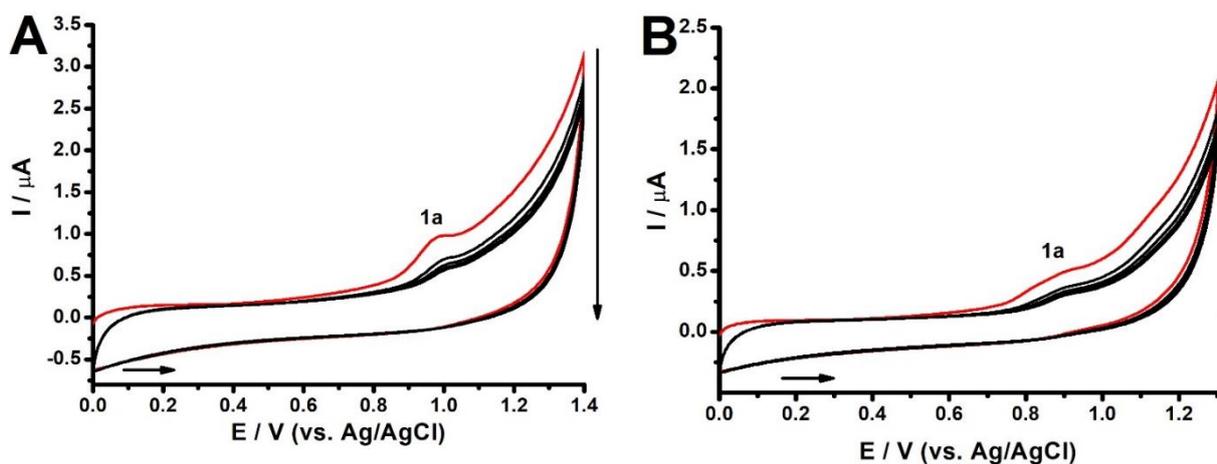
#### 4.1. Estudo eletroquímico e eletroanalítico da 3-nitro-tirosina utilizando eletrodo de carbono vítreo

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados da investigação do comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em baixas concentrações, em meio aquoso, no GCE, utilizando as técnicas eletroquímicas de CV, SWV, DPV e EIS. Um mecanismo para a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é proposto, bem como um método eletroanalítico para sua detecção e quantificação foi desenvolvido. Além disso, os resultados da eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no GCE são de extrema relevância para os estudos da interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com a molécula do dsDNA, Seção 4.3.

##### 4.1.1. Voltametria cíclica

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 20 μmol L<sup>-1</sup> no GCE foi investigada primeiramente por CV, numa velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup>, em diferentes meios, tampão acetato, pH = 4,4 e tampão fosfato, pH = 7,0, **Fig. 20**.

**Figura 20.** Voltamogramas cíclicos sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 20 μmol L<sup>-1</sup>: **(A)** tampão acetato, pH = 4,4 e **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Voltamogramas cíclicos sucessivos foram registrados, na janela de potencial de 0,0 V até 1,4 V, numa solução da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 20 μmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão acetato, pH = 4,4, **Fig. 20A**. No primeiro voltamograma registrado

apenas um único pico anódico irreversível foi identificado, pico 1a em  $E_{p_{1a}} = + 0,98$  V. Entretanto, já a partir da segunda varredura uma queda significativa da sua corrente foi observada, possivelmente devido aos produtos de eletro-oxidação que adsorvem na superfície do substrato.

Os voltamogramas cíclicos sucessivos registrados, na janela de potencial de 0,0 V até 1,3 V, numa solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fisiológico, pH = 7,0, **Fig. 20B**, detectaram apenas um único pico anódico irreversível, pico 1a em  $E_{p_{1a}} = + 0,88$  V, com queda significativa de corrente a partir da segunda varredura de potencial. Esses resultados foram bem similares aos voltamogramas registrados em meio ácido, **Fig. 20A**, entretanto em meio fisiológico o potencial do pico 1a foi deslocado para valores mais negativos, demonstrando que a retirada do elétron ocorre mais facilmente e com a participação de prótons.

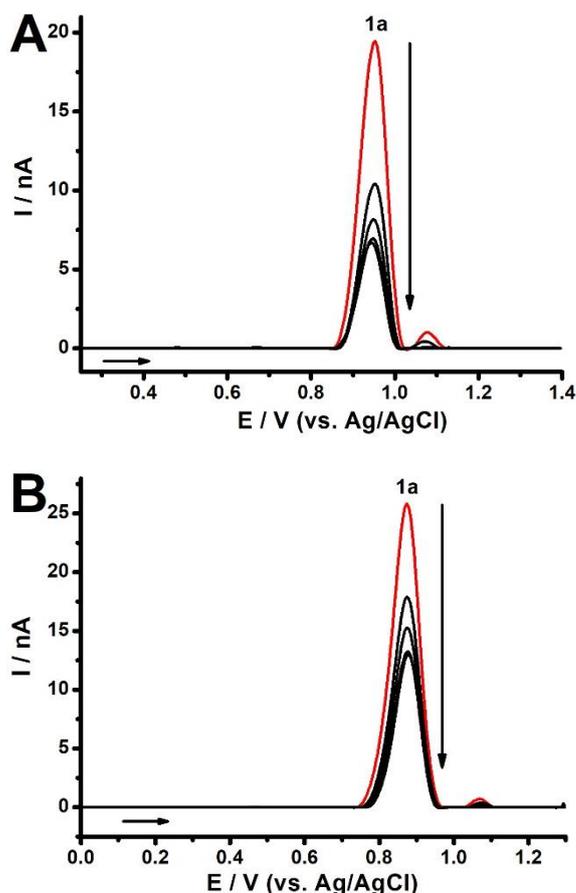
#### 4.1.2. Voltametria de pulso diferencial

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em meio aquoso, tampão acetato e fosfato, foi investigada utilizando GCE e DPV, **Fig. 21**. Em meio ácido, pH = 4,5, os voltamogramas de DP da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  registraram um único pico de oxidação, pico 1a, em  $E_{p_{1a}} = + 0,95$  V, bem definido e com baixa intensidade de corrente (nA), **Fig. 21A**. Os voltamogramas sucessivos também detectaram já a partir da segunda varredura de potencial uma queda significativa da corrente do pico 1a, o qual foi associada com produtos de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr que adsorvem na superfície do eletrodo aumentando sua resistividade (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011). O número de elétrons envolvidos neste processo de oxidação, foi estabelecido como um elétron, considerando que a largura a meia altura do pico anódico 1a é de  $W_{1/2} = 70$  mV (OLIVEIRA-BRETT; BRETT, 1996), *Seção 1.5.2*.

Os voltamogramas de DP da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato (pH = 7,0), **Fig. 21A**, registraram, como esperado, um único pico anódico, pico 1a, em  $E_{p_{1a}} = + 0,87$  V, com um valor de  $W_{1/2} = 81$  mV, demonstrando que este processo de oxidação ocorre em uma única etapa e com a retirada de apenas um elétron. Quando esses voltamogramas da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr são comparados com os registrados em meio ácido, **Fig. 21A**, o pico de oxidação ocorre com valor de

potencial mais negativo ( $\sim 8$  mV), indicando a participação de prótons e consequentemente de um equilíbrio ácido-base de Bronsted-Lowry associado.

**Figura 21.** Voltamogramas de DP sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ : **(A)** tampão acetato, pH = 4,5 e **(B)** tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura,  $\nu = 5$  mV s<sup>-1</sup>.

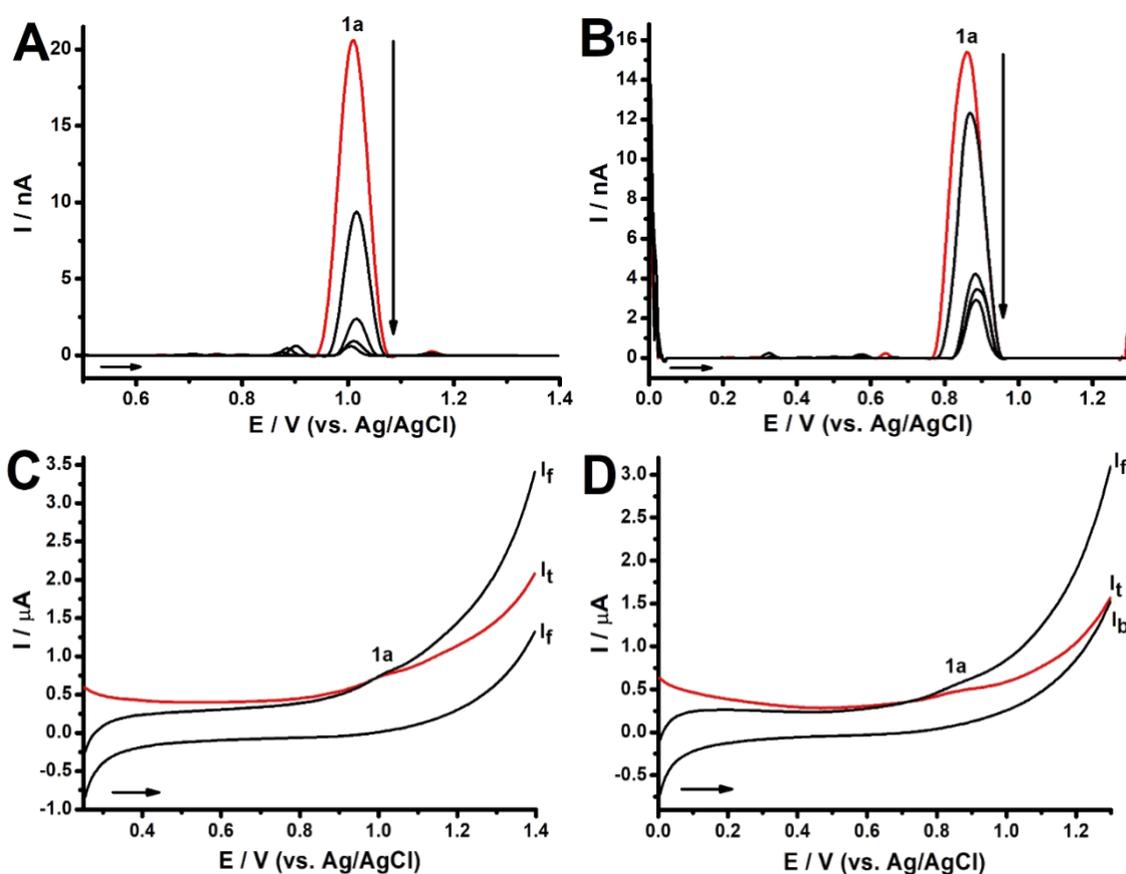


#### 4.1.3. Voltametria de onda quadrada

Por último, a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  no GCE foi investigada em meio aquoso, utilizando a SWV, **Fig. 22**. Em meio ácido os voltamogramas de SW sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr registraram apenas um único pico de oxidação, pico 1a em  $E_{p1a} = + 1,0$  V, e uma queda significativa da sua corrente a partir da segunda varredura de potencial, **Fig. 22A**. Em tampão fosfato, pH 7,0, os voltamogramas de SW sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foram registrados numa janela de potencial de 0,25 V até 1,3 V, **Fig. 22B**, e com base nos resultados foi

observado um único pico de oxidação, pico 1a em  $E_{p1a} = + 0,86 \text{ V}$ , **Fig. 22B e 22D**.

**Figura 22.** Voltamogramas de SW sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em (A e C) tampão acetato, pH = 4,5 e (B e D) tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura.  $I_t$  – corrente total,  $I_f$  – corrente direta e  $I_b$  – corrente reversa,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .



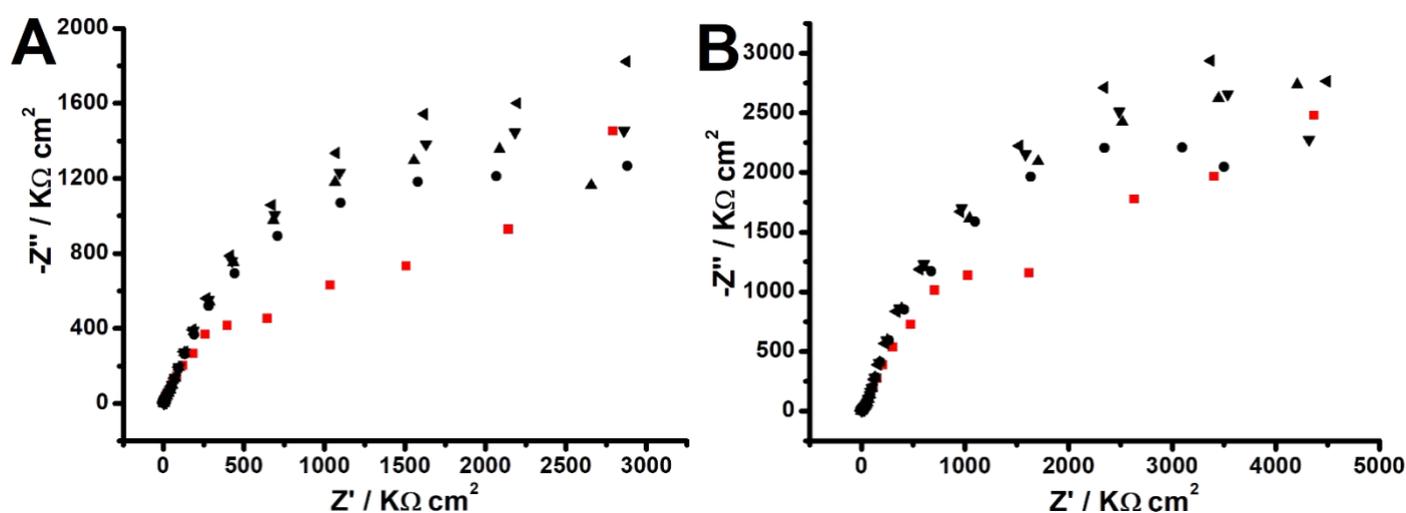
A irreversibilidade do processo de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, pico 1a, em meio ácido, bem como em meio fisiológico, foi confirmada através da representação gráfica das componentes direta ( $I_f$ ) e reversa ( $I_b$ ) obtidas a partir da corrente total ( $I_t$ ), **Fig. 22C e 22D**. Esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos por CV, **Fig. 20**.

