UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

EMERSON FINCO MARQUES

**Investigação de produtos de reação do oxigênio
singlete em proteínas por espectrometria de
massas e marcação isotópica**

Versão da tese corrigida

São Paulo

11/10/2017

EMERSON FINCO MARQUES

**Investigação de produtos de reação do oxigênio
singlete em proteínas por espectrometria de
massas e marcação isotópica**

*Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Química)*

Orientador : Prof . Dr. Paolo Di Mascio

São Paulo
2017

Dedico a todos aqueles que algum dia foram julgados de alguma forma, seja pela cor da pele, gênero, condição social ou sexual.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao universo e a todos as fontes de influência sem distinção de crenças, aos sonhos vividos e realizados, a vida pelos caminhos traçados e alcançados, pelas oportunidades e aprendizados imutáveis, pelos erros, derrotas e caminhos escolhidos, decorrentes das minhas escolhas destemidas que me levam a experiências únicas.

Aos meus pais, Sérgio e Mária, que mesmo na simplicidade e dificuldades passaram valores que nenhuma faculdade seria capaz de proporcionar, também as minhas irmãs Solange e Aline, que direta e indiretamente sempre estão comigo e proporcionaram eu chegar até aqui.

Ao Professor Dr. Paolo Di Mascio por ter me convidado a realizar o doutorado em bioquímica, e ter aceito que eu fizesse em química. Agradeço pela confiança depositada em mim, por ter me deixado realizar o meu trabalho da forma mais aberta possível, ter me deixado errar muito, mesmo que de certa forma até demais, mas aprendi muito. Hoje tenho plena confiança de que foi a orientação quase que perfeita, me tornando no pesquisador que eu pretendia ser: um espectrometrista de massas.

A Professora Marisa pela colaboração científica e ajuda em correções impecáveis e ter sempre disponibilizado seu laboratório.

A professora Ohara que indiretamente, após minha qualificação, e as colaborações influenciaram muito o caminho deste trabalho.

Ao Raphael, e em especial a Verônica, pelas colaborações durante esse trabalho, haja visto, que mesmo que sem saber, havíamos escolhido a mesma proteína e acabamos um influenciando o outro em seus trabalhos.

Aos colegas e amigos do laboratório do Paolo: Marilene, Fernanda, Grazy, Tatiana, Miguelito, Aleksandra, Helen, Izaura, Agda, Camila, Flávia e acima de todos a Kátia, uma pessoa iluminada que tive o prazer de trazer junto a mim ao laboratório

Aos colegas e amigos do laboratório da professora Marisa, Verônica, Florêncio, e a única, Adriana.

Ao pessoal e equipe da Central Analítica, na qual tive a imensa sorte de compartilhar cinco anos de convivência: Luiza, Fernando, Mirian, Janaina,

Cristiane, Rebeca, Vitor, Michele, Alessandra, Margarida, Wilton, Adriana, Nanci, Denise, Márcio, Vania, Alfredo e a Giovana.

Um agradecimento especial a minha grande amiga de longas dadas e aventuras Giovana Cássia.

Um agradecimento a Alessandra Ramalho, que foi quem me iniciou e treinou nos equipamentos de massas da central, sempre disposta a ajudar e ensinar.

Aos meus colegas e amigos conquistados nestes anos de IQUSP, seria injusto numerá-los, pois com certeza foram muitos e cada um é único.

Aos meus professores do DQ-UFSCar pelos ensinamentos e contribuição na minha formação, que foram mais do que perfeitos na construção da pessoa que sou, e gostaria ser.

Ao pessoal da Bruker Daltonics Brasil, Eduardo, Diego e Luiz Fernando por todo o apoio e ensinamentos, da Bruker EUA e Bruker Alemanha.

A Camila da Shimadzu por todo o suporte, atenção e capacidade, na saga para colocarmos o único nano-LC da shimadzu do Brasil para funcionar.

Aos secretários da pós-graduação, em especial ao Milton pela sua excelência como secretário, sempre disposto a ajudar e sanar meus problemas.

Em geral, a todos funcionários do IQ-USP sem distinção de cargo.

A todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente.

Ao CEPID REDOXOMA, NAP REDOXOMA, CNPq e a FAPESP pelo financiamento dessa pesquisa.

“ An investment in knowledge Always pays the best interest.”

Benjamin Franklin

RESUMO

Marques, E.F. **Investigação de produtos de reação do oxigênio singlete em proteínas por espectrometria de massas e marcação isotópica.** 2017. 170p. Tese - Programa de Pós-Graduação em química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O oxigênio molecular singlete ($^1\text{O}_2$) é formado em sistemas biológicos e reage com diferentes biomoléculas. Proteínas representam um dos principais alvos de oxidação, devido as suas altas concentrações em organismos. Em pH fisiológico $^1\text{O}_2$ reage com His, Tyr, Met, Cys e Trp. Neste trabalho investigamos a oxidação causada pelo $^1\text{O}_2$ e a formação de dimerização em uma proteína modelo, a lisozima. A identificação dos principais produtos de oxidação e dimerização foi realizada por sequenciamento de peptídeos através de nano cromatografia acoplada a espectrometria de massas (nLC-MS/MS). A geração de $^1\text{O}_2$ foi realizada por fotossensibilização utilizando luz e rosa bengala como fotossensibilizador, e pela decomposição térmica de endoperóxidos derivado do naftaleno DHPN $^{16}\text{O}_2$ e DHPN $^{18}\text{O}_2$, uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$ no meio reacional. Os resultados demonstraram que a reação do oxigênio singlete com lisozima acarreta oxidação dos resíduos de Met, His e Trp. A caracterização da estrutura primária por nLC-MS/MS dos aminoácidos confirmou a adição de átomos de oxigênio marcado (^{18}O). A lisozima é constituída apenas de um resíduo de histidina (His 15) e as oxidações identificadas foram adições de massas de +14 Da (descrita como 2-oxo-histidina), +16 e +32 Da. Os resíduos de metionina (Met 12 e Met 105) foram identificados como sulfóxidos (MetSO - adição de massas de +16 Da). Para os resíduos de triptofano foram identificados a formação de quinurenina (adição de massas de +4 Da), +16 e +32 Da. As oxidações levaram a formação de dimerização na proteína caracterizada por eletroforese em gel e nLC-MS/MS. O objetivo principal do trabalho foi analisar a ligação cruzada entre o resíduo de histidina 2-oxo-histidina na lisozima. Entretanto, foram identificadas ligações cruzadas entre 2-oxo-histidina e resíduos de lisina, além de ligações cruzadas com resíduos de triptofano oxidado. Em consequência dos resultados obtidos com a proteína modelo, avaliamos as oxidações e formação de dímeros em proteínas extraídas do cristalino do olho bovino. Diferentes tipos de modificações foram observados, além da formação de dímeros entre resíduos de histidina (2-oxo-His-His) caracterizados por nLC-MS/MS e bioinformática. Os dados obtidos neste trabalho, fornecem evidências da ocorrência simultânea de formação de ligações cruzadas entre diferentes proteicas após exposição a $^1\text{O}_2$. O trabalho resultou na identificação e sequenciamento através de nLC-MS/MS de peptídeos oxidados por $^1\text{O}_2$ a partir de uma proteína modelo. Esses resultados reiteram o importante papel do $^1\text{O}_2$ em reações com proteínas além do seu envolvimento no desenvolvimento de condições patológicas. A dimerização formada na ligação cruzada em 2-oxo-His-His representa um possível novo biomarcador para o $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos.

Palavras-chave: Oxigênio molecular singlete, oxidação de proteína, oxidação de amino ácidos, lisozima, marcação isotópica, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Marques, E.F. **Investigation of singlet oxygen reaction products in proteins by mass spectrometry and isotopic labeling.** 2017. 170p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) can be generated in biological systems, reacting with different biomolecules. Proteins are major target for oxidants due to higher concentration in organisms. At physiological pH, $^1\text{O}_2$ may react with the following aminoacids: His, Tyr, Met, Cys and Trp. Here, we investigated oxidation and dimerization reactions of proteins exposed to $^1\text{O}_2$ using lysozyme as a model. Modifications of lysozyme by $^1\text{O}_2$ were investigated using mass spectrometry approaches. Identification of the main oxidation and dimerization products were performed by peptide sequencing by nano-chromatography coupled to mass spectrometry (nLC-MS/MS). Singlet oxygen was generated using visible light and rose Bengal as photosensitizer, and from the decomposition of thermolabile endoperoxides DHPN $^{16}\text{O}_2$ e DHPN $^{18}\text{O}_2$, clean sources of $^1\text{O}_2$. Experimental findings showed oxidation of Met, His, and Trp residues in lysozyme. Structural characterization by nLC-MS/MS of the oxidative modifications in lysozyme tryptic peptides showed the addition of [^{18}O]-labeled atoms in different amino acid residues. Lysozyme has in its structure a single histidine residue (His 15). We identified shifts of +14 Da (described as oxo-histidine), +16 and +32 Da in this residue. Methionine residues (Met 12 and Met 105) were oxidized to sulfoxides (MetSO – mass shift of +16 Da). Modifications in tryptophan residues were identified as kynurenine (shift mass of +4 Da), +16 and + 32 Da. Oxidized lysozyme subjected to SDS-Page showed dimers formation. The main aim was to analyze cross-linking formation between 2-oxo-histidine residues in lysozyme. However, cross-links between 2-oxo-histidine and lysine residues, and cross-links between oxidized tryptophan residues have been identified. Following results obtained with the protein model, we evaluated oxidation and the dimers formation in proteins extracted from the lens of the bovine eye. Analysis performed in nLC-MS/MS and bioinformatics identified different types of modifications, including formation of dimers with histidine residues (2-oxo-His-His). The data provided evidence for simultaneous occurrence of protein cross-linking on exposure $^1\text{O}_2$. These results demonstrated the important role of $^1\text{O}_2$ in protein reactions beyond its involvement in developing of pathological conditions. In conclusion, dimerization of proteins through 2-oxo-His residues may be a possible new biomarker for $^1\text{O}_2$ in biological systems.

Keywords: Singlet molecular oxygen, protein oxidation, amino acids oxidation, isotopic labelling, mass spectrometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	primeiro estado excitado do oxigênio molecular (delta)
$^1\text{O}_2^2$	segundo estado excitado do oxigênio molecular (sigma)
^{16}O	isótopo 16 do átomo de oxigênio
^{18}O	isótopo 18 do átomo de oxigênio
D_2O	água deuterada
ERO	espécies reativas de oxigênio
ROS	reactive oxygen species
ERN	espécies reativas de nitrogênio
RNS	reactive nitrogen species
IRA	intermediários reativos de oxigênio
ROI	reactive oxygen intermediates
$\text{O}_2^{\cdot-}$	radicaíl superóxido
ONOO^-	peroxinonitrito
$\text{ROO}^{\cdot}$	radical peroxila
$\text{RO}^{\cdot}$	radical alcoxila
$\text{SQ}^{\cdot-}$	semiquinonas
ROOH	hidroperóxidos orgânicos
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	radical carbonato
HOCl	ácido hipocloroso
HOBr	ácido hipobromoso
HOI	ácido hipoiodoso
TOM	teoria do orbital molecular
sens	sensibilizador no estado fundamental
$^1\text{sens}^*$	sensibilizador no estado singlete
$^3\text{sens}^*$	sensibilizador no estado triplete
S	substrato
k_t	constante total de desativação
His	resíduo de histidina
Trp	resíduo de triptofano
Met	resíduo de metionina
Tyr	resíduo de tirosina
Cys	resíduo de cisteína
Lys	resíduo de lisina

MetSO	molécula de sulfóxido
C	carbono
FMK	<i>N</i> -formil-quinurenina
Kn	quinurenina
2-oxo-His	2-oxo-histidina
ESI	<i>Electrospray</i>
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization).
<i>m/z</i>	razão massa/carga
Q	quadrupolo
TOF	time of flight
3G	terceira geração
CID	collision induced dissociation
pH	potencial hidrogeniônico
pD	potencial deutériônico
UV	ultra violeta
RB	rosa bengala
DTT	ditiotreitól
ACN	acetonitrila
RF	radio frequency
B	solvente acetonitrila
MS/MS	mass spectrometric/ mass spectrometric
nLC	nano liquid chromatography
LC	liquid chromatography
UHR	ultra high resolution
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
MS	mass spectrometric / espectrometria de massa
Glu	resíduo de ácido glutâmico
Asp	resíduo de ácido aspártico
Val	resíduo de valina
Phe	resíduo de fenilalanina
2-oxo-His-Lys	ligação cruzada 2 oxo-histidina-lisina
2-oxo-His-Trp	ligação cruzada 2 oxo-histidina-triptofano
2-oxo-His-His	ligação cruzada 2 oxo-histidina-histidina
Trp[O]- Trp[O]	ligação cruzada triptofano oxidado-triptofano oxidado
NAG	<i>N</i> -acetilglicosamina

NAM	ácido <i>N</i> -acetilmurâmico
UV-vis	ultravioleta-visível
IgG1	anticorpo imunoglobina G
PDT	terapia fotodinâmica
HMN	1,4-dimetoxi-5,8-difenilnaftaleno
DHPN dipropanamida	<i>N,N'</i> - di(2,3-diidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)
DHPNO ₂	endoperóxido do <i>N,N'</i> - di(2,3-diidroxiopropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida

Sumário

1. Introdução.....	13
1.2. Atmosfera terrestre	13
1.2.1. Oxigênio molecular e espécies reativas de oxigênio.....	14
1.3. Oxigênio.....	15
1.4. Oxigênio molecular e estados singletes	17
1.5. Reações com o oxigênio singlete.....	18
1.6. Fontes geradoras de oxigênio singlete.....	19
1.7. Oxidações de proteínas por oxigênio singlete	21
1.7.1. Oxidação da tirosina pelo $^1\text{O}_2$	22
1.7.2. Oxidação da cisteína pelo $^1\text{O}_2$	23
1.7.3. Oxidação da metionina pelo $^1\text{O}_2$	24
1.7.4. Oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$	24
1.7.5. Oxidação da histidina pelo $^1\text{O}_2$	25
1.7. Caracterizações de proteínas e modificações por espectrometria de massas..	26
1.8.1. Fonte de ionização por Electrospray (ESI)	28
1.7.2. Analisadores do tipo Q-TOF	29
1.7.3. Analisadores do tipo tri-híbrido orbitrap.....	31
1.8. Identificação e sequenciamento de proteínas através de dissociação induzida por colisão (CID).....	33
1.9. Lisozima.....	36
2. Objetivo	38
3. Materiais e métodos.....	39
4. Resultados.....	51
4.1. Quantificação dos hidroperóxidos formados na reação entre a lisozima e $^1\text{O}_2$	51
4.2. Inibição da atividade enzimática da lisozima oxidada com $^1\text{O}_2$	53
4.3. Oxidação da lisozima.....	55
4.3.1. Análise por LC-MS da lisozima intacta	64
4.3.1.1. Foto-oxidação com RB	64
4.3.1.2. Oxidação com DHPN $^{16}\text{O}_2$ e DHPN $^{18}\text{O}_2$	65
4.3. Identificação e caracterização por nano-LC-ESI-MS/MS dos peptídeos oxidados	74
4.4. Identificação do cross-link e quantificação relativa por SDS-PAGE	91
4.5. Identificação e caracterização dos cross-links por nano-LC-ESI-MS/MS.....	93
4.6. Identificação e caracterização do cross-link 2-oxo-His-His e 2-oxo-His-Lys	95
4.7. Identificação e caracterização do cross-link 2-oxo-His-Trp e Trp[O]- Trp[O]-..	100
4.8. Quantificação relativa dos cross-links obtidos nas reações em diferentes condições de pH.....	105
4.9. Análise por LC-MS e SDS-PAGE das proteínas do olho bovino.....	107
4.10. Análise por nLC-MS/MS das proteínas do olho bovino	110
5. Discussão	117
6. Conclusões.....	138
7. Perspectivas.....	140
8. Referências	141
9. Apendice.....	155
Súmula curricular	171

1. Introdução

1.2. Atmosfera terrestre

O surgimento do planeta Terra é datado de aproximadamente 4,5 bilhões de anos. A atmosfera presente nos dias atuais é constituída em torno de 79% de nitrogênio (N_2), 21 % de oxigênio (O_2), 1 % de argônio (Ar), 0,04 % de gás carbônico (CO_2), e frações de diversos gases. A atmosfera atual difere da primitiva, em que se tinha basicamente grande concentração de vapores de água (H_2O), gás carbônico (CO_2) e azoto molecular (N_2), (Jardim, 2001).