#### 4.1.4. Espectroscopia de impedância eletroquímica

O mecanismo de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em GCE foi investigado por EIS em tampão acetato, pH = 4,5 e tampão fosfato, pH = 7,0. Espectros sucessivos

de EIS da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> foram registrados com um potencial aplicado de 1,0 V para ambos os pHs, **Fig. 23**. Os resultados demonstraram tanto no pH = 4,5 como no pH = 7,0, que o primeiro espectro obtido apresenta em altas frequências a formação de um semicírculo, associado com o processo de transferência de carga, e em baixas frequências a formação de uma linha reta, o qual foi relacionado ao transporte de massa difusional da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr do seio da solução para a superfície do GCE (OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 1993). Além disso, pode-se observar um aumento no semicírculo a partir dos espectros de impedância sucessivos, que indica a adsorção de produtos de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na superfície do eletrodo, aumentando a sua resistência e dificultando consequentemente a transferência de carga, uma vez que não ocorreu uma limpeza da superfície do GCE entre essas experiências. Esses resultados eletroquímicos de impedância para 3-NO<sub>2</sub>-Tyr são convergentes aos resultados voltamétricos obtidos, **Figs. 20-22**, deixando claro que o transporte de massa da espécie é controlado predominantemente via difusão e sua eletro-oxidação ocorre em valores de potenciais bem positivos com formação de produtos que adsorvem fortemente na superfície do GCE.

**Figura 23.** Espectros de EIS sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> aplicando um potencial de 1,0 V em: (A) tampão acetato pH = 4,5 e (B) tampão fosfato pH = 7,0, (■) primeira varredura.

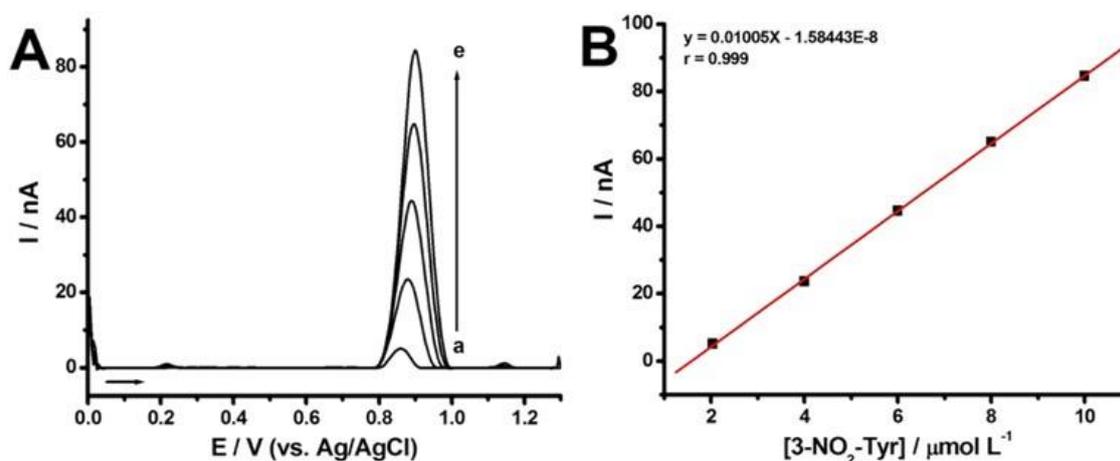


Assim, baseado nos resultados eletroquímicos de CV, DPV, SWV e EIS da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, **Figs. 20-23**, nos grupos funcionais doadores de elétrons presentes na estrutura da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e resultados prévios da literatura sobre eletro-oxidação de compostos fenólicos em GCE (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011), a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr ocorre, predominantemente via difusão, no grupo fenólico, com a retirada de um elétron e um próton, formando um radical intermediário altamente reativo que, em meio aquoso, gera produtos poliméricos que adsorvem fortemente na superfície do GCE, aumentando sua resistividade.

#### 4.1.5. Determinação eletroanalítica do biomarcador 3-nitro-tirosina

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi investigada por SWV com a finalidade de também desenvolver um método eletroanalítico para sua detecção e quantificação. Estudos foram realizados em várias condições experimentais para a obtenção de uma curva analítica linear para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e nas condições experimentais já otimizadas a curva analítica foi então levantada por SWV numa janela de potencial de 0,0 V até 1,3 V, com uma faixa de concentração de 2,04 μmol L<sup>-1</sup> a 10,00 μmol L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato, pH = 7,0 e sem o polimento da superfície do GCE entre as medidas, **Fig. 24A**.

**Figura 24. (A)** Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: (a) 2,04 μmol L<sup>-1</sup>, (b) 4,00 μmol L<sup>-1</sup>, (c) 6,00 μmol L<sup>-1</sup>, (d) 8,00 μmol L<sup>-1</sup> e (e) 10,00 μmol L<sup>-1</sup> **(B)** Curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.



A curva analítica obtida apresentou uma excelente linearidade considerando a equação da reta  $I_{pa} (\mu A) = 0,01005 [3\text{-NO}_2\text{-Tyr}] - 1,58443 \times 10^{-8}$  com coeficiente de correlação  $r = 0,999$ ,  $n = 5$ ,  $\sigma = 5,74522 \times 10^{-10}$ , **Fig. 24B**. Foi calculado o LOD com valor de  $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $3\sigma / S$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do sinal em branco e  $S$ , a sensibilidade), como também foi calculado o LOQ sendo  $0,57 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $10\sigma / S$ ).

## 4.2. Estudo eletroquímico e eletroanalítico da 3-nitro-tirosina utilizando eletrodo de platina e ouro

Nesta seção 4.2.1 e 4.2.2 serão apresentados e discutidos os resultados da investigação da eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em meio aquoso, no eletrodo de platina, bem como os resultados no eletrodo de ouro, utilizando as técnicas eletroquímicas de CV, SWV e DPV. Os resultados eletroquímicos e eletroanalíticos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no eletrodo de platina e de ouro foram comparados com a eletro-oxidação da tirosina (Tyr), bem como com os resultados no GCE, Seção 4.1, e assim seu mecanismo de oxidação foi proposto e potencialidades eletroanalíticas para detecção e quantificação deste biomarcador de estresse oxidativo foram demonstradas.

### 4.2.1. Eletrodo de platina

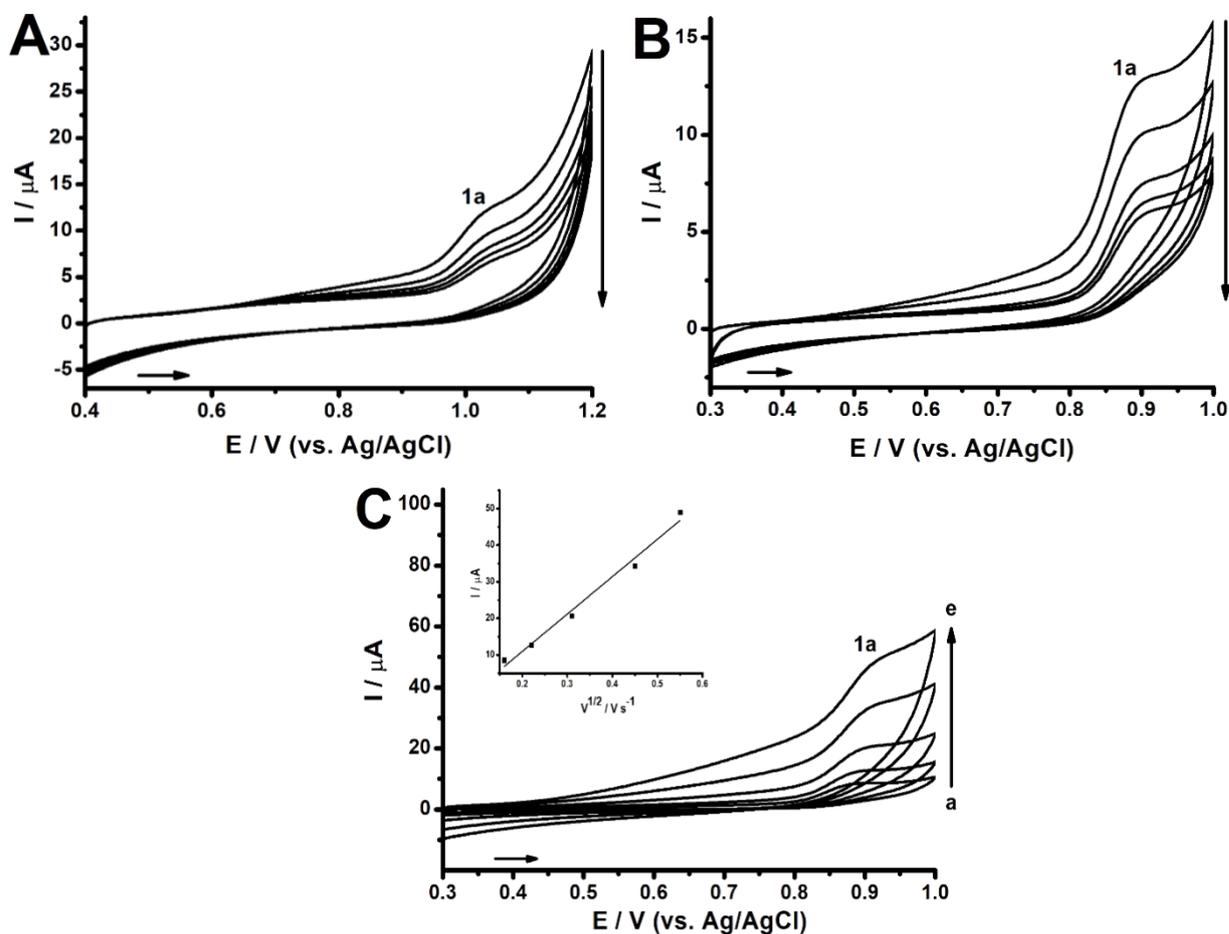
#### 4.2.1.1. Voltametria cíclica

O comportamento eletroquímico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi estudado sobre o eletrodo de platina usando CV em meio ácido, tampão acetato pH = 4,4 e em meio neutro, tampão fosfato pH = 7,0, **Fig. 25**. Em meio ácido, voltamogramas cíclicos sucessivos foram registrados numa solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ , na faixa de potencial de 0,4 V até 1,2 V, numa velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , **Fig. 25A**. Os resultados demonstraram um único pico anódico irreversível, pico 1a, em  $E_{p1a} = + 1,03 \text{ V}$ , com queda significativa de corrente a partir da segunda varredura de potencial.

Em meio neutro, voltamogramas cíclicos foram registrados, numa janela de potencial de 0,3 V até 1,0 V com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , numa solução de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ , **Fig. 25B**, onde foi observado um pico anódico 1a irreversível, em  $E_{p1a} = + 0,90 \text{ V}$ , com queda significativa de corrente

a partir da segunda varredura de potencial, como ocorre com o GCE, Seção 4.1.1, foi associada aos produtos de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr que adsorvem na superfície do eletrodo de platina, aumentando sua resistividade e dificultando a transferência de carga. Esses resultados de CV, Fig. 25, também demonstraram o deslocamento do pico 1a com o pH, indicando a participação de prótons.

**Figura 25.** CVs sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr: **(A)** 200 μmol L<sup>-1</sup>, tampão acetato, pH = 4,4, **(B)** 500 μmol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato, pH = 7,0 e **(C)** CVs da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0 em diferentes velocidades de varredura (25, 50, 100, 200 e 300 mV s<sup>-1</sup>).



Um estudo para a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0 foi realizado sobre o eletrodo de platina utilizando CV, onde os voltamogramas foram registrados em diferentes velocidades de varredura entre 25 mV s<sup>-1</sup> e 300 mV s<sup>-1</sup>, na direção anódica numa janela de potencial de 0,3 V a 1,0 V, no qual a

superfície do eletrodo era sempre limpa ao final de cada medida, **Fig. 25C**. Como esperado, todos os voltamogramas detectaram o pico anódico 1a em  $E_{p1a} \sim + 0,88$  V e demonstraram que sua corrente de pico cresce linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, **Fig. 25C**, indicando que o transporte de massa da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr até superfície do eletrodo é controlado predominantemente por difusão, considerando a equação de Randles-Sevcik, **Equação 4**, (QUEIROZ et al., 2017).

$$I_{p1a} \text{ (A)} = 2.99 \times 10^5 n (\alpha_c + n)^{1/2} A [O]_{\infty} D_0^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 7)}$$

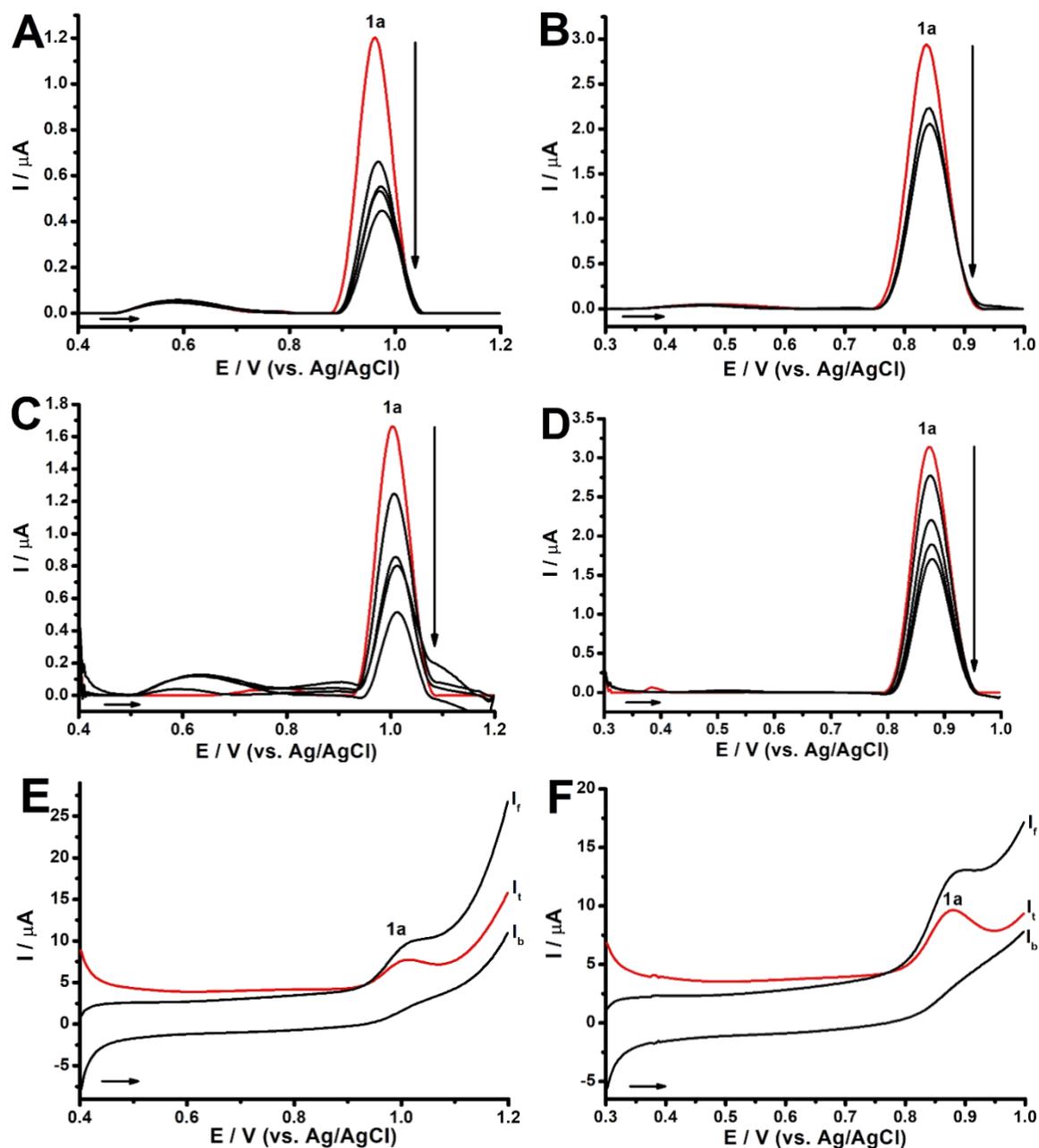
Onde  $n$  é o número de elétrons transferidos durante a oxidação,  $A$  é a área eletroativa do eletrodo em cm<sup>2</sup>,  $D_0$  é o coeficiente de difusão em cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>,  $[O]_{\infty}$  é a concentração da espécie investigada em mol cm<sup>-3</sup> e  $v$  é a velocidade de varredura em V s<sup>-1</sup>.

#### 4.2.1.2. Voltametria de pulso diferencial e onda quadrada

O comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> foi investigado sobre o eletrodo de platina usando DPV, em meio ácido e fisiológico, **Fig. 26**. Em tampão acetato, os resultados apresentaram um pico de oxidação, pico 1a, em  $E_{p1a} = + 0,96$  V, com um valor de  $W_{1/2} = 81$  mV, **Fig. 26A**. Em tampão fosfato, os resultados foram semelhantes, onde também foi detectado o pico anódico 1a, entretanto com valor de potencial mais negativo em  $E_{p1a} = + 0,84$  V e com um valor de  $W_{1/2} = 81$  mV, **Fig. 26B**. Esses resultados eletroquímicos indicam claramente que o processo anódico 1a ocorre no grupo fenólico com a transferência de um elétron e participação de próton, em concordância com os resultados de DPV no GCE, *Seção 4.1.2*.

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> também foi estudada sobre o eletrodo de platina utilizando SWV. Em meio ácido, a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr apresentou um pico anódico, 1a, em  $E_{p1a} = + 1,0$  V, **Fig. 26C**. E em meio neutro, os voltamogramas também detectaram apenas um único pico de oxidação, 1a, em  $E_{p1a} = + 0,87$  V, **Fig. 26D**, onde para ambos os meios teve uma queda de corrente a partir da segunda varredura de potencial, **Fig. 26D e 26E**.

**Figura 26.** Varreduras sucessivas (com correção de linha de base) de DP (A e B) e SW (C-D) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup>. (A, C e E) pH = 4,4 e (B, D e F) pH = 7,0. (—) primeira varredura.  $I_t$  - corrente total,  $I_f$  - corrente direta e  $I_b$  - corrente reversa.



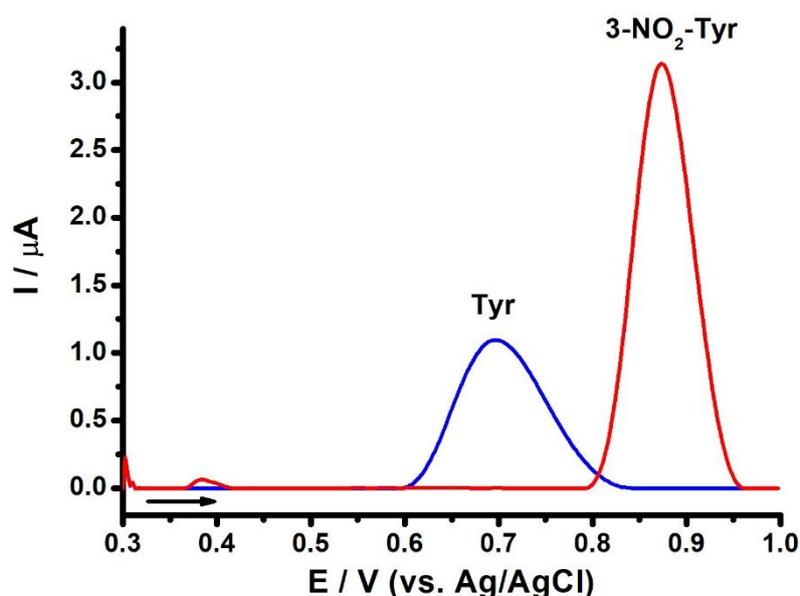
A irreversibilidade do processo de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em relação ao pico 1a identificado tanto no meio ácido, pH = 4,4 como no meio neutro, pH = 7,0, foi confirmada através da representação gráfica das componentes direta ( $I_f$ ) e inversa ( $I_b$ ) obtidas a partir da corrente total ( $I_t$ ), **Fig. 26E e 26F**. Pelos

resultados foi possível observar que a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr é dependente do pH, onde foi observado o deslocamento de potencial para valores mais positivos em meio ácido e valores mais negativos em meio neutro. Todos os resultados estão em concordância com os resultados obtidos por CV e DPV, Seção 4.1.1. e 4.1.2.

#### 4.2.1.3. Comparação da eletro-oxidação da 3-nitro-tirosina com a tirosina no eletrodo de platina

Voltamogramas de SW da Tyr e 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup>, em meio aquoso, pH 7,0, em eletrodo de platina foram registrados e comparados, **Fig. 27**.

**Figura 27.** Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) em tampão fosfato, pH = 7,0: (—) da Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> e (—) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup>.



Ambos os voltamogramas detectaram um único pico anódico, 1a, o qual foi relacionado com a oxidação do grupo fenólico em ambas as moléculas, entretanto o pico de oxidação da Tyr ocorreu em  $E_{\text{pa}} = + 0,70 \text{ V}$ , enquanto que o da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr ocorreu num valor de potencial 170 mV mais positivo, em  $E_{\text{p1a}} = + 0,87 \text{ V}$ , demonstrando que a presença do grupo nitro na estrutura da Tyr dificulta sua eletro-oxidação, como esperado uma vez que o grupo nitro é um grupo retirador de elétrons (RADOVIC et al., 1997), além disso demonstra a possibilidade de detecção e quantificação eletroquímica dessas espécies com

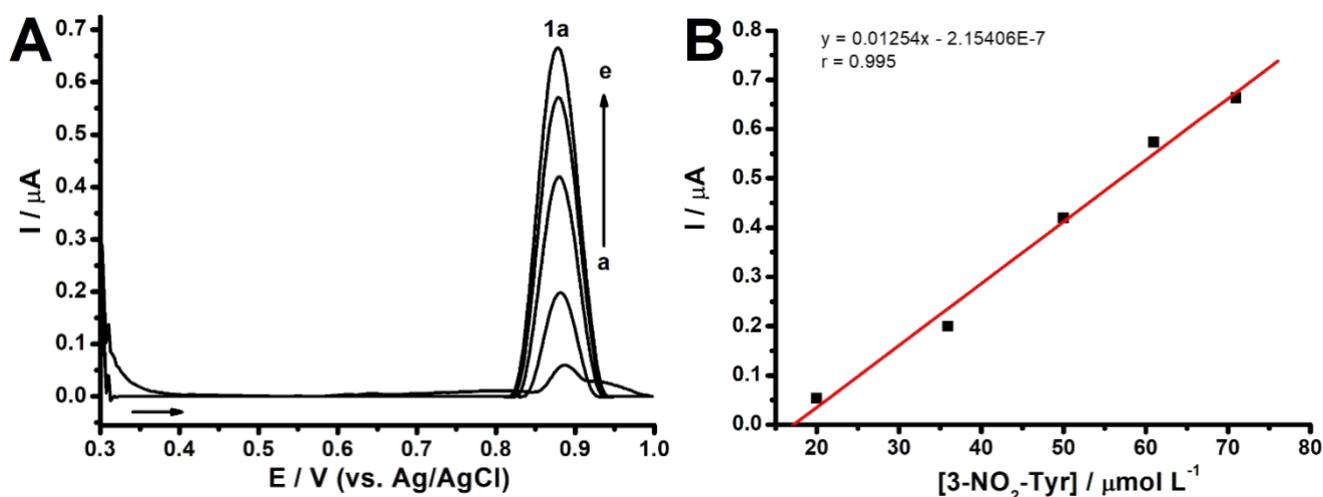
elevada seletividade. Esses resultados eletroquímicos no eletrodo de platina foram bem semelhantes com resultados prévios da literatura utilizando eletrodo de carbono impresso e eletrodo de grafite (TOPKAYA et al., 2018; SUPRUN et al., 2013), o qual também detectaram uma seletividade na detecção eletroquímica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na presença da Tyr.

#### 4.2.1.4. Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina no eletrodo de platina

Uma curva analítica objetivando a detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi levantada, nas condições experimentais já otimizadas, correlacionando a corrente de eletro-oxidação do pico anódico 1a vs. sua concentração (faixa de 20,00 a 71,43 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0) **Fig. 28A**.

A curva analítica obtida, **Fig. 28B**, demonstrou excelente coeficiente de correlação de 0,995 com uma equação da reta de  $I_{pa} (\mu A) = 0,01254 [3-NO_2-Tyr] - 2,15406 \times 10^{-7}$  ( $n = 5$  e  $\sigma = 2,84567 \times 10^{-8}$ ). O limite de detecção foi de 6,81 μmol L<sup>-1</sup> ( $3\sigma / S$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do sinal em branco e  $S$ , a sensibilidade) e o limite de quantificação de 22,69 μmol L<sup>-1</sup> ( $10\sigma / S$ ).