A atmosfera terrestre desempenha a função vital de proteger o planeta Terra, atuando como uma camada responsável por absorver e filtrar a maior parte da radiação oriunda do espaço e das ondas eletromagnéticas emitidas pelo sol. Chega até a biosfera apenas radiações na faixa de comprimento de onda de 300 a 2500 nm, correspondentes à região do visível, ultravioleta, infravermelho e também ondas de rádio (Mozeto, 2001).

A eficiência da atmosfera em filtrar radiações com comprimentos menores que 300 nm é de supra importância na manutenção da vida terrestre; radiações abaixo desse valor podem destruir os tecidos vivos. Além disso, a atmosfera tem também o papel fundamental de manter o equilíbrio térmico do planeta.

O aparecimento da vida no planeta Terra teria ocorrido há aproximadamente 3,5 bilhões de anos; supõe-se que oceanos e continentes surgiram há cerca de 3,800 milhões de anos. Durante todo este período da história, o oxigênio ainda não existia na Terra e, conseqüentemente, nem a vida como a conhecemos nos tempos modernos.

O surgimento progressivo do oxigênio na atmosfera foi acontecendo devido a diferentes fatores primordiais: como a alta concentração de vapores de água na atmosfera. Estes vapores, ao receber radiação eletromagnética, tinham suas ligações rompidas e liberavam hidrogênio (H_2) e oxigênio (O_2). Porém neste estágio da sua formação, o oxigênio reagiu em totalidade com ferro e alguns outros metais, formando diferentes dióxidos.

Somente há cerca de 2100 a 3100 milhões de anos, o oxigênio começou a ser liberado para a atmosfera pela fotossíntese realizada por cianobactérias. O aparecimento de organismos autótrofos, que utilizam gás carbônico e água

para a produção de energia, liberando oxigênio no processo, foi decisivo para a atual porcentagem de oxigênio na atmosfera. Nos dias atuais, os organismos fotossintetizadores são responsáveis pela maior parte da formação e manutenção do oxigênio atmosférico.

A atmosfera terrestre é dividida em quatro principais regiões que são definidas de acordo com variações de temperatura e altitude. Estas camadas apresentam diferentes espécies de oxigênio em níveis moleculares e iônicos, que coexistem com outros gases em diferentes condições físicas (Figura 1).

Figura 1 Representação das principais camadas da atmosfera (adaptado de Manahan, 1984; Mozeto, 2001)

1.2. Oxigênio molecular e espécies reativas de oxigênio

O surgimento dos organismos aeróbicos levou ao desenvolvimento de um complexo grupo de organismos eucarióticos, em que, o oxigênio molecular é a molécula central no processo de respiração celular ocorrido nas

mitocôndrias. A maior parte do oxigênio é consumida, entretanto, uma pequena parte dele poderá dar origem a “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO ou ROS – do inglês: *Reactive Oxygen Species*). As ERO englobam espécies radicalares e não radicalares provenientes do O_2 .

Ao longo dos anos, foram introduzidos outros termos a ERO, tais como os “Intermediários Reativos de Oxigênio” (IRA ou ROI – do inglês: *Reactive Oxygen Intermediates*) e as “Espécies Reativas de Nitrogênio” (ERN ou RNS – do inglês: *Reactive Nitrogen Species*) para definir uma classe emergente de moléculas endógenas, altamente reativas, contendo oxigênio. ERO compreende as espécies químicas formadas pela redução incompleta do oxigênio molecular, levando à formação dos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto que IRA incluem também ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2). Dentre os compostos contendo nitrogênio, os ERN incluem o óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot}$), nitrito (NO_2^-) e peroxinonitrito ($ONOO^-$) (Krumova e Cosa, 2016). Além disso, dentre os ERO são incorporados os radicais peroxila ($ROO^{\cdot}$), alcóxila ($RO^{\cdot}$), semiquinonas ($SQ^{\cdot-}$), hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$) e radical carbonato ($CO_3^{\cdot-}$). Também são incluídas espécies reativas contendo halogênios, tais como os ácidos hipocloroso ($HOCl$), hipobromoso ($HOBr$) e hipoiodoso (HOI). Na Figura 2 estão apresentadas as diversas espécies reativas formadas a partir do oxigênio molecular.

Figura 2 Formação de diferentes ERO por transferências de energia e elétrons.

1.3. Oxigênio

O oxigênio é o terceiro elemento químico mais abundante no planeta Terra, depois do hidrogênio e do hélio. Sua descoberta é datada do século XVIII; apresenta-se como uma das mais importantes descobertas dentro da

química nos últimos séculos (Maar, 2008). Entre os historiadores, existe uma divergência em relação a sua descoberta; alguns atribuem o feito a Joseph Priestley (1733-1804) em 1774; porém outros o concedem a Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) em 1771. Relatos científicos demonstram que a descoberta do oxigênio foi realizada separadamente e sem conhecimentos de ambos. Desta forma, consideram a descoberta do oxigênio aos dois pesquisadores, Scheele e Priestley.

Lavoisier é outro nome importante para a descoberta do oxigênio. Conhecido como o pai da Química Moderna, publicou em 1789 o livro conhecido como: *“Tratado elementar de química”*. Ele não foi o responsável pela sua descoberta, mas foi quem melhor compreendeu e sistematizou as reações envolvidas em processos de calcinação e de combustão.

O cientista Francês reproduziu e ampliou os experimentos realizados por Scheele e Priestley. Buscou elaborar uma nova teoria que substituísse o flogístico – teoria que preconizava que os corpos possuíam uma matéria denominada de “flogisto”, que seria absorvida pelas plantas e liberada ao ar durante os processos de combustão ou calcinação. A palavra “Flogisto” é derivada do grego e significa “inflamável” ou “queimado”. O experimento realizado por Lavoisier, para entender e conflitar as explicações dadas por Scheele e Priestley consistiu de um esquema, em que um globo contendo mercúrio elementar e ar foi conectado à um frasco invertido imerso em água. Ao aquecer o mercúrio contido no globo, observou-se a formação de um composto avermelhado sobre o metal. Ao mesmo tempo, o nível da água no frasco subiu e o volume do ar dentro do frasco invertido diminuiu. Lavoisier concluiu que houve incorporação do ar no novo composto formado com o mercúrio metálico, ocorrendo “uma combinação” e a geração do mercúrio “calcinado”. Assim como Priestley, Lavoisier, ao medir o volume de ar consumido no processo, chegou ao valor de cerca de 1/5 do ar total presente no recipiente.

A explicação descrita por Lavoisier para o processo foi de que um quinto do gás se combinou com o mercúrio, formando o “mercúrio calcinado” em um processo reversível. Ele nomeou esse gás de “oxigênio”.

Porém apenas em 1929, o oxigênio foi descoberto pelos pesquisadores Giauque e Johnston como um elemento com três isótopos de pesos atômicos

16, 17 e 18 (Giauque e Johnston, 1929). Os isótopos de oxigênio, com suas abundâncias relativas e pesos atômicos, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Peso atômico e porcentagens no ar, dos isótopos do oxigênio molecular.

Isótopo	Peso atômico	Porcentagem no ar
^{16}O	15,99555	99,7587
^{17}O	16,99977	0,0374
^{18}O	17,99980	0,2039

Adaptado de Dole, 1952

1.4. Oxigênio molecular e estados singletes

O oxigênio molecular é um gás incolor e inodoro formado por dois átomos de oxigênio. Nesta molécula os elétrons se encontram no estado fundamental, no estado triplete ($^3\Sigma_g^-$), com elétrons desemparelhados, cada um, ocupando orbitais moleculares degenerados antiligantes. Dada sua característica eletrônica, a redução direta do oxigênio por dois elétrons não é permitida, devido à regra de conservação do spin. Entretanto, um ascrécimo de energia leva a formação de espécies excitadas, denominadas de estados excitados singletes ($^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^-$) que apresentam a perda da restrição da regra de conservação do spin. Sendo assim, o poder oxidante do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é muito maior que o oxigênio do estado fundamental.

O oxigênio singlete corresponde a uma espécie eletronicamente excitada do oxigênio molecular, foi observada pela primeira vez em 1924, sendo definida como a forma mais reativa do oxigênio molecular.

A teoria do orbital molecular (TOM) explica a estrutura eletrônica do oxigênio molecular. No estado fundamental - estado eletrônico de menor energia - é conhecido como estado triplete ($^3\Sigma_g^+$) com dois elétrons desemparelhados com spin paralelos, ocupados em dois orbitais π de mesma energia, denominados de orbitais degenerados. Os rearranjos ocorridos entre os elétrons e seus momentos de spins nestes orbitais degenerados resultam em dois novos estados excitados (Figura 3), os estados excitados singletes ($^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^-$).

O primeiro estado excitado singlete ($^1\Delta_g$) apresenta ambos elétrons emparelhados no mesmo orbital, segundo a regra de exclusão de Pauli, com spins opostos. Apresenta-se com uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida de aproximadamente 10^{-6} s. O segundo estado excitado ($^1\Sigma_g^+$) possui energia de 37,5 kcal em relação ao estado fundamental; é formado por dois elétrons em orbitais π degenerados, com spins opostos e um tempo de meia vida muito curto, de aproximadamente 10^{-11} s, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$.

Figura 3. Distribuição eletrônica do oxigênio no estado fundamental e estados singletes.

1.5. Reações com o oxigênio singlete

O $^1\text{O}_2$ é uma espécie reativa com caráter eletrofílico e reage com compostos que sejam ricos em elétrons, tais como compostos aromáticos, fenóis, sulfetos, aminas, olefinas monos e poli insaturadas. Dentre as reações químicas que envolvem o $^1\text{O}_2$ (Figura 4) há três principais: cicloadição do tipo [4+2], cicloadição do tipo [2+2] e Reações do tipo “ene” (Prein e Adan, 1996).

Figura 4. Representação esquemática das principais reações do oxigênio singleto. (a) Cicloadição do tipo [4+2]: com a formação de endoperóxidos; (b) cicloadição do tipo [2+2]: com a formação de dioxetanos; (c) reações do tipo "ene": com a formação de hidroperóxidos.

1.6. Fontes geradoras de oxigênio singleto

A geração de $^1\text{O}_2$ pode ser obtida através de diferentes tipos de reações de fotossensibilização. O envolvimento do $^1\text{O}_2$ em reações de fotossensibilizadores foi sugerido em 1939 por Kaustsky, em estudos com sílica-gel, entretanto, somente na década de 60 foi realmente aceito o envolvimento do $^1\text{O}_2$ em processos de foto-oxidação.

O processo de fotossensibilização ocorre quando estão presentes, um sensibilizador, luz e oxigênio. A fotossensibilização se inicia através da absorção de um fóton de luz pelo sensibilizador no estado fundamental (sens), que se elevará ao estado singleto ($^1\text{sens}^*$), seguido de transferência de energia levando o sensibilizador ao estado tripleto ($^3\text{sens}^*$). Uma vez formado o $^3\text{sens}^*$, ele poderá decair ao estado fundamental, acompanhado de fosforescência ou ainda reagir, através de duas possibilidades, descritas como mecanismo do tipo I e II. No mecanismo do tipo I, o $^3\text{sens}^*$ poderá reagir com o substrato ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por meio de transferência de elétrons ou hidrogênio, levando a formação de espécies radicalares. No mecanismo do tipo II o $^3\text{sen}^*$ transfere a energia ao oxigênio no estado

fundamental levando a formação do oxigênio no estado singlete, que estão reagirá com o substrato (S), formando o produto SO_2 (Figura 5).

Figura 5 Representação esquemática de fotossensibilização para os mecanismos do tipo I e II.

Em meio biológico, a geração de $^1\text{O}_2$ pode ser dar por diversos fotossensibilizadores endógenos, tais como flavinas, porfirinas, clorofila, retinal, bilirrubina, ácido urocânico e esteroides, por absorção de luz UVA (Baier *et al.*, 2006). Além disso, $^1\text{O}_2$ pode ser gerado por reações sem a presença de luz, mediado por diferentes enzimas, como as peroxidases. Também são descritas a partir de peróxido de hidrogênio e hipoclorito, na fagocitose, ânion superóxido, ozônio, peroxinitrito, e carbonilas excitadas. No Figura 6 está sumarizado as principais vias de formação de $^1\text{O}_2$ (Miyamoto *et al.*, 2014) em meio biológico.

Figura 6 Descrição das principais reações bioquímicas que envolvem a produção de $^1\text{O}_2$ (Adaptado de Miyamoto *et al.*, 2014).

Em laboratório, o $^1\text{O}_2$ pode ser gerado pela termólise de endoperóxidos, derivados do anel naftalênico. Essa metodologia é altamente apropriada pois é uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$ (Di Mascio e Sies, 1989). Os endoperóxidos são moléculas quimicamente inertes e podem também ser utilizadas em sistemas biológicos, desde que sejam hidrossolúveis. Na Figura 7 são apresentados derivados de naftaleno com diferentes substituintes hidrofílicos.

Figura 7 Termodecomposição de endoperóxido derivados de naftaleno com diferentes grupos hidrofílicos (R).