**Figura 28. (A)** Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: (a) 20,00 μmol L<sup>-1</sup>, (b) 36,36 μmol L<sup>-1</sup>, (c) 50,00 μmol L<sup>-1</sup>, (d) 61,54 μmol L<sup>-1</sup> e (e) 71,43 μmol L<sup>-1</sup> **(B)** Curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.

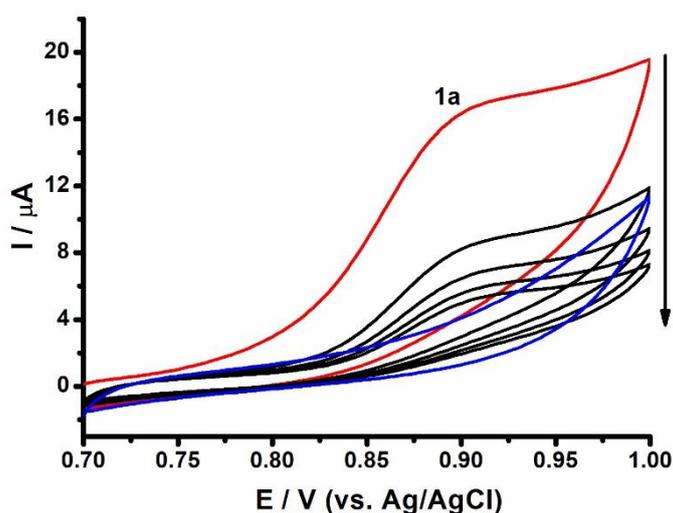


## 4.2.2. Eletrodo de ouro

### 4.2.2.1. Voltametria cíclica

O comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500 μmol L<sup>-1</sup> foi avaliado sobre o eletrodo de ouro em meio fisiológico, pH = 7,0. Varreduras sucessivas foram efetuadas numa janela de potencial de 0,7 V a 1,0 V, **Fig. 29**. Foi observado um único pico de oxidação, como esperado, pico 1a, em Ep<sub>1a</sub> = +0,89 V e já a partir da segunda varredura de potencial foi observado uma queda significativa da sua corrente, o qual demonstra adsorção dos produtos de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na superfície do eletrodo de ouro, resultados bem semelhantes aqueles obtidos no GCE e no eletrodo de platina, *Seção 4.1.1 e 4.2.1.1*.

**Figura 29.** CVs sucessivos da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 500 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0, (—) primeira varredura e (—) linha de base.



### 4.2.2.2. Voltametria de pulso diferencial e onda quadrada

O comportamento de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> foi investigado por DPV em meio aquoso. Em meio ácido, voltamogramas sucessivos foram registrados numa faixa de 0,9 V a 1,2 V, **Fig. 30A**, e detectaram um único pico anódico, pico 1a, em Ep<sub>1a</sub> = + 0,97 V. Em meio neutro, a faixa de potencial utilizada foi de 0,7 V a 1,0 V, **Fig. 30B**. Os resultados demonstraram apenas um pico anódico, pico 1a, em Ep<sub>1a</sub> = + 0,84 V. Esse processo de oxidação 1a corresponde a oxidação do grupo fenólico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no eletrodo de ouro e foi bem similar aqueles obtidos no GCE e no eletrodo de platina, **Tabela 3**,

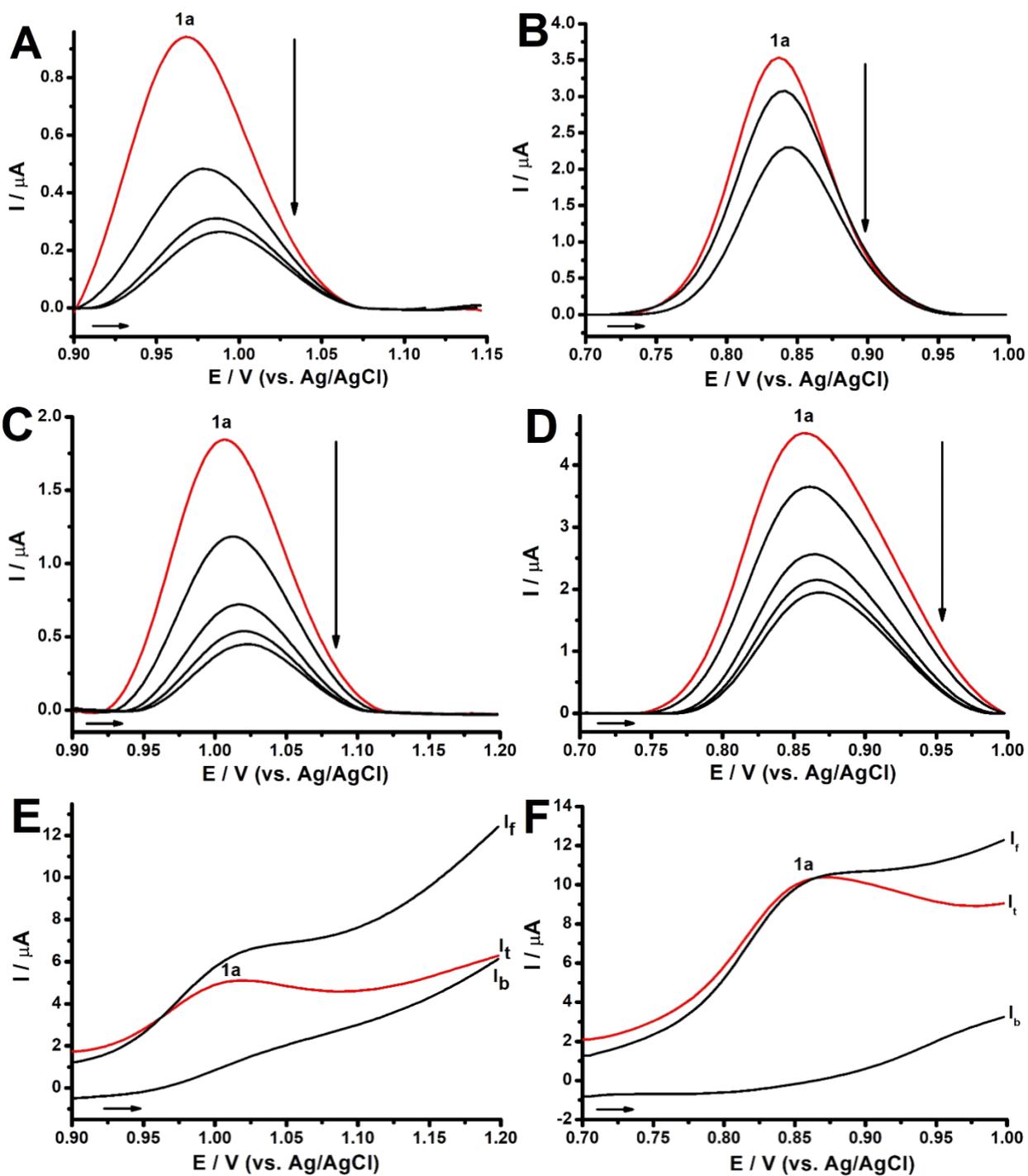
demonstrando claramente nenhum efeito electrocatalítico dessas superfícies metálicas, ouro e platina, quando comparadas ao GCE. Resultados semelhantes foram observados para a eletro-oxidação da Tyr, **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Substâncias e seus respectivos potenciais na DPV.

Substrato eletroquímico	3-NO <sub>2</sub> -Tyr		Tyr
	pH = 4,5	pH = 7,0	pH = 7,0
GCE	Ep <sub>1a</sub> = + 0,95 V	Ep <sub>1a</sub> = + 0,87 V	-
Eletrodo de platina	Ep <sub>1a</sub> = + 0,96 V	Ep <sub>1a</sub> = + 0,87 V	Ep <sub>1a</sub> = + 0,70 V
Eletrodo de ouro	Ep <sub>1a</sub> = + 0,97 V	Ep <sub>1a</sub> = + 0,84 V	Ep <sub>1a</sub> = + 0,67 V

A eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup> também foi estudada por SWV sobre o eletrodo de ouro em meio ácido, tampão acetato, pH = 4,4 e em meio neutro, tampão fosfato, pH = 7,0. No pH = 4,4, os resultados apresentados demonstraram um único pico anódico, pico 1a, em Ep<sub>1a</sub> = + 1,00 V, **Fig. 30C**. No meio neutro, também foi detectado apenas o pico anódico 1a, em Ep<sub>1a</sub> = + 0,86 V, **Fig. 30D**. O processo de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em relação ao pico 1a identificado tanto no meio ácido, pH = 4,4 como no meio neutro, pH = 7,0, foi confirmada sua irreversibilidade através da representação gráfica das componentes direta (*i<sub>f</sub>*) e inversa (*i<sub>b</sub>*) obtidas a partir da corrente total (*i<sub>t</sub>*), **Fig. 30E e 30F**. Os resultados mostraram que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr tem uma dependência com o pH em que é verificado um deslocamento de potencial para valores mais positivos em meio ácido e valores mais negativos em meio neutro. Todos os resultados estão em concordância com os resultados obtidos por CV e DPV, utilizando eletrodo de ouro.

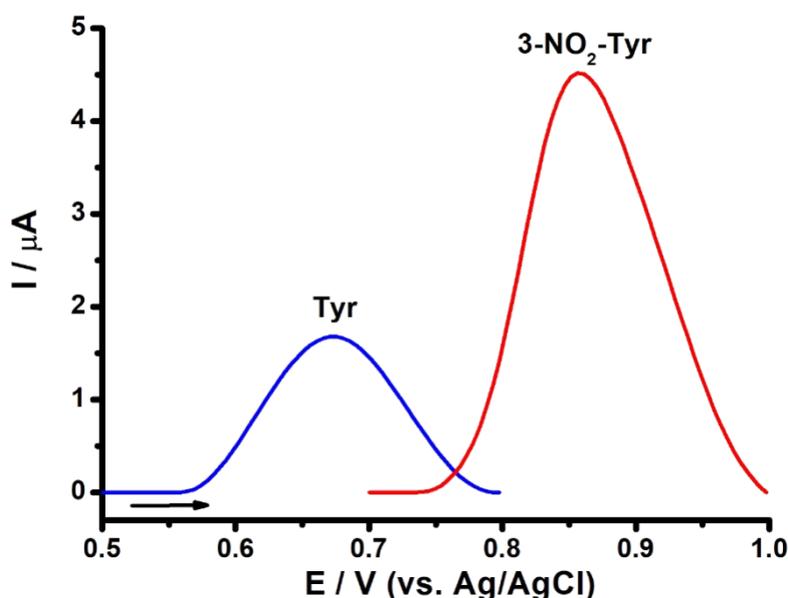
**Figura 30.** Varreduras sucessivas (com correção de linha de base) de DP (A e B) e SW (C-F) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 200 μmol L<sup>-1</sup>. (A, C e E) pH = 4,4 e (B, D e F) pH = 7,0. (—) primeira varredura. *i<sub>t</sub>* - corrente total, *i<sub>f</sub>* - corrente direta e *i<sub>b</sub>* - corrente reversa.



#### 4.2.2.3. Estudo de comparação da tirosina com a 3-nitro-tirosina no eletrodo de ouro

O comportamento anódico da Tyr foi investigado por SWV sobre o eletrodo de ouro numa solução de Tyr  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ , em comparado com a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr nas mesmas condições experimentais, **Fig. 31**. O resultado obtido demonstrou que a Tyr sofre oxidação em um potencial de + 0,67 V, enquanto a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr ocorre no potencial de + 0,86 V, demonstrando claramente que a presença do grupo nitro dificulta a oxidação da tirosina. Esses resultados são concordantes com obtido no eletrodo de platina, *Seção 4.2.1*.

**Figura 31.** SWVs (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ : (—) Tyr e (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.