1.7. Oxidações de proteínas por oxigênio singlete

Os alvos biológicos para o $^1\text{O}_2$ envolvem diferentes biomoléculas, entretanto o alvo principal de oxidação são as proteínas por encontrarem-se em altas concentrações nos organismos (Davies, 2004). As proteínas apresentam altos valores de constante total de desativação com $^1\text{O}_2$ (k_t , $\sim 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) em relação a outras biomoléculas, tais como, lipídeos (k_t , $\sim 10^4 \text{ mol}^{-1}$

s⁻¹) e bases (k_t , $\sim 10^4 - 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Monroe, 1985; Wilkinson et al., 1995; Feitelson 1994)

A oxidação de proteínas pelo oxigênio singlete tem sido investigada utilizando diferentes fotossensibilizadores (Redmond e Gamlin, 1990; Kim *et al.*, 2008); Triquigneaux *et al.*, 2012). O $^1\text{O}_2$ reage efetivamente em pH fisiológico com os resíduos de histidina, triptofano, metionina, tirosina, cisteína e cistina (Davies, 2003). Por exemplo, em pH 7.1 as constantes de desativação com o $^1\text{O}_2$ (k_t) são: His $3,2 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Trp $3,2 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Met $1,6 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Tyr $0,8 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 3 Cys $0,9 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Monroe, 1985).

Os efeitos biológicos do $^1\text{O}_2$ demonstram que sua geração (em sistemas biológicos) está envolvida em mecanismo de defesas em processos de fagocitose envolvendo vírus e bactérias (Steinbeck et al., 1992). Também foram descritos o envolvimento do $^1\text{O}_2$ em sinalização celular. O $^1\text{O}_2$ tem sido extensamente utilizado em terapia fotodinâmica, no tratamento de câncer e doenças de pele. Entretanto, a reatividade do $^1\text{O}_2$ aos aminos ácidos reativos demonstram que a formação de hidroperóxidos e outras espécies, decorrentes de produtos de degradação, levam a diversos efeitos deletérios a proteínas, tais como inativação de enzimas, alterações de estruturas proteicas e fragmentações, formação de agregados e ligações cruzadas (Davies, 2003). Estudos demonstram que o $^1\text{O}_2$ está envolvido na formação de ligações cruzadas em colágeno da pele (Tamura e Ishikawa, 2001; Au e Madison, 2000), na formação de agregados em proteínas de lentes humanas dos cristalinos (Renston *et al.*, 1980; Guptasarma *et al.*, 1992), além de correlação com a formação de catarata (Balasubramanian et al., 1990; Wang e Wu 2008). A geração de ligações cruzadas em cristalinos, presentes nas lentes dos olhos, está correlacionada com modificações oxidativas que levam à agregação, altos pesos moleculares proteicos, opacidade das lentes e insolubilidade (Balasubramanian et al., 1990).

1.7.1. Oxidação da tirosina pelo $^1\text{O}_2$

A tirosina reage com o $^1\text{O}_2$ dando origem a um intermediário endoperóxido **1** através de uma cicloadição [4+2]. A reação com o aminoácido livre leva a formação de inúmeras espécies, sumarizadas na Figura 8. A

abertura do anel do endoperóxido forma um hidroperóxido **2** em C1. Com os aminos ácido livres, é possível um rápido fechamento do anel via reação do tipo Michael, resultando no composto 3 α -hidroperoxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexahydro-1H-indol-2-ácido carboxílico **3**. A redução do composto **3** poderá formar o composto **4**, que adicionalmente pode ser oxidado para um composto ceto descarboxilado **5** em condições básicas (Wright et al., 2002).

Figura 8 Reação do resíduo de tirosina com $^1\text{O}_2$

1.7.2. Oxidação da cisteína pelo $^1\text{O}_2$.

A reação da cisteína pelo $^1\text{O}_2$ é postulada ocorrer através de uma espécie zwitterionica **1** (RS^+-OO^-), e posterior, formação de cistina **2**, tiosulfonato **3** e diferentes oxiácidos, sulfóxido **4**, sulfênico **5**, sulfínico **6** e sulfônico **7** (Straight *et al.*, 1985; Murray e Jindal, 1975; Foote e Peters 1971; Rougee *et al.*, 1988), descritos na Figura 9.

Figura 9 Oxidação do resíduo de cisteína pelo $^1\text{O}_2$

1.7.3. Oxidação da metionina pelo $^1\text{O}_2$.

A reação de foto-oxidação dos resíduos da metionina é dependente do pH. Propõe-se que a oxidação ocorra através da formação de uma espécie zwitterionica **1** ($\text{R}_2\text{S}^+-\text{OO}^-$) em $\text{pH} \leq 6$, reagindo com uma segunda molécula de metionina para formar duas moléculas de sulfóxido **2** (MetSO). Em pH básico ($\text{pH} \geq 9$), a presença de íons hidroxila ($\cdot\text{OH}$) ataca o átomo de enxofre acarretando uma substituição do sulfóxido formado, resultando na formação de sulfóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma proporção de 1:1. Além disso, intermediários cíclicos estáveis que envolvem o grupo α -amino e o átomo do enxofre do tioéster, com posterior hidrólise e formação de uma razão 1:1 de MetSO e H_2O_2 tem sido reportado (Straight e Spikes, 1985), esse intermediário cíclico é formado quando $7 \leq \text{pH} \leq 12$ e denominado como deidrometionina **3** (Pattison *et al.*, 2012). Os produtos formados nas diferentes condições de pH estão descritos na Figura 10.

Figura 10 Reação do resíduo de metionina com $^1\text{O}_2$.

1.7.4. Oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$.

O triptofano reage com o $^1\text{O}_2$ através de uma reação de adição [2+2] (Figura 11), os produtos formados são um intermediário dioxetano **1** nos carbonos C-2-C3 da ligação dupla do anel indólico e um um hidroperóxido na

posição C-3 **2**, após uma reação do tipo Alder-ene. A redução dos hidroperóxidos formam a 3-hidroxi-pirrol-indólico **3**. As decomposições desses intermediários formam a *N*-formil-quinurenina (FMK) **4**. A hidrólise da FMK origina a quinurenina (Kn) **5**. Com o amino-ácido livre é possível a ciclização e formação de 3 α -hidroperóxido-hexahidro-pirrol-indólico **6**, e o produto reduzido 3 α -hidroxipirrolindólico **7** (Nakagawa et al., 1977; Saito et al., 1977; Gracanin et al., 2009).

Figura 11 Reação do resíduo de triptofano com $^1\text{O}_2$.

1.7.5. Oxidação da histidina pelo $^1\text{O}_2$.

A oxidação do resíduo de histidina pelo $^1\text{O}_2$ em solução ocorre via um mecanismo de cicloadição do tipo 1,4 (Figura 12) e a formação inicial de um ou mais endoperóxidos **1** e **2** (Agon *et al.*, 2006; Tomita *et al.*, 1969). Estes intermediários formam imidazolonas pela clivagem da ligação O-O, convergindo em intermediários peróxidos **3**, **4** e **5**, 2-oxo-histidina **6** (2-oxo-His) e intermediários de His com incrementos de massas com +32 Da **7** e **8**. Em altas temperaturas os endoperóxidos se decompõem rapidamente e formam diversos produtos, que incluem ácido aspártico **9**, asparagina **10** e úreia **11** (Kai e Suzuki, 1996; Tomita *et al.*, 1968). Em solução aquosa o aminoácido livre

forma um produto bicíclico **12** após um ataque nucleofílico do α -amino ao anel imidazol oxidado. Os derivados de His oxidados podem sofrer reações adicionais e resultar na formação de dímeros de His-His **13** e His-Lys **14** após uma adição nucleofílica de um aminoácido não oxidado de His ou Lys a uma His oxidada (Agon *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000).

Figura 12 Reação do resíduo de histidina com $^1\text{O}_2$.

1.7. Caracterizações de proteínas e modificações por espectrometria de massas

As proteínas representam o grupo de macromoléculas mais abundantes em nosso organismo com funções altamente complexas e definidas. Sua complexidade é decorrente dos diferentes tipos de aminoácidos, às vezes modificados, e também dos diferentes tipos de tamanhos. Essas abrangentes possibilidades, levam as proteínas a um patamar, em que adquirem diferentes estruturas e funções em nosso organismo, podendo essas macromoléculas atuarem no mecanismo de catálise, transporte, defesa, construção,

entre outras. As proteínas possuem uma função estabelecida de acordo com sua estrutura, de forma que a perda da estrutura proteica levará a perda da sua função.

Na década de 50, Linderstrom-Lang e Schellman propuseram quatro níveis de organização para as proteínas baseados na complexidade. Nos dias atuais, as proteínas podem ser caracterizadas por diversas técnicas espectrofotométricas, cristalográficas e por ressonância magnética nuclear, entretanto, quando nos referimos a modificações nas proteínas, sejam elas modificações pós-traducionais ou modificações ocasionadas por algum agente químico, a caracterização dessas modificações tem sido realizada através de espectrometria de massas.

O grande avanço iniciou-se na década de 80 com o desenvolvimento das técnicas de ionização de proteínas, descritas como ESI (*Electrospray*) e MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization). Acoplado a isso, tivemos o desenvolvimento de diferentes analisadores de massas e das tecnologias de nano cromatografia que levaram a espectrometria de massas a um patamar nunca descrito anteriormente.

Atualmente, os avanços tecnológicos de separação e identificação agregam dentro da espectrometria de massas diferentes métodos que viabilizam a identificação de quantidades mínimas de amostras que variam de femtomole a picomol, com equipamentos chegando a atomol.

O avanço na sensibilidade dos equipamentos representa uma vantagem altamente relevante na identificação de proteínas em amostras complexas baseadas em metodologia “*bottom up*”, mas sabe-se que um dos grandes desafios é na verdade a identificação de modificações em proteínas, haja visto que em sua maioria, elas se encontram em proporções bem inferiores. As altas sensibilidades descritas nos equipamentos nos últimos anos têm contribuído, em muito, para a identificação de peptídeos modificados em meio biológicos ou por rotas químicas *in vitro*, que juntamente com técnicas de separação, concentração e enriquecimento de amostras contribuíram para as metodologias e estudos na busca de modificações de proteínas.

1.8.1. Fonte de ionização por Electrospray (ESI)

A ionização por *electrospray*, comumente descrita por ESI (*Electrospray ionization*), tornou-se uma das principais técnicas de ionização *on-line* acoplados a métodos líquidos de separação, tendo a função de ionizar e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa.

A ESI utiliza-se de energia elétrica para levar íons em solução ao estado gasoso antes de serem introduzidos ao espectrômetro de massas. A ionização por ESI pode ser dividida em três etapas: a nebulização de amostra líquida em gotas eletricamente carregadas, liberação dos íons formados nas gotas e transporte desses íons em fase gasosa formados em pressão atmosférica para dentro do espectrômetro de massas em alto vácuo.

O mecanismo de formação de íons por ESI está descrito na Figura 13. O analito em solução passa através de um capilar metálico mantido em alta voltagem (tipicamente 2 a 5 kV). Na ponta do capilar é formado um spray, descrito como cone de Taylor, que levará a formação de gotículas multicarregadas com a mesma polaridade da voltagem gerada no capilar. A aplicação de um gás de nebulização (nitrogênio) é inserida em torno da eluição levando a um aumento da razão do fluxo de eluição. Com o auxílio de uma temperatura elevada, juntamente com a corrente contínua de gás nitrogênio, as gotículas vão continuamente sendo reduzidas em tamanhos cada vez menores devido a evaporação do solvente. A redução das gotas levará a um aumento da densidade das cargas internas e diminuição do raio das gotículas. Finalmente, a força do campo elétrico dentro da gota carregada atinge um ponto crítico, fazendo com que haja uma repulsão eletrostática entre as espécies carregadas, e assim, íons na superfície das gotículas são ejetados ou explosões coulômbicas sucessivas ocorrem e levam a formação de um único íon para a fase gasosa. Os íons então são acelerados para dentro do espectrômetro de massas.

Figura 13 Esquema detalhado do modo de ionização por *Electrospray*

Em 1994, Wilm e Mann introduziram um novo conceito dentro da ionização por ESI: a técnica de *nanospray*. O processo de ionização é basicamente o mesmo que o ESI convencional que opera com fluxos de $\mu\text{L}/\text{min}$, entretando na nano-ESI utiliza-se capilares bem finos, formação de gotículas bem menores em fluxos de nL/min . A ionização por nano-ESI leva a identificação de sinais com intensidades iguais ou até mais altos que o ESI convencional.

1.7.2. Analisadores do tipo Q-TOF

A geração dos íons em fase gasosa é encaminhada aos analisadores de massas para serem separados, de acordo com as propriedades físicas dos íons, que são mensurados pelo analisador, conforme a razão massa e carga (m/z).

Os analisadores híbridos do tipo Q-TOF combinam a estabilidade da trajetória da m/z com a sua velocidade de vôo, permitindo a obtenção do espectro de massas do íon selecionado no primeiro analisador, que posteriormente é detectado no segundo analisador dependente dos seus tempos de trajetória. Na Figura 14 está representado o esquema para o Q-TOF da Bruker Maxis 3G.

Figura 14 Esquema representativo de um equipamento com analisador do tipo Q-TOF. Representa a distribuição das diferentes partes do equipamento UHR-ESI-Q-TOF da Bruker Maxis 3G. Os íons são gerados na fonte de ionização, encaminhados para dentro de espectrômetro, passam pelo quadrupolo e introduzidos dentro do TOF. No segundo analisador são separados de acordo com sua m/z e então, chegam ao detector. Modificado do manual do usuário BrukerDaltonics.

Os quadrupolos funcionam a partir da combinação da estabilidade da trajetória dos íons oscilando entre quatro tubos de seção circular ou elíptica em um campo elétrico alternado para separar os íons de acordo com a m/z . Os íons viajam pelo eixo z influenciado por um campo elétrico alternado. Enquanto que, os analisadores do tipo TOF separam os íons por tempo de voo, de acordo com suas velocidades, quando submetidos em uma região linear em constante vácuo.

No TOF os íons são acelerados até o tubo com a mesma energia cinética, entretanto como possuem diferentes valores de m/z apresentam velocidades distintas de trajeto até a outra extremidade do tubo, aonde se encontrará o detector. Íons de baixos valores de m/z chegam ao detector

antes que íons de m/z com valores maiores, pois possuem menores velocidades. A energia cinética ($\frac{1}{2}mv^2$) adquirida pelo íon é igual a energia potencial (zeV) disponível no campo elétrico entre as placas de aceleração:

$$zeV = (\frac{1}{2}mv^2) \quad \text{Equação 1}$$

Resolvendo a Equação 1 em função de v temos:

$$v = (2 \text{ zeV} / m)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 2}$$

A equação 2 apresenta uma relação quadrática inversa entre a v e m/z . Em termos diretos, é impraticável medir a velocidade do íon, assim o tempo de voo (*tof – time of light*) dos íons entre a fonte de ionização e o detector na outra extremidade, são separados através de uma distância L , dessa forma temos;

$$tof = L / v = L (2 \text{ zeV} / m)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 3}$$

1.7.3. Analisadores do tipo tri-híbrido orbitrap

O orbitrap é um analisador de massas de alta resolução desenvolvido por Alexandor Makarov e lançado no ano de 2005. Utiliza-se de um campo elétrico estático para sustentar o aprisionamento dos íons após um pulso de injeção dinâmico. O analisador consiste de dois eletrodos em forma coaxial axissimétrico, uma superfície externa em forma de barril com raio máximo R_2 e um eletrodo interno fusiforme central ao longo do eixo de raio R_1 como descrito na Figura 15. O eletrodo externo é mantido neutro, enquanto que o eletrodo central é mantido com uma corrente fixa. Os íons oscilam ao longo e ao redor do eletrodo em forma de espiral.

Figura 15 Representação esquemática do analisador Orbitrap.

No orbitrap os íons são aprisionados eletrostaticamente em torno do eletrodo central com oscilações harmônicas com a utilização de corrente direta (DC = 3.5 kV), sem a presença de radiofrequência ou campo magnético. A frequência de oscilação ω axiais harmônicas ao longo do eixo Z é dependente apenas da m/z e da sua constante instrumental k , descrita na equação 3. Os íons são inseridos dentro do analisador de massas e a detecção é realizada após tratamento a partir de transformada de Fourier (FT)

$$\omega = \sqrt{k / (m/z)} \quad \text{Equação 4}$$

Em 2013 foi descrito um novo tipo de espectrômetro de massas, um tri-híbrido, que combina os analisadores de massas do tipo quadrupolo, ion trap linear, juntamente com a tecnologia do orbitrap (Figura 16). Esta nova engenharia e configuração permite uma separação do íon espacial e temporal, isolamento, fragmentação e detecção, de forma que haja um aumento nas razões de detecção para os experimentos de MS/MS, e consequentemente, tem-se um notável aumento na detecção dos peptídeos. Tem sido altamente aplicada nas ciências ômicas, com ênfase para a proteômica.

Figura 16 Espectrômetro de massas híbrido do tipo orbitrap. Adpatado de Senko et al., 2013

1.8. Identificação e sequenciamento de proteínas através de dissociação induzida por colisão (CID)

A identificação e sequenciamento de proteínas é realizada através de espectrometria de massas e comumente baseada na fragmentação dos peptídeos. Existem diferentes processos para a realização da fragmentação dos peptídeos, entretanto, esse processo é rotineiramente realizado através de dissociação induzida por colisão (CID – do inglês: *collision induced dissociation*).

O processo por CID consiste da introdução dos peptídeos ionizados em uma região de vácuo do espectrômetro de massas, preenchida com um gás inerte (geralmente hélio, nitrogênio ou argônio). Os íons sofrerão colisões com as moléculas do gás inerte. Como resultado das colisões, a energia cinética gerada é convertida em energia interna, que é então, distribuída para as ligações dos íons e ocorre a fragmentação. O processo está descrito na Figura 17.

Figura 17 Processo de dissociação induzida por colisão (CID).

A fragmentação e formação dos íons em um peptídeo foi proposta por Wysocki *et al.*, 2000 através do modelo da mobilidade do próton. Descreve como a energia interna adquirida induz a transferência intermolecular dos prótons em cada peptídeo protonado, levando na desestabilização das ligações, e consequentemente, induzindo a formação dos dois íons fragmentos. Roespstorff-Fohlmann-Biemann propuseram uma nomenclatura para a formação das duas series de fragmentos formados na fragmentação dos peptídeos, correspondentes a três pares de íons que retêm a carga residual de próton: uma série do lado *N*-terminal, levando a formação dos íons **-a**, **-b** e **-c**; e íons do lado C-terminal **-x**, **-y** e **-z**. Os pares **a/x**, **b/y** e **c/z** são sempre íons correspondentes aos fragmentos opostos e complementares entre si. Os pares de íons **b/y**, correspondentes a quebra da ligação peptídica, por serem as mais lábeis são os íons mais facilmente gerados após fragmentação por CID (Figura 18).

Figura 18 (a) Modelo mecanístico de fragmentação de um peptídeo protonado por CID, seguindo o modelo da mobilidade do próton; (b) Estrutura geral de peptídeo e nomenclatura segundo Roespstorff-Fohlmann-Biemann; (c) peptídeo genérico e enumeração da série **-b** e **-y** a partir do lado *N*-terminal.

A fragmentação e a identificação dos peptídeos representam um conjunto de íons, que levam ao sequenciamento do peptídeo, similarmente a um quebra cabeça linear, podendo ser realizado manualmente, através das diferenças entre aminoácidos, que diferem pelo substituinte R, ou mais comumente, utiliza-se programas para a realização de comparação entre as fragmentações teóricas e os íons obtidos no espectro real.

1.9. Lisozima

A lisozima é um componente importante do sistema imunológico inato que ajuda a combater a infecção por agentes patogênicos bacterianos e vírus. Essa enzima, contribui na vigilância das membranas de células de mamíferos, fortificação da atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos e secreção por leucócitos polimorfonucleares (Gao *et al.*, 2017). São encontradas em uma ampla variedade de tecidos e secreções, tais como, lágrimas, leite, saliva e soro, assim como em diferentes outros vertebrados e invertebrados, além disso, em bactérias, plantas e fagos (Sherman *et al.*, 1952).

A lisozima de gema de ovo de galinha (hen egg-white lysozyme), também conhecida como lisozima do tipo-c, é uma molécula relativamente pequena e consiste de um polipetídeo unitário com 129 resíduos de aminoácidos (Figura 19). Trata-se de uma proteína básica com uma fórmula molecular de 14.300 Da e um ponto isoeletrico de 10.7. A enzima apresenta quatro pontes de dissulfetos entre os resíduos 64-80, 76-94, 6-127 e 30-115. A enzima tem aproximadamente a forma de um esteróide com uma fenda profunda em um dos seus lados, que representa o seu sítio ativo. Sua cadeia polipeptídica é dobrada sobre si mesma com os primeiros 40 resíduos de aminoácidos da extremidade *N*-terminal formando um compacto domínio globular, caracterizado por um núcleo hidrofóbico preso entre duas α -hélices com os resíduos 4-15 e 24-35. Um segundo domínio ainda mais hidrofóbico é formado entre os resíduos 40-85, caracterizado em parte por uma folha beta pregueada, uma superfície que se projeta na direção da superfície, enquanto que as outras linhas se projetam de um lado da fenda lateral do sítio ativo (Blake *et. al.*, 1978).

	10		20		30		40
KUFGR	CELA	AMKR	GLDNY	RGYSL	GNWUC	AAKFE	SNFNT
	50		60		70		80
QATNR	NTDGS	IDYGI	LQINS	RWWCN	DGRTP	GSRNL	CNIPC
	90		100		110		120
SALLS	SDITA	SUNCA	KKIUS	DGNGM	NAWUA	WRNRC	KGTDU
QAWIR	GCRL

Figura 19 Sequência primária e estrutura terciária da lisozima com 129 amino ácidos. Estrutura baixada no *Protein base data* (PDB) e processada no programa *Pymol*.

2. Objetivo

O oxigênio molecular singlete é descrito como uma molécula altamente eletrofílica e reage com diferentes biomoléculas acarretando uma série de lesões com implicações biológicas. As proteínas representam um dos principais alvos de oxidação, pois são encontradas em altas concentrações nos organismos. O estudo dos mecanismos de danos em biomoléculas induzidos por $^1\text{O}_2$ é altamente relevante para a elucidação do envolvimento desta espécie reativa em sistemas biológicos.

Neste contexto, em virtude do potencial papel da oxidação do $^1\text{O}_2$, principalmente, frente aos aminoácidos de histidina, triptofano e tirosina, este trabalho teve como objetivo a utilização de espectrometria de massas e marcação isotópica, utilizando isótopos de ^{16}O e ^{18}O no estudo da oxidação destes aminos ácidos em uma proteína modelo, a lisozima. Foi também objetivo do trabalho a identificação e caracterização de possível dímeros de proteínas induzidos por reação com $^1\text{O}_2$.

3. Materiais e métodos

Químicos. Todos os reagentes químicos utilizados foram grau P.A ou superior. Lisozima, óxido de deutério (D_2O), xilenol orange, tris base, rosa bengala, ditioneitol (DTT), docecil sulfato de sódio (SDS), glicerol, bromofenol blue, acrilamida, persulfato de amônio, iodoacetamida, hidrocloreto de guanidina, cloreto de cálcio, fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), bicarbonato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ácido fórmico e sulfato de ferro heptahidratado foram adquiridos da Merck. Peróxido de hidrogênio foi obtido da Peróxidos do Brasil. Os solventes acetonitrila e metanol foram comprados da J.T. Baker. A enzima tripsina (Trypsin gold – mass spectrometry grade) foi adquirida da Promega.

Síntese e purificação do DHPN, $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$. Os endoperoxidos de naftalenos foram sintetizados e purificados pela Dra. Alessandra C. Scalfo de acordo com o descrito por Martinez *et. al.*, 2000. A síntese do $DHPN^{18}O_2$ foi realizada utilizando-se DHPN (200 mg) em um balão de fundo redondo de 50 mL, 3 mL de água deuterada, 30 μ L de uma solução de azul de metileno (5 mg/mL). A solução foi levemente aquecida, e em seguida, resfriada em nitrogênio líquido. Com o auxílio de uma bomba de vácuo, o ar foi retirado de toda a solução reacional. O balão foi conectado a um cilindro de gás contendo oxigênio enriquecido com isótopo de oxigênio-18. A solução foi irradiada por uma lâmpada de 500 W sob pressão de 1,4 Bar de $^{18}O_2$ em banho de gelo a 4 °C por 4,5 h. Em sequência, o sistema foi aberto e acrescentou-se a resina Chelex® 100 suficientes para total absorção do azul de metileno. A solução foi agitada por 10 min a 4 °C, e em sequência, filtrada em membrana polimérica (0.45 μ m) e estocada a -80 °C.

Determinação da concentração dos endoperoxidos $DHPN^{16}O_2$ e $DHPN^{18}O_2$. A concentração dos endoperoxidos foi determinada através de espectrometria na região do UV. Mediu-se a absorbância da solução inicial em 288 nm, e em seguida, a solução foi incubada a 50 °C por duas horas e mediu-se novamente a absorbância em 288 nm.

Quantificação dos hidroperóxidos. Alíquotas da proteína oxidada por $^{16}[^1\text{O}_2]$ foram removidas em diferentes pontos reacionais e a concentração dos hidroperóxidos foram medidas através do método FOX. O método FOX consiste em: 50 μL de 5 mM de xilenol orange, 50 μL de 5 mM FeSO_4 em 0.25 M H_2SO_4 e 20 μL de amostra para um volume final de 1 mL. As amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e ausência de luz. A absorbância em 560 nm foi medida no espectrofotômetro da Shimadzu UV-vis 1800. Os valores de absorbâncias foram convertidos para concentração de H_2O_2 equivalente a partir de uma curva padrão obtida com H_2O_2 comercial (Gay *et. al.*, 1999).

Oxidação da lisozima pelo $^1\text{O}_2$.

Foto-oxidação em presença de rosa bengala. A lisozima foi foto-oxidada utilizando-se rosa bengala (20 μM) como fotossensibilizador. As amostras (70 μM) foram dissolvidas em tampão fostato, D_2O , pD = 7,8 e irradiadas com lâmpada de tungstênio (500 W) sem e com corte de filtro de 395 nm. A irradiação foi realizada em diferentes tempos (5, 15, 30, 45, 60 e 90 min) em um banho a 4°C com fluxo constante de oxigênio (0.25 atm). A rosa bengala foi removida utilizando-se o filtro da Acrodisc Syringe Filter (Pall Gelman, Ann Arbor, MI) com 0,2 μm . Foram realizadas três oxidações distintas para cada condição.

Oxidação em presença de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. A oxidação química da lisozima (70 μM , tampão fostato, D_2O , pD = 7.8) foi realizada a partir da termólise do endoperóxido $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ a 37 e 50 °C por 60 minutos. A termólise do $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ foi realizada em atmosfera de argônio. A concentração utilizada de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ foi de 700 e 3500 μM . A concentração de $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$ foi de 3500 μM . Além disso, foi realizada a oxidação com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ em pH 5.0 (tampão acetato de sódio, D_2O , 100 mM), pH 7.4 (tampão fosfato, D_2O , 100 mM); pH 9.2 e 11.4 (bicarbonato de amônio, D_2O , 100 mM) sem e com azida de sódio (3500 μM) durante 60 minutos a 37 °C. Foram realizadas três oxidações distintas para cada condição.

Retirada dos olhos bovinos. Os sete pares de olhos bovinos foram extraídos na Faculdade de medicina veterinária e zootecnia da USP (Campus de Pirassununga) sob a supervisão do professor Rodrigo Martins Soares. Correspondem a 7 fêmeas de descarte (carne destinada a consumo para o restaurante universitário do COSEAS) com mais de 10 anos de idade seguindo as normas vigentes para abate de animais comerciais do Brasil. Os olhos foram identificados e separados cada par especificando o lado direito e esquerdo dos animais. Foram armazenados em -80 °C e encaminhados em gelo seco ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – IQUSP no campus de São Paulo.

Dissecação dos olhos bovinos, retirada dos cristalinos óculos e extração das proteínas presentes. Os quatorze cristalinos oculares referentes aos sete pares de olhos bovinos foram retirados unitariamente de acordo com Marcelo e Ivan, 2001. As proteínas foram extraídas de acordo com o protocolo adaptado de Wilmarth *et al.*, 2008. Os olhos foram descongelados em gelo e com um auxílio de bisturi cirúrgico retirados da parte interna do globo ocular, lavados com água MiliQ e armazenados unitariamente em tubos falcon de 50 mL, homogeneizados no gelo com 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM EDTA, metionina (2mM), triptofano (2mM), histidina (2mM) e inibidores de protease (Sigma). O homogenato foi centrifugado a 4 °C e 20.000 g por 30 minutos. O sobrenadante solúvel foi retirado e realizou-se mais duas vezes o procedimento acima de extração. As amostras foram secas em speecvac e armazenadas em -80 °C.

Redução, alquilação e digestão tríptica.

Lisozima solução. A solução final de proteína oxidada foi concentrada com o auxílio de um filtro de corte de 10 kDa. As amostras foram liofilizadas e solubilizadas em 50 mM de tampão tris-HCl, pH 8.5. A solução da proteína foi digerida (100 µg). As amostras foram tratadas com 5 M de guanidina por 30 minutos a 25 °C. Adicionou-se na solução 5 mM DDT por 30 minutos a 25 °C, e posteriormente, incubou-se no escuro com 15 mM de iodoacetamida por mais 30 minutos. A solução final foi diluída para 0.8 M de guanidina e adicionou-se 1

mM de CaCl_2 e 1 μg de tripsina na solução (razão proteína/enzima 100:1). A solução final foi digerida durante 17 horas a 37°C.

Lisozima gél 1D. Os spots em torno de 28 kDa foram removidos do gél de SDS-PAGE com uma lâmina afiada e cortado em pedaços muito pequenos, introduzidos dentro de um tubo de Eppendorf com acetonitrila (50%) e tampão tris-HCl (50 mM), e mantidos overnight a 25°C para descoloração. Em sequência, os spots proteicos foram reduzidos, alquilados e digeridos como descrito para as digestões em soluções. Para cada condição foi realizada uma amostra padrão de lisozima nas mesmas condições de concentração.