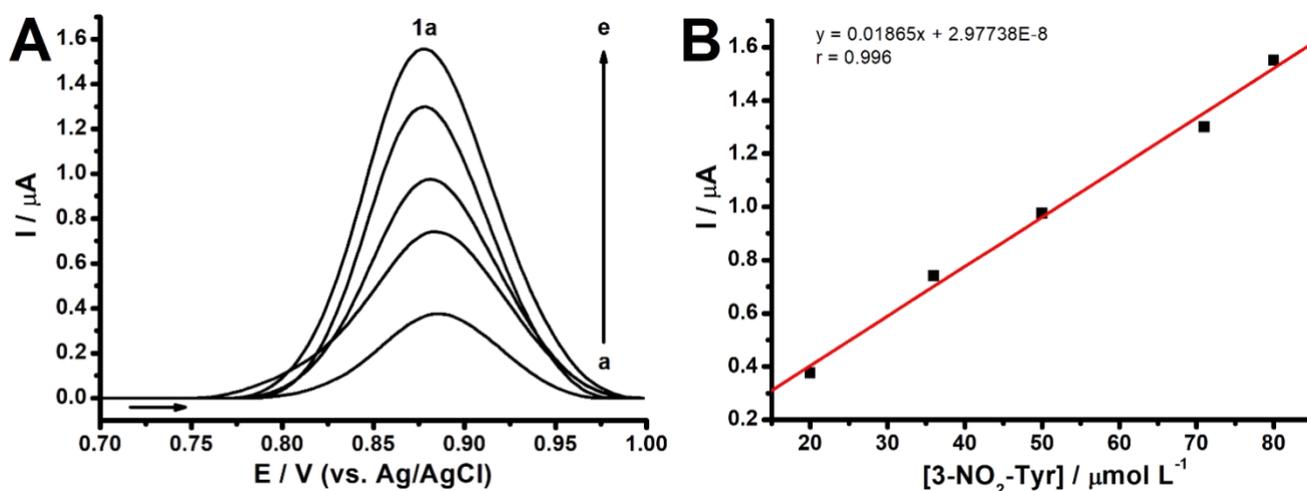
#### 4.2.2.4. Determinação eletroanalítica da 3-nitro-tirosina no eletrodo de ouro

Um método eletroanalítico para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr utilizando SWV foi proposto. Assim uma curva analítica para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi investigada correlacionando a corrente de eletro-oxidação do pico anódico 1a vs. sua concentração.

Nas condições experimentais já otimizadas uma curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em meio fisiológico ( $\text{pH} = 7,0$ ) numa faixa de concentração de 20,00 a 80,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , foi obtida, **Fig. 32A**, e demonstrou uma boa linearidade considerando

sua equação da reta  $I_{pa} (\mu A) = 0,01865 [3\text{-NO}_2\text{-Tyr}] - 2,97738 \times 10^{-8}$ , com coeficiente de correlação  $r = 0,996$ ,  $n = 5$ ,  $\sigma = 4,55476 \times 10^{-8}$ , **Fig. 32B**. Logo, foi calculado o LOD com valor de  $7,33 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $3\sigma / S$ , onde  $\sigma$  é o desvio padrão do sinal em branco e  $S$ , a sensibilidade), como também foi calculado o LOQ sendo  $24,42 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $10\sigma / S$ ).

**Figura 32.** (A) Voltamogramas de SW (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em tampão fosfato, pH = 7,0, para diferentes concentrações: (a) 20,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 36,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 50,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 71,43  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (e) 80,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (B) Curva analítica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.



O método eletroanalítico proposto para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em meio fisiológico foi comparado com os propostos aqui utilizando GCE e eletrodo de platina, Seção 4.1.5 e 4.2.1.4, respectivamente e com métodos eletroanalíticos já propostos na literatura, **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Comparação de métodos eletroanalíticos para a determinação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.

<b>Método eletroanalítico</b>	<b>LOD (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Faixa de concentração (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Referência</b>
<b>SWV-GCE – (pH 7,0)</b>	0,17	0,57	2,04 - 10	Este trabalho
<b>SWV- Eletrodo de platina– (pH 7,0)</b>	6,81	22,69	20 - 71	Este trabalho
<b>SWV-Eletrodo de ouro – (pH 7,0)</b>	7,33	24,42	20 - 80	Este trabalho
<b>GCE/AuNPs</b>	0,05	-	0,2 - 50	WANG et al., 2018
<b>DPV-GCE/MWCNT – (pH 7,4)</b>	0,42	1,38	10 - 100	SILVA, 2017
<b>DPV-GCE/MWCNT – (pH 7,4)</b>	1,83	6,10	10 - 60	SILVA, 2017
<b>GCE/dsDNA</b>	0,058	0,2	0,060 – 0,32	COSTA, 2016
<b>Eletrodo gotejante de mercúrio</b>	0,00025	-	0,0066 – 0,597	ACAR et al., 2016
<b>Nanopartículas bimetálicas Fe/Pd</b>	0,0053	-	0,0216 – 3,833	ROY et al., 2015

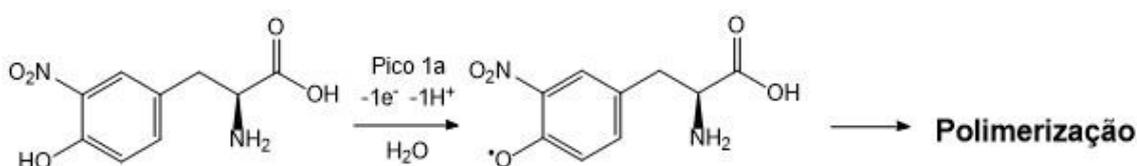
Os resultados presentes neste trabalho são bastante satisfatórios, pois foi visto que apresentam baixos limites de detecção e quantificação quando comparados a outros trabalhos da literatura, onde usaram eletrodos modificados para a obtenção de um resultado satisfatório. O método eletroanalítico utilizando SWV com o GCE em tampão fosfato, pH = 7,0, foi o que apresentou uma melhor

resposta quando comparado com outros substratos platina e ouro utilizando as mesmas condições experimentais.

### 4.3. Mecanismo de oxidação da 3-nitro-tirosina

A molécula de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr contém na sua estrutura um grupo fenólico, doador de elétrons (RADOVIC et al., 1997), bem como um grupo nitro, já conhecido na literatura como um grupo retirador de elétrons (RADOVIC et al., 1997). Assim, com bases nos resultados eletroquímicos para a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, em meio aquoso obtidos nos diferentes substratos eletroquímicos utilizados (carbono, platina e ouro), **Figs. 20-32**, e com a literatura (ABU-QARE; ABOU-DONIA, 2001; DU et al., 2004; RICHARDS et al., 2006; CONVENTZ et al., 2007; ABELLO et al., 2009; ACAR et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2017; TOPKAYA et al., 2018) uma tentativa de mecanismo para a oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi proposto, **Fig.33**. O pico 1a foi associado com a eletro-oxidação do grupo fenólico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, com a retirada de um elétron e um próton e formação do radical altamente reativo, 3-NO<sub>2</sub>-Tyr<sup>•</sup>. Além disso, considerando o aumento da resistividade dos substratos eletroquímicos a via de polimerização do radical foi predominante, em relação a sua reação com moléculas de água para formação de derivados de quinonas eletro-ativas.

**Figura 33.** Proposta de mecanismo de oxidação para 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.



### 4.4. Estudo da interação da 3-nitro-tirosina com o dsDNA

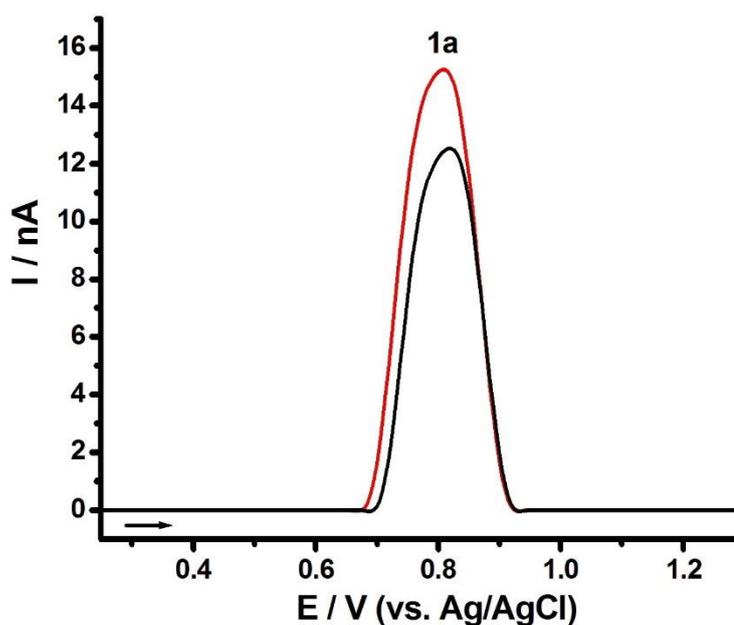
#### 4.4.1. Estudo da interação da 3-nitro-tirosina com o dsDNA utilizando eletrodo de carbono vítreo e voltametria de pulso diferencial

Para o estudo da interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com a molécula do dsDNA foi primeiramente investigado utilizando GCE e DPV a estabilidade dessas respectivas espécies em meio fisiológico (pH = 7,0), assim soluções de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (5 μmol L<sup>-1</sup>) e do dsDNA 165 μg mL<sup>-1</sup> foram preparadas em tampão fosfato,

incubadas por diferentes períodos de tempo (5 min, 2 h, 3 h e 24 h) e por fim de cada período o voltamograma de DP registrado.

Os voltamogramas de DP da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> todos detectaram um único pico anódico (1a), em  $E_{p1a} = + 0,81$  V, com correntes próximas de 16 nA, **Fig. 34**, associado com a oxidação do grupo fenólico da molécula, em concordância com os resultados da *Seção 4.1.2*. Além disso, os resultados demonstraram claramente que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr não sofre grandes variações estruturais em meio fisiológico nos intervalos de tempo (5 min e 3 h) investigados, provando sua estabilidade em meio fisiológico, pH = 7,0.

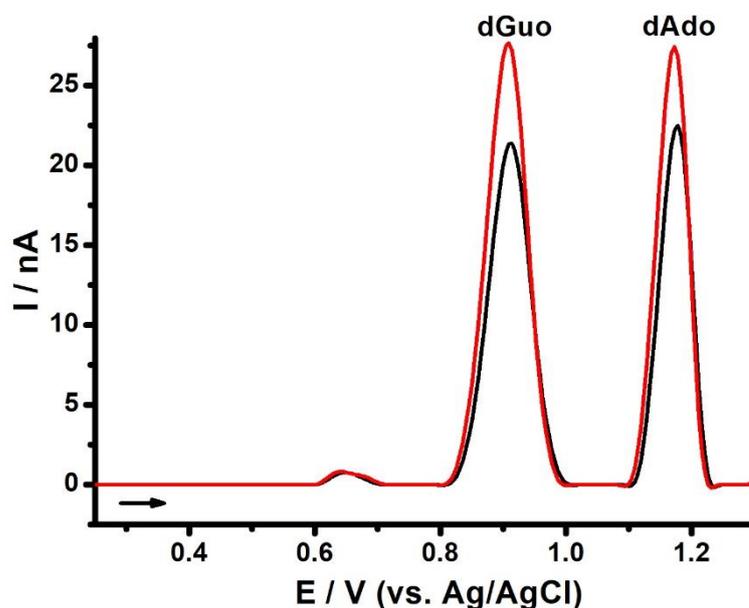
**Figura 34.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base) da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7,0 após (—) 5 min e (—) 3 h de incubação.



A eletro-oxidação do dsDNA 165 μg mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7, em GCE, foi investigada por DPV, para diferentes períodos de tempo (5 min e 2 h). Os voltamogramas de DP do dsDNA detectaram dois picos de oxidação bem separados, **Fig. 35**, o primeiro pico anódico corresponde à oxidação dos resíduos da desoxiguanosina (dGuo), em  $E_{dGuo} = + 0,91$  V e o segundo é associado com a oxidação da desoxiadenosina (dAdo) em  $E_{dAdo} = + 1,17$  V, em concordância com a literatura (OLIVEIRA; OLIVEIRA BRETT, 2010). Além disso verifica-se que não ocorreu mudanças significativas no perfil voltamétrico

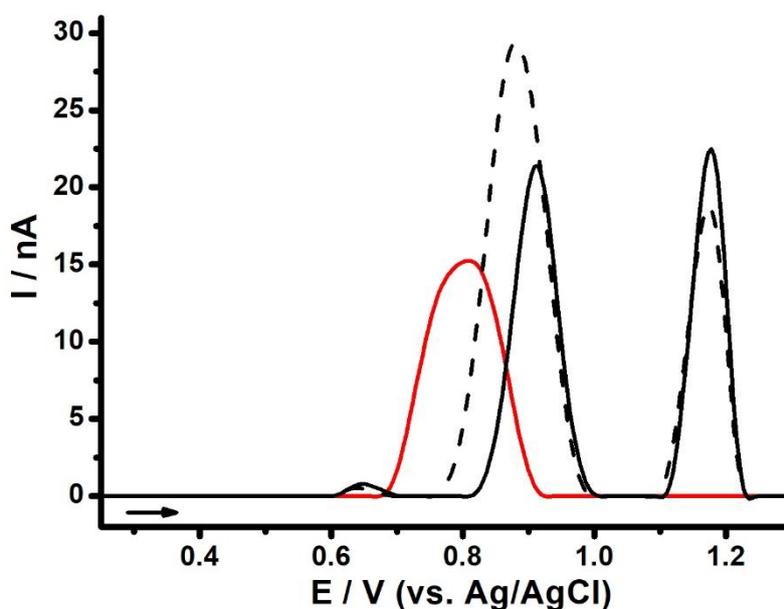
(potencial e corrente) desses voltamogramas, indicando, como esperado, a estabilidade da molécula do dsDNA em meio fisiológico (QUEIROZ, 2017).

**Figura 35.** Voltamogramas de DP do dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ , após, (—) 5 min e (—) 2 h de incubação.