Proteínas do cristalino bovino em solução. As proteínas extraídas dos cristalinos do olho bovino (100 μg) foram incubadas em 5M de guanidina por 30 minutos a 25 °C. Adicionou-se na solução 5 mM DDT por 30 minutos a 25 °C, e posteriormente incubou-se no escuro com 15 mM de iodoacetamida por mais 30 minutos. A solução final foi diluída para 0.8 M de guanidina, adicionou-se 1 mM de CaCl_2 e 1 μg de tripsina na solução (razão proteína/enzima 100:1). A solução final foi digerida durante 17 horas a 37°C.

Gel de eletroforese (SDS-PAGE) - Lisozima. A formação de ligações cruzadas foi determinada através de SDS-PAGE. Alíquotas (50 μg) de cada amostra foi carregada no gél em cada poço. As amostras de proteínas foram aquecidas por 10 minutos a 95 °C em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 6.8) com uma solução contendo 8% de SDS, 40% glicerol, 400 mM de DTT e 0.4% de azul de bromofenol. O “*Resolving gel*” (12%) foi preparado com 30% da mistura de acrilamida em 1.5 M tampão tris (pH 8.8), 10% de persulfato de amônio e 10% de SDS. O “*stacking gels*” (5%) foi preparado em 1 M de tampão tris (pH 6.8). A eletroforese foi realizada em 100 V durante 2 h. Após a eletroforese, as amostras foram coradas com Coomassie Blue e descorados com metanol/ácido acético 10% por 72 h. Os géis foram escaneados e a quantificação relativa realizada através do software ImageJ.

Gel de eletroforese (SDS-PAGE) – Cristalinos do olho bovino. As proteínas extraídas dos 12 pares de olhos bovinos foram avaliadas através de SDS-

PAGE. Alíquotas (50 µg) de cada amostra foi carregada no géil em cada poço. As amostras de proteínas foram aquecidas por 10 minutos a 95 °C em 200 mM de tampão Tris-HCl (pH 6.8), com uma solução contendo 8% de SDS, 40% glicerol, 400 mM de DTT e 0.4% de azul de bromofenol. O “*Resolving gel*” (15%) foi preparado com 30% da mistura de acrilamida em 1.5 M de tampão tris (pH 8.8), 10% de persulfato de amônio e 10% de SDS. O “*stacking gels*” (5%) foi preparado em 1 M de tampão tris (pH 6.8). A eletroforese foi realizada em 100 V durante 2 h. Após a eletroforese, as amostras foram coradas com InstantBlue por 30 minutos.

Análise da lisozima intacta por LC-MS. As diferentes foto-oxidações e oxidação com DHPN¹⁶O₂ e DHPN¹⁸O₂ da lisozima intacta foram analisadas por espectrometria de massas em um UHR-ESI-Q-TOF-MS da Bruker Daltonics MaXis 3G (Bruker, Billerica, MA, USA) em modo positivo. As proteínas oxidadas foram analisadas em um espectrometro de massas acoplado a um sistema de HPLC da Shimadzy CBM-20A (Tokyo, Japão). As amostras foram eluidas em uma coluna C-18 (Gemini 5µ C18 250x4.6 mm i.d-Phenomenex) em um fluxo isocrático de 0,8 mL/min (2% de água MiliQ com 0,1% de ácido fórmico) durante 5 minutos. Em sequência, a proteína intacta foi eluida em fluxo gradient de água (2% de água MiliQ com 0,1% de ácido fórmico) e acetonitrila (2% para 40% de ACN em 3 min); mantido a 40% de ACN por 7 min, e então, 100% até 13 minutos. A coluna foi lavada por 2 minutos com 100% de ACN, recondicionada a 2% por 6 minutos. As condições da ionização por ESI foram: capillary 4.5 kV; dry heater 200 °C; dry gas 8.0 L/min; end plate -500V. Soluções em concentração inicial de proteína de 70 µM. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de 10 µL, diluído 9:1 e injetado 50 µL. O instrumento foi externamente calibrado usando “ESI low concentration tuning mix” na faixa de *m/z* de 100 a 2000. Os espectros foram internamente calibrados utilizando o “*lock mass*” com massa de referencia de 1221,9906. O software Bruker DataAnalysis (versão 4.0) foi empregado para a aquisição dos dados, processamento e obtenção dos espectros deconvoluídos. A deconvolução dos espectros foi obtida usando o algoritmo de máxima entropia na faixa de massas de 10 a 32 kDa com 50.000 de resolução e *data spacing* de *m/z* 0.1.

Análise das proteínas do olho bovino intacta por LC-MS. As proteínas dos olhos bovinos foram analisadas por espectrometria de massas em um UHR-ESI-Q-TOF-MS da Bruker Daltonics MaXis 3G (Bruker, Billerica, MA, USA) em modo positivo. As amostras foram eluídas em uma coluna C-18 (Gemini 5 μ C18 250x4.6 mm i.d-Phenomenex) em um fluxo isocrático de 1 mL/min (2% de água MiliQ com 0,1% de ácido fórmico) durante 5 minutos. Em sequência, a proteína intacta foi eluída em fluxo gradiente de água (2% de água MiliQ com 0,1% de ácido fórmico) e acetonitrila (2% para 40% de ACN em 3 min); mantido a 40% de ACN por 7 min, e então, 100% até 13 minutos. A coluna foi lavada por 2 minutos com 100% de ACN, recondicionada a 2% por 6 minutos. As condições da ionização por ESI foram: capillary 4.5 kV; dry heater 200°C; dry gas 8.0 L/min; end plate -500V. O instrumento foi externamente calibrado usando “ESI low concentration tuning mix” na faixa de m/z de 100 a 2000. Os espectros foram internamente calibrados utilizando o “lock mass”, com massa de referencia de 1221,9906. O software Bruker DataAnalysis (versão 4.3) foi empregado para a aquisição dos dados, processamento e obtenção dos espectros deconvoluídos. A deconvolução dos espectros foi obtida usando o algoritmo de máxima entropia na faixa de massas de 10 a 60 kDa com 100,000 de resolução e *data spacing* de m/z 0,1.

Análise da lisozima digerida por nLC-Q-TOF-MS/MS. Peptídeos digeridos com tripsina foram analisados usando como fonte de ionização Captive Spray nano ESI source (Bruker, Bremen, Germany) acoplada a um sistema de nano-1D-LC Shimadzu CBM-20AD (Tokyo, Japan). Os peptídeos foram concentrados utilizando uma coluna monolítica (MonoCap C18 Trap column, 0.075X150 mm da GL Sciences Inc., Tóquio, Japão) e a separação foi realizada usando uma coluna Zorbax 300SB-C18 (150x75 μ m, 3.5 μ m, Agilent Technologies) com fluxo de 300 nL/min e temperatura de 25 °C com o solvente A (água, 0.1% de ácido fórmico e acetonitrila, 5%) e solvente B (acetonitrila, 0,1% de ácido fórmico e água, 5%). A amostra foi injetada e concentrada no trap por 5 minutos em 5% de solvente A. Em sequência, iniciou-se com o gradiente linear de eluição para os peptídeos na coluna: 5% B até 40% B em 40 min, 95% B em 41 min, 95% B em 45 min, 5% B em 46 min, 5% B até 60 min. As bandas cromatográficas obtidas na separação dos peptídeos da

solução oxidada se apresentaram com baixa resolução, e com alto número de constituintes em uma mesma banda, isso poderia acarretar a supressão de um íon minoritário correspondente a um peptídico modificado. Assim, a separação cromatográfica foi otimizada, alterando-se a gradiente de eluição, 60 minutos com um Δt_g de 0,9 % B/min. O gradiente linear com 0.9% ACN/min, levou a uma expressiva melhora na resolução, sendo esse método utilizado neste estudo; o método consistiu de um gradiente linear de 5% B até 50% B em 50 min, 50% B até 90% B em 5 min, 90% B por 12 min, 5% B em 1 min, e recondicionamento por 15 min.

A fragmentação dos peptídeos digeridos foi realizada a partir de collision induced dissociation (CID) utilizando-se gás N_2 . Os experimentos de fragmentação em solução foram realizados através de um Auto MS/MS utilizando-se uma tabela de fragmentação otimizada para um range de m/z 500, 800, 1000, 1200 e 2000 com múltiplas cargas +2, +3 e +4. Se a massa isolada não corresponde ao íon determinado na lista de fragmentação, é então, intercalada a m/z para picos adjacentes. A energia de colisão foi de 5 a 70 eV acoplados a um collision sweeping de 80 a 120% do valor estipulado. A opção do collision sweeping é ativada para mudar a amplitude de colisão apenas durante um scan. O tempo de aquisição para o MS foi de 1 Hz e para o MS/MS 0.5 Hz. Além disso, visando o aumento da sensibilidade no Auto MS/MS foi condicionado a fragmentação dos 3 íons mais intensos, em um intervalo de 0.3 min, acoplados a exclusão inteligente dos íons mais intensos neste intervalo de tempo.

Alguns íons modificados foram identificados no MS em baixa intensidade, e utilizando-se o Auto MS/MS os espectros de fragmentação obtidos apresentaram-se em baixa intensidade e com bastante perda de íons da serie b- e y-. Assim, baseados nos resultados obtidos no Auto MS/MS, realizaram-se corridas unitárias ("target") para cada modificação. O íon foi isolado no quadrupolo e encaminhado à célula de colisão para fragmentação a partir de CID utilizando-se gás N_2 . As energias de colisão foram otimizadas de acordo com o obtido no experimento de auto MS/MS. Entretanto, realizou-se uma otimização *on-line* da fragmentação do íon de acordo com o tempo de retenção do peptídeo. Todo esse procedimento foi realizado para que o maior número de íons produtos fosse identificado em toda a região do espectro

obtido, e assim fosse obtido o melhor sequenciamento possível para cada peptídeo. Também foram realizadas otimizações on-line para os parâmetros do ion cooler do massas: set ion cooler RF, set ion cooler, pre pulse e set ion cooler transfer time.

As condições otimizadas para a fonte nano de ionização captive foram: capillary, 1.8 kV; dry heater, 150 °C; dry gas, 6 L/min. O instrumento foi externamente calibrado usando “ESI low concentration tuning mix” na faixa de m/z de 50 a 2000. Os espectros foram internamente calibrados utilizando o “lock mass”, com massa de referência de 1221,9906. O software Bruker DataAnalysis (versão 4.0) foi empregado para a aquisição dos dados e processamento dos espectros.

Análise das proteínas do olho bovino digerida por nLC-Q-TOF-MS/MS.

Peptídeos digeridos com tripsina foram analisados usando como fonte de ionização Captive Spray nano ESI source (Bruker, Bremen, Germany) acoplada a um sistema de nano-1D–LC Waters Acquity (Milford, USA). Os peptídeos foram concentrados utilizando uma coluna monolítica (nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm) e a separação foi realizada usando uma coluna nanoAcquity UPLC® (1.7µm BEH130 100 µm x 100 mm) com fluxo de 300 nL/min e temperatura de 40 °C com o solvente A (água, 0.1% de ácido fórmico e solvente B (acetonitrile, 0.1% de ácido fórmico). A amostra foi injetada e concentrada no trap por 3 minutos em 2% de solvente A com um fluxo de 7 µL/min. Em sequência, iniciou-se com o gradiente linear de eluição para os peptídeos na coluna: 2% B até 30% B em 240 min, 85% B até 245 min, 85% B até 250 min, 2% B até 255 min, 2% B até 265 min. A fragmentação dos peptídeos digeridos foi realizada a partir de collision induced dissociation (CID) utilizando-se gás N₂. Os experimentos de fragmentação em solução foram realizados através de um Auto MS/MS utilizando-se uma tabela de fragmentação otimizada para um range de m/z 300, 400, 500, 600, 800, 900, 1000, 1100, 1300 e 2000 com múltiplas cargas +1, +2, +3 e +4. A energia de colisão foi de 5 a 70 eV acoplados a um collision sweeping de 90 a 125% do valor estipulado. O tempo de aquisição para o MS foi de 4 Hz e para o MS/MS 4 Hz para baixa intensidade (5000 cts) e 16 Hz para altas intensidades (30000 Hz), com um ciclo total de 3 s. Além disso, visando o aumento da sensibilidade

no Auto MS/MS foi condicionado a fragmentação de apenas um íon mais intenso, em um intervalo de 2 min, acoplados a exclusão inteligente dos íons mais intensos neste intervalo de tempo. As condições otimizadas para a fonte nano de ionização captive foram: capillary, 2 kV; dry heater, 150 °C; dry gas 3 L/min; nebulizer 2 Bar. O instrumento foi externamente calibrado usando “ESI low concentration tuning mix” na faixa de m/z de 50 a 2200. Os espectros foram internamente calibrados utilizando o “lock mass”, com massa de referência de 1221,9906. O software Bruker Data Analysis (versão 4.3) foi empregado para a aquisição dos dados e processamento dos espectros.

Análise das proteínas do olho bovino digerida por nLC-orbitrap-MS/MS.

Os peptídeos foram concentrados utilizando uma coluna monolítica (nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm) e a separação foi realizada usando uma coluna nanoAcquity UPLC® (1.7µm BEH130 100 µm x 100 mm) com fluxo de 300 nL/min e temperatura de 40 °C com o solvente A (água, 0.1% de ácido fórmico) e solvente B (acetonitrile, 0.1% de ácido fórmico). A amostra foi injetada e concentrada no trap, e em sequência, iniciou-se com o gradiente linear de eluição para os peptídeos na coluna: 5% B até 28% B em 80 min, 40% B até 90 min, 95% B até 92 min, 95% B até 104 min, 2% B até 265 min. A faixa de massas empregada para o MS foi de m/z 375-1600 com ciclo de 3s e resolução de 120K no modo positivo. A fragmentação dos peptídeos digeridos foi realizada a partir de higher energy collisional dissociation (HCD) com energia de colisão de 30% para cargas de 2-7. Os íons foram filtrados através de uma exclusão dinâmica após a detecção por 45 s. A tolerância de massa empregada foi de 10 ppm, com exclusão da distribuição isotópica. A resolução para o MS/MS foi de 30K. O instrumento foi externamente calibrado utilizando a solução da Thermo Scientific Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution. O software da Thermo scientific Orbitrap Fusion Lumos foi empregado para a aquisição dos dados.

Análise dos cross-links por nLC-Q-TOF-MS/MS da lisozima. Os diferentes cross-links propostos neste trabalho foram identificados e fragmentados através de MS/MS utilizando o procedimento acima descrito, com otimização

de fragmentação on-line. Neste trabalho, foi considerada apenas a formação de cross-links entre o mesmo peptídeo.

O cross-link entre 2-oxo-histidina foi verificado para os diferentes peptídeos contendo histidina não modificada (2-oxo-His-His): ¹⁵HGLDNYR²¹ com *m/z* 881,4062 (2+), 587,9399 (3+) e 441,2067 (4+); ⁶CELAAAMKRHGLDNYR²¹ com *m/z* 1397,1627 (2+), 931,7775 (3+), 699,0850 (4+) e 559,4694 (5+); ¹⁴RHGLDNYRGYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 1583,7484 (2+), 1056,1681 (3+), 792,3779 (4+), 634,1037 (5+) e ¹⁵HGLDNYRGYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 934,7126 (2+), 623,4775 (3+) e 467,8590 (4+).

O cross-link entre 2-oxo-histidina foi verificado para os diferentes peptídeos contendo lisina (2-oxo-His-Lis): ¹KVFG⁴ com *m/z* 669.3334 (2+) e 446,5580 (3+); ¹⁴RHGLDNYRGYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 1075.5112 (3+), 806,8852 (4+), 645.7096 (5+); ¹⁵HGLDNYRGYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 1023,4775 (3+), 767,8599 (4+), 614.4894 (5+); ⁶CELAAAMK¹³ com *m/z* 890,9088 (2+), 594,2750 (3+), 445,9580 (4+); ⁶CELAAAMKRHGLDNYR²¹ com *m/z* 1198,9569 (2+), 799,6403 (3+), 599,9820 (4+), 480,1871 (5+); ⁹⁷KIVSDGNGMNAWVAWR¹¹² com *m/z* 897,7663 (3+), 673,5765 (4+), 539,0627 (5+), 449,3868 (6+) e ¹¹⁵CKGTDVQAWIR¹²⁵ com *m/z* 1111,0319 (2+), 741,0237 (3+), 556,0196 (4+), 445,0171 (5+).

O cross-link entre 2-oxo-histidina foi verificado para os diferentes peptídeos contendo triptofano oxidado para quinurenina (2-oxo-His-Trp[O]): ²²GYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 1109,0107 (2+), 739,6762 (3+), 555,0090 (4+); ⁶²WWCNDGR⁶⁸ com *m/z* 942,8951 (2+), 628,9325 (3+), 471,9512 (4+); ⁹⁷KIVSDGNGMNAWVAWR¹¹² com *m/z* 1356,1407 (2+), 904,4296 (3+), 678,5740 (4+), 543,0606 (5+); ⁹⁸IVSDGNGMNAWVAWR¹¹² com *m/z* 1292,0933 (2+), 861,7312 (3+), 646,5502 (4+), 517,4416 (5+); ¹¹⁵CKGTDVQAWIR¹²⁵ com *m/z* 1113,0294 (2+), 742,3553 (3+), 557,0183 (4+), 445,8161 (5+); ¹¹⁷GTDVQAWIR¹²⁵ com *m/z* 968,9666 (2+), 646,3135 (3+), 484,9869 (4+).

O cross-link entre triptofano reduzido a álcool foi verificado para os diferentes peptídeos contendo triptofano oxidado para quinurenina (Trp[O]-Trp[O]): ²²GYSLGNWVCAAK³³ com *m/z* 1335,6255 (2+), 890,7528 (3+), 668,3164 (4+), 534,8546 (5+); ⁶²WWCNDGR⁶⁸ com *m/z* 1003,3944 (2+), 669,2654 (3+), 502,2008 (4+), 401,9621 (5+); ⁹⁷KIVSDGNGMNAWVAWR¹¹²

com m/z 1779,7907 (2+), 1186,6654 (3+), 890,2508 (4+), 712,4021 (5+), 592,8363 (6+); $^{98}\text{IVSDGNGMNAWVAWR}^{112}$ com m/z 1701,7907 (2+), 1134,8629 (3+), 851,3990 (4+), 681,3206 (5+); 567,9351 (6+); $^{115}\text{CKGTDVQAWIR}^{125}$ com m/z 1343,6630 (2+), 896,1111 (3+), 672,3351 (4+), 538,0695 (5+); $^{117}\text{GTDVQAWIR}^{125}$ com m/z 1055,5374 (2+), 704,0273 (3+), 528,2723 (4+).

Quantificação relativa do cross-link obtidos nas reações em diferentes condições de pH. As quantificações relativas para a formação dos cross-links em diferentes condições de pH foram realizadas a partir das médias das áreas extraídas para os diversos íons encontrados. A razão em porcentagem encontrada foi obtida pela média das áreas para cada íon pela média da área do peptídeo FESNFNTQATNR (m/z 714,8406 com 2 cargas). Este íon representa o único peptídeo sem nenhum amino ácido modificado sendo identificado no início da corrida com tempo de retenção de aproximadamente 19 – 20 minutos, e corresponde ao primeiro peptídeo a ser identificado para a lisozima após digestão triptica com intensidade da ordem $3\text{-}4 \times 10^6$. A intensidade corresponde a detecção sem saturação do detector e a maior obtida em relação aos outros peptídeos identificados.

Buscas no banco de dados para a lisozima. As diferentes modificações previstas para os aminoácidos reativos em pH fisiológico entre a lisozima e o oxigênio singlete foram avaliadas a partir do banco de dados Mascot (versão 4.0) utilizando-se um erro de 10 ppm para o MS e 0.05 ppm para o MS/MS e o SwissProt como base de dados. A interface de busca para as proteínas e as modificações foram feitas a partir do programa Biotools (versão 3.2). Algumas modificações foram inseridas diretamente no provedor do Mascot licenciado pela FAPESP e ao grupo Redoxoma / Central Analítica, tais como a oxo-histidina e a adição de +32 Da (referente a 2 átomos de oxigênio), além das modificações referentes a oxidação com a adição de átomos de oxigênio 18. Posteriormente, cada modificação para os peptídeos oxidados encontrados foi verificada manualmente com o auxílio das fragmentações teóricas realizadas no site: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>.

Buscas no banco de dados para o olho bovino. As buscas para as proteínas extraídas dos olhos bovinos foram avaliadas a partir do banco de dados Mascot (versão 4.0) após os dados obtidos serem convertidos no formato mgf a partir do programa Mascot Distiller. Os parâmetros de buscas no servido foram especificados com erro de 10 ppm para o MS e 0.1 ppm para o MS/MS. Utilizou-se o Uniprot bovine all reviewed como base de dados. As modificações especificadas foram: carbamidometilação como modificação fixa para cisteína (C); oxidação para cisteína, tirosina, metionina, histidina, triptofano, formação de oxo-histidina, deaminação, formação de quinurenina, hidroxiquinurenina e oxi-lactona para triptofano como modificações variáveis.

Análise da formação de ligação cruzada no cristalino dos olhos bovinos.

A formação de ligação cruzada entre as proteínas extraídas dos olhos bovinos forma avaliadas a partir do programa “*Spectrum Identification Machine for Cross-Linked Peptides (SIM-XL)*” e os parâmetros baseados em Lima *et al.*, 2015.

4. Resultados

4.1. Quantificação dos hidroperóxidos formados na reação entre a lisozima e $^1\text{O}_2$.

As concentrações dos hidroperóxidos formados por foto-oxidação e em presença de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ foram determinadas pelo ensaio FOX. Os resultados estão apresentados na Figura 20. Em todas as reações verificou-se aumento da formação de hidroperóxidos. Todas as reações foram realizadas nas mesmas condições (tampão fosfato, pH 7,4, 100 mM) e concentração de lisozima ($70\text{ }\mu\text{M}$ – 1 mg/mL).

Observou-se que a concentração dos hidroperóxidos aumentou rápida e linearmente até 30 minutos de reação para ambos os casos reacionais, em presença de rosa bengala e de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$; após este período o aumento da concentração, ainda que em menor escala, foi observado. Isso possivelmente foi decorrente do consumo de $^{16}\text{O}_2$ e/ou redução dos hidroperóxidos formados.

Após 5 minutos de reação, a concentração de peróxidos observada foi de $3,3\text{ nM}$ para a foto-oxidação com RB ($5,8$ e $13,8\text{ nM}$ a 37°C , na concentração de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 700 e $3500\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente). Na oxidação em temperatura a 50°C a concentração determinada foi de $21,3$ e $31,7\text{ nM}$ em 700 e $3500\text{ }\mu\text{M}$ de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$, respectivamente.

Os experimentos foram realizados usando diferentes condições de temperatura e concentração de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$. A comparação em 37°C e 50°C , para ambas concentrações demonstra que a 50°C a formação de peróxidos é mais pronunciada, pois nesta temperatura a termólise do endoperóxido leva a uma maior liberação de $^{16}\text{O}_2$. Em 30 minutos de reação a 37°C e $700\text{ }\mu\text{M}$ de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$, a concentração de peróxido foi de $31,1\text{ nM}$, enquanto que a 50°C a concentração foi de $59,2\text{ nM}$; verificou-se um aumento de 95% da concentração de peróxidos a 50°C . Na concentração de $3500\text{ }\mu\text{M}$ de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$, ao comparar as duas condições de temperatura, o aumento da formação de peróxidos foi menos expressivo, a 50°C a concentração de peróxido determinada foi de $69,5\text{ nM}$ com um aumento de aproximadamente 74%; a 37°C a concentração determinada foi de $47,2\text{ nM}$.

Figura 20 Quantificação de peróxidos formados por foto-oxidação da lisozima pela luz visível em presença de $^{16}\text{O}_2$ e RB (20 μM) como fotosensibilizador e oxidação química a partir da geração de oxigênio singlete através da termólise do endoperóxido $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ em diferentes condições de temperatura e concentração. A concentração dos peróxidos foi determinada através do ensaio FOX. Cada ponto representa média ($\pm$ SD) valores de determinações em triplicata a partir de dois experimentos independentes.

Além disso, a lisozima foi oxidada com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ em diferentes valores de pH (5,0; 7,4; 9,6 e 11,4), visando investigar a formação de ligação cruzada entre diferentes resíduos de aminoácidos. Na Figura 21 estão apresentados os resultados obtidos da oxidação da lisozima com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 37°C na concentração de 3500 μM nos quatro diferentes valores de pH. Em 5 minutos de incubação, a concentração de peróxidos de proteína foi de 28,6 nM em pH 5,0; 32,7 nM em pH 7,4; 26,5 nM em pH 9,6 e 25,8 nM em pH 11,4, diferindo apenas após 5 minutos a concentração apenas nas oxidações realizadas em pH 5,0 e 7,4. Como verificado no gráfico, os valores obtidos nos pHs 9,6 e 11,4 apresentam-se com valores próximos. Em 30 minutos, a concentração determinada foi de 45,4 nM em pH 9,6 e 47,2 nM em pH 11,4.

Figura 21 Quantificação da formação de peróxidos por oxidação da lisozima com DHPN¹⁶O₂ (3500 μM) a 37°C em diferentes condições de pH. A concentração dos peróxidos foi determinada através do ensaio FOX. Cada ponto representa média (± SD) dos valores de determinações em triplicata a partir de dois experimentos independentes.

4.2. Inibição da atividade enzimática da lisozima oxidada com ¹O₂

A atividade enzimática da lisozima foto-oxidada em presença de rosa bengala e oxidada com DHPN¹⁶O₂ em diferentes condições de pH foram medidas espectroscopicamente a partir da reação com a bactéria *Micrococcus lysodeikticus* como descrito em Hawkins & Davies, 2005. Na Figura 22 abaixo estão apresentadas as respectivas atividades da lisozima em solução após foto-oxidação em relação ao tempo. Verificou-se, ao decorrer da foto-oxidação, um decaimento da atividade catalítica. As oxidações de resíduos de aminoácidos e formação de ligações cruzadas entre diferentes unidades de proteína levaram a alterações químicas e estruturais da enzima que acarretaram, possivelmente, na perda da eficiência catalítica. Na Figura 22 (b)

é possível observar que se tem um decaimento quase linear da perda da atividade. Após 5 minutos, a atividade decaiu para aproximadamente 80%. Em 30 minutos de foto-oxidação caiu para 50%, enquanto que após 90 minutos a atividade medida foi de aproximadamente 10%.

Figura 22. Atividade catalítica da lisozima após reação com $^1\text{O}_2$. Gráficos representam as atividades expressas em porcentagem. (a) e (b): lisozima (70 μM) foto-oxidada com RB por 90 minutos; (c): lisozima (70 μM) oxidada com DHPN $^1\text{O}_2$ no intervalo de pH 5,0 - 11,4 por 30 minutos.

Na Figura 22 (c) estão apresentadas as atividades enzimáticas medidas nas diferentes condições de pH (5,0; 7,4; 9,6 e 11,4). Para todos os casos após

reação com DHPN¹⁶O₂ por 5 minutos, a atividade enzimática determinada ficou num intervalo de aproximadamente 1 – 8%, respectivamente para pH 11,4 e 7,4. Verifica-se que os valores de pH utilizados interferem na eficiência da atividade enzimática, sendo que em pH 7,4 tem-se a atividade máxima para a lisozima e em pH 11,4 atividades mínimas.

Alguns trabalhos demonstram que a natureza da solução salina utilizada no ensaio tem um efeito considerado na atividade enzimática. Não apenas a concentração do sal, mas também o tipo de sal exerce efeitos particulares. (Sherman et al, 1951 e Chang et. al. 1970). Para a lisozima, o pH ótimo para a catálise é altamente dependente da concentração do sal, sendo demonstrado que a lisozima apresenta atividade enzimática em ampla faixa de pH de 4,0 – 10,0 (Davies et al. 1968). Além disso, Chang and Carr, demonstraram que a atividade da lisozima é sensível não apenas em função do pH, mas ainda mais, para a concentração monovalente do cátion na solução; em pH 5,0 foi demonstrado que a atividade máxima é obtida com 100 mM de cátion, enquanto que em pH 10 foi de 5 mM. Foi observado que a atividade intrínseca da lisozima permanece alta em ampla faixa de pH, sendo que sua atividade enzimática é máxima em pH 7,5. Dado este, de acordo com os resultados encontrados, mencionado acima e descrito na Figura 22 (c).

4.3. Oxidação da lisozima

Após as investigações de formações de hidroperóxidos de peptídeos, partiu-se para o estudo das modificações frente ao ¹O₂ em uma proteína modelo (lisozima). Duas formas de oxidação foram empregadas, sendo elas, a foto-oxidação utilizando-se rosa bengala como fotossensibilizador, e a outra, a oxidação química com geração do ¹O₂ a partir do trapeador DHPN¹⁶O₂. Além disso, a lisozima foi oxidada com oxigênio singlete marcado com isótopo de oxigênio 18 em presença de DHPN¹⁸O₂.

As soluções foram digeridas com tripsina e analisadas através de nLC-MS/MS (Figura 23). Os resultados obtidos foram submetidos à análise no banco de dados Mascot. A caracterização dos peptídeos modificados e o sequenciamento por MS/MS foi realizado manualmente. Foi analisada a digestão da solução reacional da foto-oxidação com 30 minutos de

fotosensibilização e as soluções de oxidação com DHPN¹⁶O₂ a 37 °C e 50 °C, nas concentrações de 700 e 3500 µM, respectivamente. Os resultados das digestões estão apresentados nas Tabelas 01 a 07.

Figura 23 Complexidade dos cromatogramas do massas (BPC) obtidos por nLC-MS/MS da digestão trípica da lisozima. (a): lisozima padrão; (b): lisozima foto-oxidada com RB por 15 min; (c): lisozima oxidada com DHPN¹⁶O₂.