Estabelecido o comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e do dsDNA no GCE, bem como a estabilidade dessas moléculas em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ , realizou-se finalmente o estudo da reação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com a molécula do dsDNA. A interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA foi investigada por DPV, utilizando GCE, a partir da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  com o dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ , por diferentes períodos de tempo (5 min, 1 h e 2 h) de incubação. Após as varreduras de DP iniciais, de 5 min., **Fig. 36**, a mistura de 3-NO<sub>2</sub>-Tyr/dsDNA foi mantida ao abrigo da luz até o registro dos demais voltamogramas de DP.

**Figura 36.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em  $\text{pH} = 7,0$ , após 5 min de incubação da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (—) dsDNA  $165 \mu\text{g mL}^{-1}$  e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA ( $5 \mu\text{mol L}^{-1}/165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

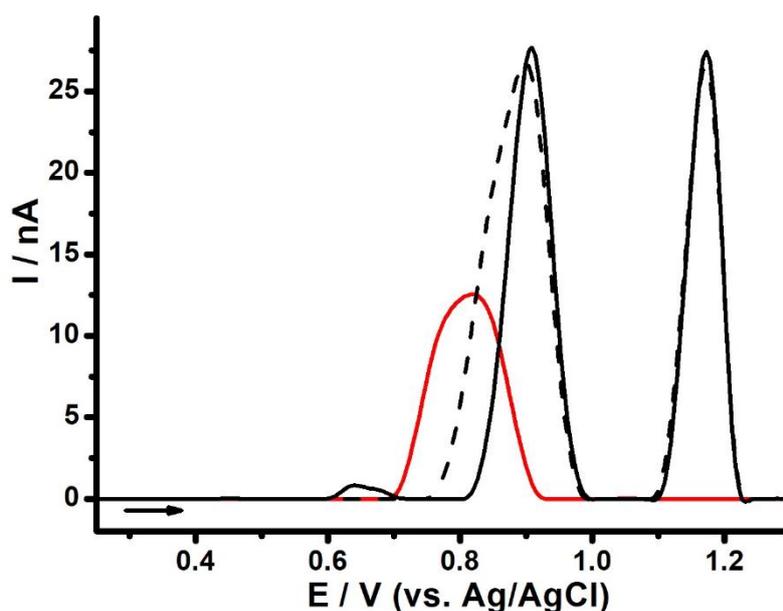


O voltamograma de DP da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>) após 5 min de incubação detectou apenas 2 picos anódicos, em valores de potenciais de 0,88 V e 1,17 V, **Fig. 37** (---), o qual quando são comparados com os voltamogramas controles da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, **Fig. 37** (—), e do dsDNA, **Fig. 37** (—), incubados nas mesmas condições experimentais, foram associados à eletro-oxidação, dos resíduos da dGuo e da dAdo da molécula do DNA, demonstrando claramente que a partir da interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA ocorre o completo desaparecimento do pico anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, devido ao impedimento da sua eletro-oxidação na superfície do substrato eletroquímico, o GCE. Além disso, verifica-se em relação ao pico da dGuo do DNA **Fig. 37** (---), quando comparado ao controle, **Fig. 37** (—), um alargamento da sua largura, bem como um aumento da sua corrente, demonstrando uma mudança conformacional da molécula do DNA na solução aquosa, pH =7,0.

O voltamograma de DP da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>) após 1 h de incubação detectou, um resultado bem similar aquele observado após 5 min de reação, apenas 2 processos anódicos, em valores de potenciais de 0,90 V e 1,17 V e que foram relacionados aos picos anódicos do dsDNA no GCE, **Fig. 38**. Além disso mais uma vez foi observado após a interação o alargamento da largura do pico da dGuo, **Fig. 38**. Esses resultados consequentemente tanto pelo desaparecimento do processo anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, bem como pela variação do perfil voltamétrico da resposta do dsDNA na

superfície do eletrodo, indicam uma forte interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na molécula do dsDNA, possivelmente provocando uma mudança conformacional bem significativa na sua estrutura.

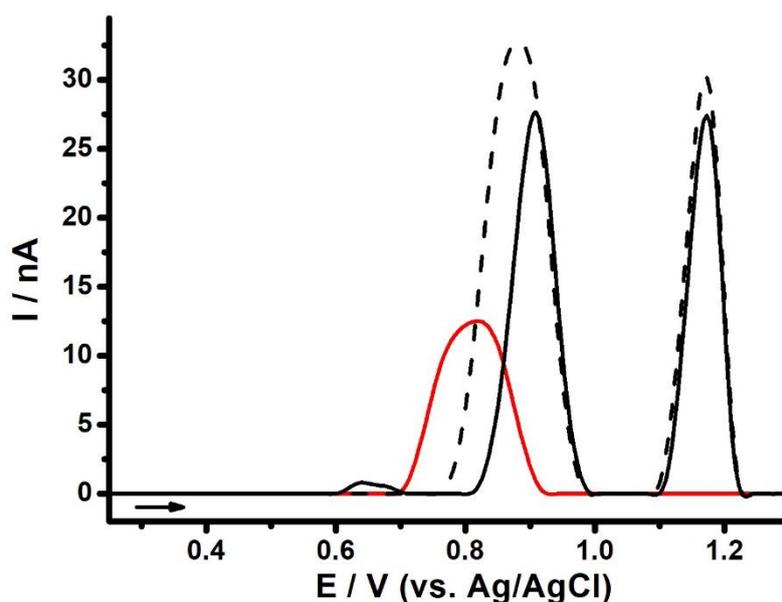
**Figura 37.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em pH = 7,0, da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> após 3 h, (—) dsDNA 165 μg mL<sup>-1</sup> após 2 h e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>) após 1 h.



O último voltamograma de DP registrado na mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>), após 2 h de interação, **Fig. 38**, detectou apenas os dois picos anódicos referentes à eletro-oxidação do DNA, bem semelhantes aos resultados obtidos em 5 min e 1 h de incubação, **Fig. 36 e 37**, demonstrando que a interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA que ocorreu nos 5 min iniciais de incubação ainda persiste após 2 h e que outras interações/processos paralelos não foram observados. Assim, no geral, os resultados eletroquímicos, **Fig. 36, 37 e 38**, indicaram uma forte interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com o DNA, possivelmente via intercalação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na dupla-fita do DNA, com uma formação de um complexo estável, alterando a conformação estrutural da molécula do DNA e dificultando o acesso da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na superfície do substrato eletroquímicos e consequentemente sua eletro-oxidação. Os resultados também demonstraram que a cinética de reação (intercalação) entre a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na dupla fita é

relativamente rápida e estável. Esses resultados eletroquímicos são concordantes com os resultados da interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA via eletroforese, Seção 4.3.3., o qual também indicaram uma forte interação via intercalação desta droga na dupla fita do DNA, como também são concordantes com resultados eletroquímicos prévios da literatura, o qual também demonstraram via eletroquímica, utilizando eletrodo de grafite, a interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com oligonucleotídeos de DNA (TOPKAYA et al., 2018).

**Figura 38.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), em pH 7,0, da: (—) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 5 μmol L<sup>-1</sup> após 3 h, (—) dsDNA 165 μg mL<sup>-1</sup> após 2 h e (---) 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>) após 2 h.



Estudos da interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA foram também efetuados variando as concentrações da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr (10, 50 e 100 μmol L<sup>-1</sup>) e mantendo-se sempre a concentração do dsDNA próxima aos 165 μg mL<sup>-1</sup>. Todas as misturas foram incubadas por diferentes períodos de tempo e no fim de cada período os voltamogramas de DP foram registradas. Os resultados, no geral, foram análogos aos obtidos para a mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr/DNA (5 μmol L<sup>-1</sup>/165 μg mL<sup>-1</sup>) e mostraram uma queda significativa ou o desaparecimento do pico anódico associado com a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr e pequenas variações no perfil voltamétrico da molécula do dsDNA, sinalizando a intercalação deste produto de

estresse oxidativo (*in-vivo*) na dupla hélice do DNA, provocando conseqüentemente uma mudança conformacional bem significativa na sua estrutura. Entretanto, é também importante relatar que, nas condições experimentais investigadas, nenhum dano oxidativo na molécula do DNA foi detectado a partir da sua interação com a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr.

#### 4.4.2. Eletro-oxidação da guanina na ausência/presença do dsDNA

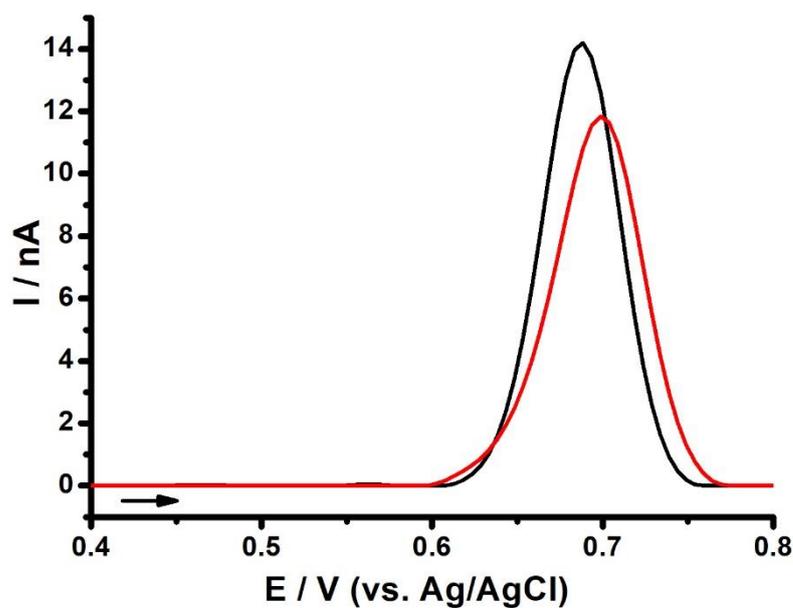
É bem conhecido na literatura a baixa afinidade da molécula do dsDNA com a superfície do GCE, considerando a complexidade da sua estrutura e sua alta hidrofiliçidade (OLIVEIRA BRETT; BRETT, 1996). Entretanto foi investigado aqui a eletro-oxidação da guanina na ausência/presença da molécula do dsDNA, como uma experiência controle/modelo, para demonstrar que a molécula de dsDNA não provoca o bloqueio nem parcial, muito menos total, da superfície eletroativa do GCE, os quais poderiam dificultar os processos de transferência carga associados a reações redox de moléculas orgânicas na presença do dsDNA.

Voltamogramas de DP foram registrados numa solução de Guanina (Gua) 1 µmol L<sup>-1</sup> preparada em tampão fosfato, pH = 7,0, e apenas um único pico anódico, em E<sub>pa</sub> = + 0,69 V e com corrente de pico de 14 nA, **Fig. 39**, foi identificado, em concordância com a literatura (OLIVEIRA-BRETT et al., 2002), o qual corresponde a oxidação da Gua, com a retirada de dois elétrons e dois prótons, para formação de 8-oxoguanina.

O mesmo experimento acima foi realizado, mas na presença do dsDNA 200 µg mL<sup>-1</sup>. Assim voltamogramas de DP foram registrados numa solução de Gua-dsDNA (1 µmol L<sup>-1</sup>/200 µg mL<sup>-1</sup>) preparada em tampão fosfato, pH = 7,0, e como esperado o pico de eletro-oxidação da Gua, em E<sub>pa</sub> = + 0,69 V, foi observado e com valores de corrente bem próximos ao experimento controle, realizado na ausência do dsDNA, **Fig. 39**, demonstrando assim que a molécula do dsDNA não provoca nenhum bloqueio da superfície eletroativa do GCE e conseqüentemente não interfere no processo de eletro-oxidação da Gua. Assim, esses experimentos foram importantes para demonstrar e confirmar que o desaparecimento do pico anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr, Seção 4.3, na presença do dsDNA ocorre de fato e exclusivamente devido a interação dessas moléculas,

dificultando assim o acesso da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr à superfície do GCE e consequentemente sua oxidação.