Tabela 2 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após foto-oxidação por 15 minutos a 4 °C*

Faixa	Peptídeo	<i>m/z</i> observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	640,3070 (3+)	1917,8993	1917,8937	2,88	65	His ¹⁵ +14 (O-2H)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	645,6395 (3+)	1933,8967	1933,8887	4,18	32	Met ¹² +16 (O) His ¹⁵ +14 (O-2H)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	646,3105 (3+)	1935,9097	1935,9043	2,77	36	Met ¹² +16 (O) His ¹⁵ +16 (O)
14 - 33	RHGLDNYRGYSLGNWVCAAK	784,3768 (3+)	2350,1085	2350,1025	2,55	101	His ¹⁵ +14 (O-2H)
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	732,3436 (3+)	2194,0089	2194,0014	3,42	32	His ¹⁵ +14 (O-2H)
46 - 61	NTDGSTDYGILQINSR	885,4222 (2+)	1768,8299	1768,8228	4,05	97	Tyr ⁵³ +16 (O)
46 - 68	NTDGSTDYGILQINSRWWCNDGR	915,4118 (3+)	2743,2135	2743,2045	3,28	134	Tyr ⁵³ +16 (O)
62 - 68	WWCNDGR	499,2035 (2+)	996,3925	996,3872	5,28	46	Trp ⁶² +4 (O-2)
62 - 68	WWCNDGR	513,2008 (2+)	1024,3870	1024,3821	4,74	34	Trp ⁶² +32 (2O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	612,6350 (3+)	1834,8831	1834,8784	2,53	51	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,3033 (3+)	1818,8881	1818,8835	2,53	38	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	854,4018 (2+)	1706,7891	1706,7835	3,31	52	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	846,4044 (2+)	1690,7943	1690,7886	3,37	77	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	669,3375 (2+)	1336,6604	1336,6558	3,49	50	Trp ¹²³ +4 (O-2)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	675,3380 (2+)	1348,6615	1348,6558	4,23	37	Trp ¹²³ +16 (O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	683,3343 (2+)	1364,6540	1364,6507	2,42	33	Trp ¹²³ +32 (2O)
117 - 125	GTDVQAWIR	539,2710 (2+)	1076,5274	1076,5251	2,13	38	Trp ¹²³ +32 (2O)

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

Tabela 3 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após oxidação com DHPN¹⁶O₂ (700 μM) por 30 minutos a 37 °C*

Faixa	Peptídeo	<i>m/z</i> observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
6 - 13	CELAAAMK	455,2114	908,4086	908,4095	1,45	46	Met ¹² +16 (O)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	640,3048	1917,8926	1917,8937	0,59	43	His ¹⁵ +14 (O-2H)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	646,3084	1935,9032	1935,9043	0,56	52	Met ¹² +16 (O) His ¹⁵ +16 (O)
22 - 33	GYS LGNWVCAAK	671,3160	1340,6174	1340,6183	0,65	37	Trp ²⁸ +16(O)
22 - 33	GYS LGNWVCAAK	679,3133	1356,6119	1356,6132	0,94	42	Trp ²⁸ +32(2O)
62 - 68	WWCNDGR	499,2008	996,3870	996,3872	0,20	41	Trp ⁶² +4(O-C)
62 - 68	WWCNDGR	513,1978	1024,3810	1024,3821	1,06	46	Trp ⁶² +32(2O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	612,9610	1835,8612	1835,8625	0,71	52	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16(O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,3012	1818,8817	1818,8835	1,00	71	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	854,3981	1706,7817	1706,7835	1,05	41	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16(O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	846,8929	1691,7713	1691,7726	0,77	105	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	669,3341	1336,6537	1336,6558	1,58	41	Trp ¹²³ +4 (O-2)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	683,3320	1364,6495	1364,6507	0,83	32	Trp ¹²³ +32 (2O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	455,8905	1364,6496	1364,6507	0,83	46	Trp ¹²³ +32 (2O)
117 - 125	GTDVQAWIR	539,2692	1076,5239	1076,5251	1,06	53	Trp ¹²³ +32 (2O)

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

Tabela 4 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após oxidação com DHPN¹⁶O₂ (3500 μM) por 30 minutos a 37 °C*

Faixa	Peptídeo	<i>m/z</i> observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
6 - 13	CELAAAMK	455,2126	908,4095	908,4095	0,00	36	Met ¹² +16 (O)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	640,3054	1917,8927	1917,8937	0,51	49	His ¹⁵ +14 (O-2H)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	646,3091	1935,9038	1935,9043	0,25	42	Met ¹² +16 (O) His ¹⁵ +16 (O)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	484,9833	1935,9039	1935,9043	0,21	45	His ¹⁵ +32 (O)
14 - 33	RHGLDNYRGYSLGNWVCAAK	593,0353	2368,1123	2368,1131	0,34	40	His ¹⁵ +32 (O)
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	732,3409	2194,0009	2194,0014	0,24	35	His ¹⁵ +14 (O-2H)
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	738,3447	2212,0106	2212,012	0,62	37	His ¹⁵ +32 (O)
22 - 33	GYSLGNWVCAAK	671,3172	1340,6187	1340,6183	0,34	34	Trp ²⁸ +16(O)
22 - 33	GYSLGNWVCAAK	679,3146	1356,6135	1356,6132	0,26	36	Trp ²⁸ +32(2O)
62 - 68	WWCNDGR	499,2016	996,3875	996,3872	0,35	49	Trp ⁶² +4(O-C)
62 - 68	WWCNDGR	513,1995	1024,3833	1024,3821	1,22	37	Trp ⁶² +32(2O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	612,9609	1835,8609	1835,8625	0,87	49	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16(O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,3015	1818,8810	1818,8835	1,37	55	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	854,4002	1706,7845	1706,7835	0,74	48	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16(O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	846,4014	1690,7882	1690,7886	0,23	88	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
115 -125	CKGTDVQAWIR	669,3359	1336,6547	1336,6558	0,83	39	Trp ¹²³ +4 (O-2)
115 -125	CKGTDVQAWIR	450,5589	1348,6549	1348,6558	0,65	44	Trp ¹²³ +16 (O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	675,3364	1348,6615	1348,6558	1,00	47	Trp ¹²³ +16 (O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	683,3348	1364,6539	1364,6507	0,24	35	Trp ¹²³ +32 (2O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	455,8907	1364,6502	1364,6507	0,34	39	Trp ¹²³ +32 (2O)
117 - 125	GTDVQAWIR	539,2701	1076,5256	1076,5251	0,48	59	Trp ¹²³ +32 (2O)

(*); resultados referentes a três fotos oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

Tabela 5 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após oxidação com DHPN¹⁸O₂ (3500 μM) por 30 minutos a 37 °C*

Faixa	Peptídeo	m/z observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
6 - 13	CELAAAMK	456,2156	910,4155	910,4127	3,07	47	Met ¹² +18 (¹⁸ O)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	640,9745	1919,9000	1919,8964	1,87	42	His ¹⁵ +18 (¹⁸ O-2H)
6 - 21	CELAAAMKRHGLDNYR	647,6454	1939,9127	1939,9109	0,93	51	Met ¹² +18 (¹⁸ O) His ¹⁵ +18 (¹⁸ O)
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	733,0103	2928,0099	2928,0051	1,63	48	His ¹⁵ +16 (¹⁸ O-2H)
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	739,6820	2954,6967	2954,6915	1,75	44	His ¹⁵ +36 (2 ¹⁸ O)
22 - 33	GYSLGNWVCAAK	672,3198	1342,6239	1342,6213	1,93	41	Trp ²⁸ +18(¹⁸ O)
22 - 33	GYSLGNWVCAAK	681,3194	1360,6231	1360,6205	1,90	47	Trp ²⁸ +36(¹⁸ O)
62 - 68	WWCNDGR	500,2037	998,3917	998,3902	1,60	48	Trp ⁶² +6(¹⁸ O -C)
62 - 68	WWCNDGR	515,2038	1028,3915	1028,3895	2,33	57	Trp ⁶² +36(2 ¹⁸ O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,9706	1820,8883	1820,8859	1,32	59	Met ¹⁰⁵ +18 (¹⁸ O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	613,9707	1838,8886	1838,8850	1,95	58	Met ¹⁰⁵ +18 (¹⁸ O) Trp ¹⁰⁸ +18(¹⁸ O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	856,4046	1710,7935	1710,7907	1,64	52	Met ¹⁰⁵ +18 (¹⁸ O) Trp ¹⁰⁸ +18(¹⁸ O)
115 -125	CKGTDVQAWIR	670,3397	1338,6637	1350,6587	2,08	38	Trp ¹²³ +6(¹⁸ O -C)
115 -125	CKGTDVQAWIR	676,3389	1350,6621	1338,6609	2,51	54	Trp ¹²³ +16(¹⁸ O)
115 - 125	CKGTDVQAWIR	685,3379	1368,6601	1368,6579	1,60	55	Trp ¹²³ +32(2 ¹⁸ O)
117 - 125	GTDVQAWIR	541,2753	1080,5349	1080,5323	2,40	49	Trp ¹²³ +32(2 ¹⁸ O)

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

3500 μM

37 °C

DHPN¹⁸O₂

¹⁸[¹O₂]

Tabela 6 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após oxidação com DHPN¹⁶O₂ (700 µM) por 30 minutos a 50 °C*

Faixa	Peptídeo	m/z observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
46 - 61	NTDGSTDYGILQINSR	885,4227	1768,8308	1768,8228	4,57	108	Tyr ⁵³ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,3031	1818,8874	1818,8835	2,10	46	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	910,4511	1818,8877	1818,8835	2,30	49	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	612,6346	1834,8820	1834,8784	1,94	61	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	613,9665	1838,8778	1838,8734	2,41	54	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +4 (O-C) Trp ¹¹¹ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	846,4057	1690,7968	1690,7886	4,87	80	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	848,4016	1694,7887	1694,7835	3,06	70	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +4 (O-C)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	854,3956	1706,7767	1706,7835	3,99	43	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	856,3990	1710,7835	1710,7784	3,00	40	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +4 (O-C) Trp ¹¹¹ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	862,3966	1722,7787	1722,7784	0,18	86	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O) Trp ¹¹¹ +16 (O)

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

Tabela 7 Peptídeos da lisozima hidrolisados com tripsina identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS após oxidação com DHPN¹⁶O₂ (3500 μM) por 30 minutos a 50 °C*

Faixa	Peptídeo	<i>m/z</i> observado [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Íon Mascot Score	Modificação amino ácido
46 - 61	NTDGSTDYGILQINSR	885,4208	1768,8271	1768,8228	2,44	108	Tyr ⁵³ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	607,3027	1818,8862	1818,8835	1,49	59	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	910,4505	1818,8864	1818,8835	1,6	63	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	612,6340	1834,8803	1834,8784	1,00	51	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	840,4028	1678,7911	1678,7886	1,52	76	Trp ¹⁰⁸ +4 (O-C)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	846,4027	1690,7909	1690,7886	1,38	103	Met ¹⁰⁵ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	848,4000	1694,7855	1694,7835	1,2	110	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +4 (O-C)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	854,3989	1706,7832	1706,7835	0,17	96	Trp ¹⁰⁸ +16 (O) Trp ¹¹¹ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	862,3941	1722,7736	1722,7784	2,77	58	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O) Trp ¹¹¹ +16 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	870,3954	1738,7763	1738,7733	1,74	73	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +16 (O) Trp ¹¹¹ +32 (O)
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	878,3933	878,3933	1754,7721	2,19	69	Met ¹⁰⁵ +16 (O) Trp ¹⁰⁸ +32 (O) Trp ¹¹¹ +32 (O)

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes,

Tabela 8 Peptídeos da lisozima padrão hidrolisados com tripsina e identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS.

Range	Peptideo	<i>m/z</i> observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Error (ppm)	Mascot Score
7 - 13	CELAAAMK	447,2159	892,4173	892,4146	3,00	45
7 - 14	CELAAAMKR	525,2669	1048,5192	1048,5157	3,33	52
7 - 14	CELAAAMKR	350,5137	1048,5193	1048,5157	3,43	40
15 - 21	HGLDNYR	437,7129	873.4101	873.4087	1.60	59
15 - 33	HGLDNYRGYSLGNWVCAAK	727,6844	2180,0313	2180,0221	4,18	52
22 - 33	GYSLGNWVCAAK	663,3221	1324,6297	1324,6234	4,75	50
34 - 45	FESNFNTQATNR	714,8323	1427,6501	1427,6429	5,03	82
34 - 61	FESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSR	1055,1647	3162,4724	3162,4602	3,84	28
46 - 61	NTDGSTDYGILQINSR	877,4267	1752,8389	1752,8278	6,33	128
62 - 68	WWCNDGR	497,2054	992,3962	992,3923	3,95	35
62 - 73	WWCNDGRTPGSR	746,3342	1490,6537	1490,6473	4,30	14
74 - 97	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAKK	879,4362	2635,2867	2635,2768	3,77	83
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	902,4520	1802,8895	1802,8886	0,50	102
97 - 112	KIVSDGNGMNAWVAWR	601,9719	1802,894	1802,8886	2,98	59
98 - 112	IVSDGNGMNAWVAWR	838,4073	1674,8001	1674,7937	3,83	111
115 - 125	CKGTDVQAWIR	667,3403	1332,6660	1332,6609	3,83	67
115 - 125	CKGTDVQAWIR	445,2294	1332,6663	1332,6609	4,05	43
117 - 125	GTDVQAWIR	523,2769	1044,5392	1044,5352	3,83	37

Padrão Lisozima

(*); resultados referentes a três foto-oxidações distintas (realizadas inter dia), cada uma digerida três vezes.

4.3. Análise por LC-MS da lisozima intacta

4.3.1. Foto-oxidação com RB

Inicialmente, a modificação da lisozima pelo $^1\text{O}_2$ foi investigada por LC-UHR-ESI-Q-TOF-MS. Os espectros deconvoluídos da foto-oxidação com rosa bengala estão apresentados na Figura 24. Na Figura 24 (a) é apresentada a massa média da lisozima com m/z de 14304,85 Da, e a massa monoisotópica com 14298,83. Após 5 min de reação [Figura 24 (b)] o espectro deconvoluído levou a diferentes modificações com aumentos de +16 Da quando comparado com a proteína não modificada. Na reação após 30 min de foto-oxidação [Figura 24 (c)], a proteína, apresentou-se com uma massa média intensa em 14464,96 Da consistente com a adição +160 Da, indicando que dez átomos de oxigênio foram incorporados na estrutura da lisozima. Além disto, na Figura 24 (d) está apresentada a massa média de dímero da lisozima modificada, com massa intensa em 28677,70.

Figura 24 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da lisozima foto-oxidada pela reação entre rosa bengala e oxigênio no estado singlete. A: lisozima

padrão; B: reação em $t = 5$ min; C: reação em $t = 30$ min (região monômero); D: reação em $t = 30$ min (região dímero). Soluções em concentração inicial de proteína de $70 \mu\text{M}$. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$, diluído 9:1 e injetado $50 \mu\text{L}$.