**Figura 39.** Voltamogramas de DP (com correção de linha de base), obtidos em tampão fosfato, pH 7,0: (—) Guanina 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e (—) Guanina-DNA (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ /200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



#### 4.4.3. Estudo da interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA utilizando eletroforese em gel

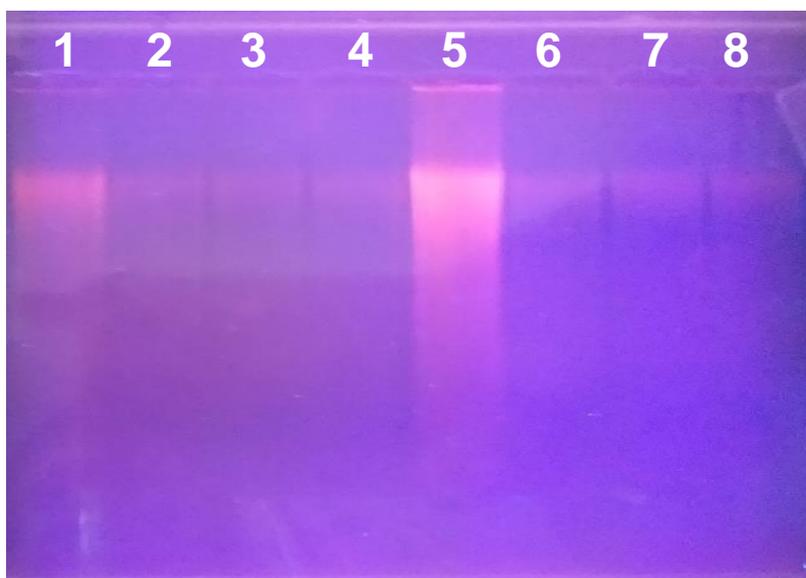
O método de retardação em gel tem sido exhaustivamente utilizado para evoluir variações estruturais na molécula do DNA, a partir de interações de inúmeras espécies químicas com o DNA (HAMES, 1998; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2012). Assim, a eletroforese em gel de agarose convencional foi realizada, como descrito na *Seção Experimental*, para investigar as variações estruturais do DNA após sua exposição/incubação com a molécula da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Os resultados da eletroforese foram todos comparados aos eletroquímicos, *Seção 4.1 e 4.2*.

Para detecção das variações estruturais no DNA foi usado o ensaio de ligação do marcador/intercalante brometo de etídio (EtBr) ao DNA. No geral, quanto menor o comprimento do fragmento do DNA, maior é a sua mobilidade eletroforética. Já a mobilidade do DNA de fita simples de mesmo comprimento de uma molécula de DNA de fita dupla apresenta uma maior mobilidade na matriz do gel de agarose, mesmo que a carga negativa da estrutura da dupla fita

seja o dobro (HAMES, 1998). Além disso, na presença de uma interação droga-DNA via intercalação é esperado neste ensaio uma diminuição significativa ou até o completo desaparecimento da fluorescência do marcador eletroforético utilizado (HAMES, 1998).

O perfil eletroforético de migração para as amostras preparadas em tampão fosfato, pH = 7,0, e incubadas todas por um período total de 2 h com: DNA 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 ou 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (poços 2, 3 e 4 respectivamente) e DNA 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 ou 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (poços 6, 7 e 8 respectivamente) é mostrado na **Figura 40**. As amostras controles de dsDNA 100 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram também analisadas após 2 h de incubação em tampão fosfato, pH = 7,0 (poços 1 e 5 respectivamente). A banda observada para as amostras de dsDNA controle foi associada aos fragmentos do dsDNA altamente polimerizado utilizado (calf thymus dsDNA altamente polimerizado, 10000-15000 pares de bases).

**Figura 40.** Eletroforese em gel de agarose (0,7 %) da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA após 2 h de incubação. Controles do dsDNA 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Poço 1 e 5) e mistura de dsDNA 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Poço 2, 3 e 4) e dsDNA 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (poço 6, 7 e 8).



Em todas as amostras analisadas (poços 2-4 e 6-8) foi observado uma diminuição significativa ou total da fluorescência do EtBr, quando comparado as amostras controles (poço 1 e 5), indicando a dificuldade da intercalação do

marcador o EtBr e de sua ligação a molécula do dsDNA, claramente devido a prévia intercalação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na dupla-fita do dsDNA. Esses resultados estão bem concordantes com os resultados eletroquímicos que também sinalizaram uma interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-dsDNA via intercalação, Seção 4.3.

O experimento acima foi repetido onde amostras de dsDNA 250 µg mL<sup>-1</sup> com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 ou 250 µmol L<sup>-1</sup> foram incubadas em tampão fosfato (pH = 7,0) por 24 h e posteriormente analisadas (poços 2, 3 e 4 respectivamente), **Fig. 41.** Em todas as amostras uma diminuição bem significativa da intensidade de fluorescência do BrEt foi observada quando comparado com o poço 1 controle, obtido nas mesmas condições experimentais, mas na ausência da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. Indicando dificuldade de ligação do marcador fluorescente devido a prévia interação claramente via intercalação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no dsDNA. Este resultado também indica a estabilidade desta intercalação mesmo após um longo período de tempo, 24 h e que outros processos/interações paralelas não foram detectadas. Consequentemente baseado nestes resultados pode se afirmar que a interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com dsDNA ocorre provocando variações conformacionais sobre a estrutura secundária do DNA, podendo assim interferir em diversos processos bioquímicos importantes da molécula do DNA *in-vivo* e possivelmente como já relatado na literatura causando alguns tipos de patologias (SIRAJUDDIN et al., 2013).

**Figura 41.** Eletroforese em gel de agarose (0,7 %) da mistura 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA após 24 h de incubação. Controles do dsDNA 250 µg mL<sup>-1</sup> (Poço 1) e mistura de dsDNA 250 µg mL<sup>-1</sup> com 3-NO<sub>2</sub>-Tyr 50, 100 e 250 µmol L<sup>-1</sup> (Poço 2, 3 e 4).



---

# **CAPÍTULO 5**

## ***CONCLUSÕES***

Este trabalho investigou o comportamento de oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr bem como sua interação com o DNA. Portanto, estudos voltamétricos foram realizados em vários substratos, tais como, GCE, eletrodo de ouro e platina utilizando as técnicas de CV, DPV, SWV e EIS. O estudo sistemático dos processos de eletrodo envolvidos na oxidação eletroquímica da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foi estudado em diferentes eletrólitos suporte. Para o estudo da interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr-DNA também foi utilizada a técnica de eletroforese em gel.

O estudo do comportamento anódico da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr demonstrou que a 3-NO<sub>2</sub>-Tyr sofre eletro-oxidação numa única etapa, no grupo fenólico com a retirada de um elétron e um próton, com a formação de um radical intermediário altamente reativo que em meio aquoso produz produtos poliméricos que adsorvem fortemente na superfície do GCE, aumentando sua resistividade e conseqüentemente dificultando a transferência de carga na sua superfície.

A oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr no eletrodo de ouro e platina foi bem semelhante aqueles obtidos no GCE demonstrando com clareza que não há efeito eletrocatalítico dessas superfícies metálicas, ouro e platina, quando comparadas ao GCE. O estudo que foi realizado com a Tyr no eletrodo de ouro e platina por outro lado demonstrou que a nitração da Tyr dificulta a eletro-oxidação do grupo fenólico da sua estrutura, o qual ocorre em valores de potenciais bem mais positivos.

Métodos eletroanalíticos para a determinação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr foram desenvolvidos utilizando SWV em GCE, eletrodo de ouro e platina em meio neutro, pH = 7,0. E quando esses métodos propostos são comparados foi notoriamente evidente a melhor sensibilidade do GCE, com um LOD de 0,17  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e um LOQ de 0,57  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os resultados eletroquímicos demonstraram uma forte interação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com o DNA possivelmente via intercalação com a formação de um complexo estável, alterando a conformação estrutural da molécula de DNA, e dificultando a eletro-oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na superfície do eletrodo. Estes resultados também mostraram que a intercalação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na dupla fita do DNA ocorre de forma rápida e estável. Os resultados da eletroforese em gel convergiram claramente com os eletroquímicos e detectaram a intercalação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr na fita dupla do DNA, uma vez que a fluorescência do marcador,

brometo de etídio, diminuiu significativamente com o tempo de incubação dessas espécies.

Assim no geral os resultados eletroquímicos demonstraram a possibilidade da oxidação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr em diferentes substratos eletroquímicos, e poderão talvez elucidar ou serem co-relacionados com processos redox dessa molécula que ocorrem *in-vivo*. Os métodos eletroanalíticos propostos também possivelmente serão aplicados para detecção e quantificação da 3-NO<sub>2</sub>-Tyr. E por fim os resultados da interação 3-NO<sub>2</sub>-Tyr com a molécula do dsDNA demonstram a sua toxicidade e a mesma como um possível carcinógeno, entretanto estudos complementares, principalmente *in-vivo*, ainda são relevantes e importantes para tal conclusão.

---

# **CAPÍTULO 6**

## ***REFERÊNCIAS***

ABELLO, N. et al. Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 3222-3238, 2009.

ABU-QARE, A. W.; ABOU-DONIA. Biomarkers of Apoptosis: Release of Cytochrome c, Activation of Caspase-3, Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, Increased 3-nitrotyrosine, and Alteration of p53 Gene. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 4, p. 313–332, 2001.

ACAR, E. T. et al. Investigation of Electrochemical Behavior and Development of a Validated Adsorptive Stripping Square Wave Voltammetry Method for 3-Nitrotyrosine in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, p. 581–589, 2016.

Acquaad, G. **Practical protein electrophoresis for genetic research**. Portland: Discorides Press, p. 131, 1992.

AHSAN, H. 3-Nitrotyrosine: A Biomarker of Nitrogen Free Radical Species Modified Proteins in Systemic Autoimmunogenic conditions. **Human Immunology**, v. 74, p. 1392-1399, 2013.

ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys**, São Paulo, 2002.

ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Vicosa: SIF, p. 242, 1999.

ARDAKANI, M.M., et al. Electrocatalytic Oxidation of Cysteine by Quinizarine at Glassy Carbon Electrode. **Sensor Actuator B Chem.** 123, 763-768, 2007.

ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente, 5ª ed, **Bookman**, 2012.

BAGINSKI, M. et al. Electrostatic and Non-electrostatic Contributions to the Binding Free Energies of Anthracycline Antibiotics to DNA, **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 253, 1997.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.

BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Antitumour Complexes and DNA Interactions and their Tools of Analysis: an Approach to Metalintercalators, **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, p. 1998-2016, 2015.

BAUER, W.; VINOGRAD, J. The Interaction of Closed Circular DNA with Intercalative Dyes: III. Dependence of the Buoyant Density Upon Superhelix Density and Base Composition, **J. Mol. Biol.** v. 54. p. 281-298, 1970.

BEYNON, R.; EASTERBY, J. The Basics Buffer Solutions. **Oxford: Oxford University Press**, 1996.

BRABEC, V.; MORNSTEIN, V. **Biophys. Chem.** 12, 159, 1980.

BRABEC, V.; SCHINDLEROVA, I. **Bioelectrochem. Bioenerg.** 8, 451, 1981.

BRAMMER, S. P. A Técnica de Eletroforese: Importância e Aplicações em Análises Genéticas. **Embrapa Trigo**, p. 13, 2001.

BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT A. M. Electrochemistry: Principles, Methods and Applications, **Oxford: Oxford Science University Publications**, 1993.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. Bioquímica. **Cengage**, 8ª edição, 2017.

CAO, F. et al. A High-Performance Electrochemical Sensor for Biologically Meaningful L-Cysteine Based on a New Nanostructured L-Cysteine Electrocatalyst. **Analytica Chimica Acta**, v. 1019, p. 103–110, 2018.

CHIORCEA-PAQUIM, A. M. et al. Applications of DNA – Electrochemical Biosensors in Cancer Research, **Elsevier**, 2017.

CHIORCEA-PAQUIM, A. N. Applications of DNA-Electrochemical Biosensors in Cancer Research. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 77, Capítulo 9, 2017.

CONVENTZ, A. et al. Simultaneous Determination of 3-nitrotyrosine, Tyrosine, Hydroxyproline and Proline in Exhaled Breath Condensate by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 860, p. 78–85, 2007.

CORDUNEANU et al. DNA Interaction with Palladium Chelates of Biogenic Polyamines Using Atomic Force Microscopy and Voltammetric Characterization. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1245-1252, 2010.

COSTA, E. O. Desenvolvimento de Sensor Nanoestruturado e Biossensor de dsDNA para Determinação de Substâncias de Interesse Biológico: Nitrotirosina, Ácido Ascórbico e Ácido Úrico. **Tese de Doutorado**, Alagoas, 2016.

DU, M. et al. Simultaneous Determination of 3-nitro tyrosine, *o*-, *m*-, and *p*-tyrosine in Urine Samples by Liquid Chromatography–Ultraviolet Absorbance Detection with Pre-Column Cloud Point Extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 321-329, 2004.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. **Bioelectrochemistry**. v. 89, p. 11, 2013.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Phenol and para substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 9–16, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2011.02.022>>

ERDAL, N. et al. Effects of Long-term Exposure of Extremely Low Frequency

Magnetic Field on Oxidative/Nitrosative Stress in Rat Liver. **Journal of Radiation Research**, v. 49, p. 181-187, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3.ed. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, p. 220, 1998.

GUIDELLI, R. et al. Defining the Transfer Coefficient in Electrochemistry: An Assessment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, p. 245-258, 2014.

GUIDELLI, R. et al. Definition of the Transfer Coefficient in Electrochemistry (IUPAC Recommendations 2014). **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, p. 259-262, 2014.

GUO, S. et al. Determination of Free 3-Nitrotyrosine in Human Plasma Using HPLC method with Fluorescence Detection. **Chemia. Analyt.**, v. 54, p.691–703, 2009.

HAJIAN, R.; SHAMS, N., MOHAGHEGHIAN, M. Study on the Interaction Between Doxorubicin and Deoxyribonucleic Acid with the use of Methylene Blue as a Probe, J. Braz. **Chem. Soc.** v. 20. n. 8. p. 1399-1405, 2009.

HAMES, B. D. Gel Electrophoresis of Proteins. **School. Third Edition**, 1998.

HASEEB, A. 3-Nitrotyrosine: A Biomarker of Nitrogen Free Radical Species Modified Proteins in Systemic Autoimmunogenic Conditions. **Human Immunology**, 74, 1392–1399, 2013.

HUNTER, R. L.; MARKET, C. L. Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels. **Science**. v. 125, p. 1294-1295, 1957.

KILCIKSIZ, S. et al. N-acetylcysteine ameliorates nitrosative stress on radiation-inducible damage in rat liver. **Journal of BUON**, v. 16, p. 154-159, 2011.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN. Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 60, p. 702-706, 1983.

KONG, G. Characterizing the Interactome of Nitrotyrosine-Calmodulin using Genetic Code Expansion. **Tese de Doutorado**, Oregon State University, 2017.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX. M. M.; **Principles of Biochemistry**, 6th edition, p. 281-297, 2014.

LI, X. et al. A Novel Mixed-Mode Solid Phase Extraction Coupled with LC–MS/MS for the Re-evaluation of Free 3-nitrotyrosine in Human Plasma as an Oxidative Stress Biomarker. **Talanta**, v. 140, p. 45-51, 2015.

MAHMOUDI, L. et al. Electrode Potentials of L-Tryptophan, L-Tyrosine, 3-Nitro-L-Tyrosine, 2,3-Difluoro-L-Tyrosine, and 2,3,5-Trifluoro-L-Tyrosine. **Biochemistry**, v. 55, p. 2849-2856, 2016.

MARTÍNEZ, R.; GARCÍA, L. C. The search of DNA-intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What Did not Work, **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 127-151, 2005.

MEI, H. Y.; BATON, J. K. Chiral Probe for A-form Helices of DNA and RNA tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II), **J. Am. Chem. Soc.** v. 108. p. 7414-7416, 1986.

MENDES, C. H. S. et al. Electrochemical Detection of Guanine-methylation Using Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 31, p. 1-11, 2019.

MIHM, M. J. et al. Nitrotyrosine Causes Selective Vascular Endothelial Dysfunction and DNA Damage. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 36, p. 182-187, 2000.

MURATA, M.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA Damage Induced by Nitrotyrosine, a Biomarker of Inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 123-128, 2004.

NASCIMENTO, R. F. et al. Electrochemical Detection of 7-methylguanosine and DNA-methylation. **Analytical Methods**, v. 10, p. 4525-4534, 2018.

NI, Y.; WANG, Y.; KOKOT, S. Voltammetric, UV–Vis Spectrometric and Fluorescence Study of the Interaction of Ractopamine and DNA with the Aid of Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares, **Electroanalysis**. v.22. n. 19. p. 2216-2224, 2010.

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Direct Electrochemistry of Native and Denatured Anticancer Antibody Rituximab at a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 25, p. 1029-1034, 2013.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA BRETT A. M. DNA-Electrochemical Biosensors: AFM Surface Characterisation and Application to Detection of In Situ Oxidative Damage to DNA. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.13, p.628-640, 2010.

OLIVEIRA BRETT, A. M. et al. DNA-Electrochemical Biosensors for Investigating DNA Damage. **Comprehensive Analytical Chemistry**, p. 413-437, 2007.

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Electrochemical Biosensors for DNA–Drug Interactions. Elsevier, 2018.

OLIVEIRA BRETT, A. M. et al. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. **Talanta**, v. 56, p. 959-970, 2002.

OLIVEIRA, S. C. B. Electrochemical oxidation mechanism of procarbazine at glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 746, p. 51-56, 2015.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochemistry*, v. 55, p. 61-62, 2002.

OLIVEIRA BRETT, A. M.; BRETT, C. M. *Eletroquímica:Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In Situ DNA Oxidative Damage by Electrochemically Generated Hydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode. *Langmuir*, v. 28, p. 4896-4901, 2012.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA BRETT, A. M. *In Situ* DNA Oxidative Damage by Electrochemically Generated Hydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Langmuir**. n. 28, p. 4896-4901, 2012. Disponível em: <pubs.acs.org/Langmuir>

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Insitu electrochemical and AFM study of thalidomide–DNA interaction. *Bioelectrochemistry*, v. 76, p. 201-207, 2009.

OLIVEIRA, S. C. B.; CORDUNEANO, O.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ Evaluation of Heavy Metal-DNA Interactions Using in Electrochemical DNA biosensor. **Bioelectrochemistry**. v. 72. n. 1. p. 53-58, 2008.

OLIVEIRA, S. C. B. et al. Isatin nitro-derivatives redox behaviour. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 689, p. 207-215, 2013.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 516-537, 2013.

POLICARPI, E. V. Síntese, Caracterização e Estudo de Interação com o DNA de Novos Complexos de Cobre (II) com o Ligante “DPPZ”. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Florianópolis, 2008.

PONTINHA, A. D. R. et al. Antineoplastic Drug Methotrexate Redox Mechanism Using a Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 24, p. 917-923, 2012.

PRADAC, J.; KORYTA, J. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.** v.17, p.167, 1968.

QUEIROZ, N. L. et al. Oxidation Mechanism of Fluorescein at Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 29, p. 489-496, 2017.

RADOVIC, L. R. et al. An Experimental and Theoretical Study of the Adsorption of Aromatics Possessing Electron Withdrawing and Electron-Donating Functional Groups by Chemically Modified Activated Carbons. **Elsevier**, v. 35, p. 1339-1348, 1997.

RANDVIIR, E. P.; BANKS, C. E. Electrochemical Impedance Spectroscopy: An Overview of Bioanalytical applications. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 1098-1115, 2013.

REHN, C.; PINDUR, U. Molecular Modeling of Intercalation Complexes of Antitumor Active 9-aminoacridine and a [d,e]-annelated Isoquinoline Derivative with Base Paired Deoxytetranucleotides, **Monatshefter für Chemie.** v. 127, p. 645-658, 1996.

REYNAUD, J. A.; MALFOY, B.; CANESSON, P. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 195–211, 1980.

RICHARDS, D. A. et al. Electrochemical Detection of Free 3-nitrotyrosine: Application to Microdialysis Studies. **Analytical Biochemistry**, v. 351, p. 77–83, 2006.

SALVIA, M. et. al, Thiazotropsin Aggregation and its Relationship to Molecular Recognition in the DNA Minor Groove. **Biophysical Chemistry**. v. 179, p. 1-11, 2013.

SANTARINO, I. B. et al. In Situ Evaluation of the Anticancer Antibody Rituximab-dsDNA Interaction Using a DNA Electrochemical Biosensor. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1304-1311, 2014.

SARVER, A. et al. Analysis of Peptides and Proteins Containing Nitrotyrosine by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, p. 439-448, 2001.

SCHWARZENBACH, R.P., et al., Environmental Organic Chemistry. **Wiley Online Library**, 2003.

SHAROV, V. S. et al. Age-Associated Tyrosine Nitration of Rat Skeletal Muscle Glycogen Phosphorylase B: Characterization by HPLC–Nanoelectrospray–Tandem Mass Spectrometry. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 407-416, 2006.

SHACTER, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabol Rev**, v. 32, p. 307-326, 2000.

SHIMIZU, K.; SEPUNARU, L.; COMPTON, R. G. Innovative Catalyst Design for the Oxygen Reduction Reaction for Fuel Cells. **Chemical Science**, v. 7, 3364-3369, 2016.

SHUI, X. et. al. Effects of Cationic Charge on Three-Dimensional Structures of Intercalative Complexes Structure of a Bisintercalated DNA Complex Solved by MAD Phasing. **Curr. Med. Chem.** v. 7, p. 59-71, 2000.

SILVA, L. V. Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos Baseados em Nanotubos de Carbono e Polímeros de Ácido Ferúlico e Capsaicina para

Detecção e Quantificação de 3-Nitro-L-Tirosina, Epinefrina e Dopamina. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Alagoas, 2017.

SILVA, M. M. Interação entre compostos biologicamente ativos e ctDNA (Calf Thymus): Uma Abordagem Espectroscópica. **Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia**. p. 20-25. Universidade Federal de Alagoas, 2016.

SINDEN, R. R. DNA Structure and Function, **Academic Press**, 1994.

SIRAJUDDIN, M; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Paquistão, v.124, p. 1-19, 2013.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.W.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2008.

SMITHIES, O. Zone Electrophoresis in Starch Gels. **Biochem. J.** v. 61, p.629-641, 1955.

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.

STADTMAN, E.R., Protein oxidation and aging. **Science**, 257, 1220-1224, 1992.

STOYNOV, Z. B.; VLADIKOVA, D.E. Measurement Methods- Electrochemical: Impedance Spectroscopy. **Elsevier**, 2009.

SUN, Y. C. et al. Establishment of a Sandwich ELISA Using Commercial Antibody for Plasma or Serum 3-nitrotyrosine (3NT). Elevation in Inflammatory Diseases

and Complementary Between 3NT and Myeloperoxidase. **Clinica Chimica Acta**, v. 378, p. 175-180, 2007.

SUPRUN et al. Analysis of Redox Activity of Proteins on the Carbon Screen Printed Electrodes. **Electroanalysis**, v. 25, p. 2109-2116, 2013.

SWAIN, G. M. Solid Electrode Materials: Pretreatment and Activation. **Handbook of Electrochemistry**, 2007.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. Isozymes in Plant Genetics Breeding. **Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers**, p. 516, 1983.

TEIXEIRA, D. et al. Development of a New HPLC-Based Method for 3-Nitrotyrosine quantification in Different Biological Matrices. **Journal of Chromatography B**, v. 1046, p. 48–57, 2017.

TOPKAYA, S. N. et al. Nitration of Tyrosine and its Effect on DNA Hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 464-469, 2018.

VASCONCELOS, S.M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

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

WANG, Z.; ZHU, G. DNA Damage Repair Pathways and Repair of Cisplatin-Induced DNA Damage. Reference Module in Chemistry, **Molecular Sciences and Chemical**, Engineering, 2018.

WANG, Z. et al. Tyrosine Nitration Site Specificity Identified by LC/MS in Nitrite-Modified Collagen Type IV. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 39, p. 74-83, 2007.

WARING M. J.; BAILLY C. The Purine 2-amino Group as a Critical Recognition Element for Binding of Small Molecules to DNA, **Gene**. v. 149. p. 69-79, 1994.

WEBER, D. et al. Rapid and Sensitive Determination of Protein-Nitrotyrosine by ELISA: Application to Human Plasma. **Journal Free Radical Research**, v. 46, p. 276-285, 2012.

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.

ZHOU, Y. et al. Highly Selective Electrochemiluminescent Probe to Histidine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 122–125, 2017.

---

# **ANEXO**

## ***PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA***

## **ANEXO: PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICO DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO**

### **1. Artigos em periódicos**

Raphael F. Nascimento, Maysa L. Nascimento, **José A.M. Nascimento**, Hitala N.L. Santos, Alex P. Araújo and Severino Carlos B. Oliveira; Redox Reactions of Ortho-Tyrosine and 3-Nitro-Tyrosine: a Comparative Study with para-Tyrosine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019.

Raphael F. Nascimento, **José A.M. Nascimento**, João G. S. Montenegro, Valberes B. Nascimento and Severino Carlos B. Oliveira; Electrochemical Detection of 7-Methylguanosine and DNA-Methylation. *Analytical Methods*, v. 10, p. 4525-4534, 2018.

Nathalia L. Queiroz, Maysa L. Nascimento, **José A. M. Nascimento**, Valberes B. Nascimento and Severino Carlos B. Oliveira; Electrochemistry Study of Antineoplastic Raltitrexed Oxidation Mechanism and its Interaction with DNA. *Electroanalysis*, v. 30, p. 1184-1191, 2018.

### **2. Resumos em congressos**

M. L. Nascimento, R.F. Nascimento, H.N.L. Santos, A.P. Araújo, **J.A.M. Nascimento**, V.B. Nascimento and S.C.B. Oliveira; Redox mechanism of 3-nitro-tyrosine at glassy carbon electrode, In: XXII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 01 a 05 de Setembro de 2019, Ribeirão Preto – São Paulo- Brasil.

R. F. Nascimento, **J. A. M. Nascimento**, J. G. S. Montenegro, V. B. Nascimento and S. C. B. Oliveira; Electrochemical Detection of DNA Methylation Using a DNA-Electrochemical Biosensor. In: 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE), 02 a 07 de Setembro de 2018, Bolonha - Itália.

N. L. Queiroz, M. L. Nascimento, **J. A. M. Nascimento**, V. B. Nascimento and S. C. B. Oliveira. Electrochemistry Study of Antineoplastic Raltitrexed Oxidation Mechanism and its Interaction with DNA. In: 69th Annual Meeting of

the International Society of Electrochemistry (ISE), 02 a 07 de Setembro de 2018,  
Bolonha - Itália.