4.3.2. Oxidação com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$

A oxidação também foi realizada através da geração de oxigênio singlete a partir da termólise do endoperóxido não iônico *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-3-3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida ($\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$). Os espectros de massas deconvoluídos após análise LC-UHR-ESI-Q-TOF-MS e as respectivas massas médias determinadas estão apresentados na Figura 25. Na Figura 25 (b) está apresentada a oxidação utilizando $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ com incrementos de massas de 16 Da, referente a oxidação da lisozima com átomo não marcado de oxigênio-16, enquanto que, na Figura 25 (c) descreve-se a oxidação utilizando $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$, com a respectiva adição de incrementos de massas de 18 Da, referente ao átomo marcado com oxigênio-18.

Figura 25 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da lisozima oxidada por oxigênio no estado singlete gerado pela termólise do $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. (a): lisozima padrão; (b): reação em $t = 5$ min com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$; (c): reação em $t = 5$ min com $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. Soluções em concentração inicial de proteína de $70 \mu\text{M}$. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$, diluído 9:1 e injetado $50 \mu\text{L}$.

Os produtos envolvidos na reação de termólise foram confirmados por medidas de TOF-MS com a detecção de três picos de acordo com a Figura 26: m/z de 419,2182 correspondente ao DHPN, e as m/z de 451,2080 e 455,2165, correspondentes ao $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$, respectivamente.

Figura 26 Termólise do endoperóxido DHPN e análises por UHR-ESI-Q-TOF-MS por infusão direta.

A termólise foi realizada em duas concentrações de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e nas temperaturas de 37°C e 50°C. Os resultados obtidos a 37°C nas duas concentrações de $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ (700 μM e 3500 μM) estão apresentados na Figura 27. As concentrações do endoperóxido no meio reacional foram avaliadas em 10 e 50 vezes em relação à quantidade do resíduo de histidina presente na lisozima, que corresponde apenas a uma unidade na posição 15.

Figura 27 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da lisozima oxidada com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 37°C . A e A': reação em $t = 5$ min; B e B': reação em $t = 30$ min; C e C': reação em $t = 60$ min (região monômero); D e D': reação em $t = 60$ min (região dímero). Soluções em concentração inicial de proteína de $70\ \mu\text{M}$. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de $10\ \mu\text{L}$, diluído 9:1 e injetado $50\ \mu\text{L}$.

O aumento da concentração de DHPN¹⁶O₂ leva a uma maior concentração de oxigênio singlete gerado no meio reacional, sendo que a oxidação da proteína segue uma relação direta entre a concentração do endoperóxido com o tempo reacional. Após 5 minutos de reação, para ambas as concentrações utilizadas de DHPN¹⁶O₂ [Figura 27 (a)], a intensidade do sinal com m/z de 1430,87 vai diminuindo gradativamente, enquanto os sinais acrescidos de incrementos de 16 unidades de massas aumenta gradativamente. O íon com m/z 14338,83 é o mais intenso após 30 minutos de reação [Figura 27 (b)]. Em 90 minutos de oxidação [Figura 27 (c)], os compostos mais intensos estão no intervalo de m/z 14337,85 – 14387,85. Além disso, o espectro da Figura 27 (d), são referentes à identificação de dímeros da lisozima oxidada com compostos com m/z na região de 28 kDa.

Na Figura 28 são apresentados os resultados obtidos da oxidação da lisozima com DHPN¹⁶O₂ a 50°C nas duas condições de concentração, 700 µM e 3500 µM respectivamente. Como esperado, a 50°C a proteína é mais rapidamente oxidada devido a maior liberação de oxigênio singlete ao meio reacional. Nas condições a 3500 uM a oxidação é bem efetiva, com espectros deconvoluídos com um perfil de produtos com sobreposição de compostos logo após 5 minutos de oxidação. A formação dos dímeros [Figura 28 (d)] a 3500 uM também é bem mais efetiva quando comparado com a concentração a 700 uM [Figura 28 (d)].

Figura 28 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da lisozima oxidada com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 50°C . A e A': reação em $t = 5$ min; B e B': reação em $t = 30$ min; C e C': reação em $t = 60$ min (região monômero); D e D': reação em $t = 60$ min (região dímero). Soluções em concentração inicial de proteína de $70\ \mu\text{M}$. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de $10\ \mu\text{L}$, diluído 9:1 e injetado $50\ \mu\text{L}$.

Além disso, a lisozima foi oxidada com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ em diferentes condições de pH (5,0; 7,4; 9,2 e 11,4). Na Figura 29 estão apresentados os resultados obtidos da oxidação da lisozima com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 37°C na concentração de $3500\ \mu\text{M}$. Em condições básicas de pH após 5 minutos de oxidação, o perfil dos espectros de massas obtidos é bem diferente quando comparados aos espectros obtidos em pH 5,0 e 7,4, tem-se uma grande sobreposição de compostos, sendo difícil diferenciar os incrementos de massas obtidos.

Figura 29 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da região do monômero da lisozima oxidada quimicamente por $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ a 37°C em diferentes condições de pH. A e A': reação em pH 5,0 em $t = 5\ \text{min}$ e $t = 30\ \text{min}$,

respectivamente; B e B': reação em pH 7,4 em $t = 5$ min e $t = 30$ min, respectivamente; C e C': reação em pH 9,6 em $t = 5$ min e $t = 30$ min, respectivamente; D e D': reação em pH 11,4 em $t = 5$ min e $t = 30$ min, respectivamente. Soluções em concentração inicial de proteína de $70 \mu\text{M}$. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de $10 \mu\text{L}$, diluído 9:1 e injetado $50 \mu\text{L}$.

Na Figura 30 estão apresentadas as regiões dos espectros deconvoluidos e as respectivas massas medias da região de formação dos dímeros nas diferentes condições de pH. Em pH 5,0 e 7,4 não é possível verificar uma diferença tão expressiva após 30 minutos de reação, entretanto, nos pHs básicos a formação de dímerização é bem efetiva e com expressiva sobreposição de produtos logo após 5 min de oxidação.

Figura 30 Espectros deconvoluídos obtidos a partir de LC-MS da região do dímero da lisozima oxidada quimicamente por DHPN¹⁶O₂ a 37°C em diferentes condições de pH. A e A': reação em pH 5,0 em t = 5 min e t = 30 min, respectivamente; B e B': reação em pH 7,4 em t = 5 min e t = 30 min, respectivamente; C e C': reação em pH 9,6 e t = 5 min e t = 30 min, respectivamente; D e D': reação em pH 11,4 em t = 5 min e t = 30 min, respectivamente. Soluções em concentração inicial de proteína de 70 μM. Para cada tempo foi retirada uma alíquota de 10 μL, diluído 9:1 e injetado 50 μL.

4.3. Identificação e caracterização por nano-LC-ESI-MS/MS dos peptídeos oxidados

Dentre todos os resíduos de aminoácidos, em pH fisiológico, o $^1\text{O}_2$ reage apenas com metionina, histidina, triptofano, tirosina e cisteína. Dessa forma, as modificações avaliadas neste estudo foram baseadas de acordo com a reatividade entre os resíduos de aminoácidos reativos com o $^1\text{O}_2$, incluindo os produtos de degradação. Todas as caracterizações das modificações por MS/MS descritas neste trabalho foram realizadas a partir dos espectros obtidos na oxidação com $\text{DHPN}^{16}\text{O}_2$ e $\text{DHPN}^{18}\text{O}_2$. A caracterização e o sequenciamento manual foram realizados a partir dos fragmentos da série b- e y- gerados pela clivagem a partir de CID da ligação peptídica. Os íons b- em vermelho são representativos de fragmentos da série b- em que temos a adição de 2 ou 4 Da de massas, referentes átomos do oxigênio-18.

A lisozima possui em sua estrutura primária dois resíduos de metionina (Met^{12} e Met^{105}) e ambos foram identificados como sulfóxidos (MetSO - adição de massas de +16 Da). O resíduo de Met^{12} foi identificado nos peptídeos com os resíduos no intervalo de 6-13 e 6-21. A caracterização da modificação por MS/MS é referente ao peptídeo $\text{C}^6\text{ELAAA}^{12}\text{MKR}^{14}$, e esta descrita na Figura 31; os íons duplamente carregados identificados foram com a m/z de 455,2116 [Figura 31 (b)] com ^{16}O e 456,2156 [Figura 31 (b)], com isótopo de ^{18}O . O sequenciamento manual levou a identificação de todos os íons da série b- e y- (Tabela A1); íons b_2 - b_7 , y_{-1} são intactos, e íons y_7 - y_9 estão modificados com o acréscimo de +16 Da ao resíduo de metionina. Os íons em vermelho são representativos aos fragmentos da série b- e y- com a adição de 2 Da de massas referente ao oxigênio ^{18}O . A oxidação do resíduo de Met^{105} foi identificada nos peptídeos nos intervalos de 97-112 e 98-112, a caracterização e o sequenciamento com os isótopos de oxigênio ^{16}O e ^{18}O é referente ao peptídeo $\text{I}^{98}\text{VSDGNGM}^{105}\text{NAW}^{108}\text{VAWR}^{112}$ e serão descritos juntamente com a oxidação do Trp^{108} .

Figura 31 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado C⁶ELAAAMK¹³R. (a): espectro nLC-MS com m/z 455,2126 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 456,2156 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18; (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 455,2126; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 456,2156. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isotópo do ¹⁸O.

A lisozima é constituída apenas de um resíduo de histidina (His¹⁵) e as oxidações identificadas por UHR-nano-ESI-Q-TOF-LC-MS e MS/MS foram a adição de massas de +14 Da (descrita como oxo-histidina), +16 Da e +32 Da.

A formação da 2-oxo-His foi identificada nos peptídeos com os resíduos no intervalo de 6-21, 14-33 e 15-33. Análises de MS e MS/MS para o peptídeo C⁶ELAAAMKRRH¹⁵GLDNYR²¹ estão apresentadas na Figura 32. Os íons triplamente carregados foram observados com m/z 640.3054 [Figura 32 (a)] com ¹⁶O e m/z 640.9745 [Figura 32 (b)] com ¹⁸O marcado. A fragmentação por CID levou a identificação completa dos íons y- e alguns íons b- que permitiram sequenciar manualmente o peptídeo modificado (Tabela A2); os íons y₁-y₆, b₂-b₃, b₅-b₆, b₁₀ e b₁₅ (peptídeo com ¹⁶O) e b₂-b₄, b₁₀-b₁₂ e b₁₅ (peptídeo com ¹⁸O) são íons não modificados; os íons em vermelho y₇-y₁₅, b₁₁- b₁₂ e b₁₅ são íons modificados com +16 Da e adição de 2 Da, referente a um oxigênio-18.

Para o peptídeo C⁶ELAAAMKRRH¹⁵GLDNYR²¹ foram identificados o sinal com m/z 646.3094 e 647.6454 [Figura 33], e m/z 738,3447 e 739,6820 [Figura 34], referentes ao peptídeo com adição de um e dois átomos de ¹⁶O e marcado ¹⁸O, respectivamente. O sequenciamento manual levou a identificação de todos íons y- e diversos íons b- (Tabela A3 e A4), para ambos peptídeos modificados, com adição de um ou dois oxigênios ao resíduo de histidina.

Figura 32 Espectros triplamente carregados referentes ao peptídeo modificado C⁶ELAAAMKRH¹⁵GLDNYR²¹. (a): espectro nLC-MS com m/z 640.3054 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16 ; (b) espectro nLC-MS com m/z 640.9745 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18; (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 640.3054; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 640.9745. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 33 Espectros triplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $C^6ELAAAMKRH^{15}GLDNYR^{21}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 646,3091 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16 ; (b) espectro nLC-MS com m/z 647,6554 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18; (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 646,3091; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 647,6554. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 34 Espectros triplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $\text{H}^{15}\text{GLDNYRGYSLGNWVCAAK}^{34}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 738.3447 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 739,6820 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 738.3447; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 739,6820. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

A lisozima apresenta em sua estrutura seis resíduos de triptofano (Trp^{28} , Trp^{62} , Trp^{63} , Trp^{108} , Trp^{111} , Trp^{123}). Neste estudo, com exceção para os resíduos Trp^{63} e Trp^{111} , todos os demais se apresentaram modificados. As oxidações

identificadas por UHR-nano-ESI-Q-TOF-LC-MS e MS/MS foram à adição de massas de +4 Da (descrita como quinurenina), +16 e +32 Da.

A oxidação do Trp²⁸ foi identificada no peptídeo 22-33 e é referente ao G²²YSLGNW²⁸VCAAK³³. Os íons duplamente carregados com a adição de um oxigênio foram identificados com m/z de 671,3172 e 672,3198 (Figura 35), e com adição de dois átomos de oxigênio com m/z de 679,3146 e 681,3194 (Figura 36), respectivamente com oxigênio-16 e marcado com oxigênio-18. O sequenciamento manual levou a identificação de todos os íons da série y- para ambas as modificações, e diversos íons da série b- (Tabela A5 e A6)

O resíduo Trp⁶² foi identificado com adição de +4 Da para o peptídeo digerido W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ referente ao intervalo 62-68. Os espectros de MS obtidos com m/z 499,2016 e 500,2037 (Figura 37) são referentes a formação da quinurenina (+4 Da), respectivamente com os isótopos de oxigênio-16 e marcado com oxigênio-18. Observa-se para o peptídeo no intervalo de 62-68 a presença de dois resíduos de triptofano, o Trp⁶² e Trp⁶³, o sequenciamento manual e a caracterização da oxidação para o Trp⁶² foram baseados a partir dos íons da série b- e y- identificados e descritos na Tabela A7. O sequenciamento levou a identificação de todos os íons da série y- e b-. Os íons da série b- (b₂-b₆) apresentam a adição de +4 ou +6 Da de massas em relação a fragmentação para o peptídeo sem modificação, esses íons não são capazes de diferenciar o resíduo modificado, pois apresentam os mesmos valores de m/z para ambas as posições. A confirmação da modificação para o resíduo Trp⁶², em relação ao Trp⁶³, é baseada apenas na identificação do íon y₆- com m/z de 807,3219, referente a quebra da ligação peptídica com o Trp⁶³ sem nenhuma modificação.

Além disso, o peptídeo W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ foi identificado com adição de +32 Da com m/z de 513,1995 e 515,2038, respectivamente aos isótopos de oxigênio ¹⁶O e ¹⁸O. Os espectros de MS e MS/MS estão descritos na Figura 38. O sequenciamento levou a identificação de todos os íons da série y- e b- sumarizados na Tabela A8. Da mesma forma que para a formação da quinurenina, a identificação da adição de +32 Da ao resíduo Trp⁶² foi baseada na identificação do íon y₆- com m/z de 807,3219.

A adição de dois átomos de oxigênio ao triptofano pode ser referente à formação de hidroperóxidos ou seu respectivo produto de degradação, descrito como FMK (composto **4** Figura 11). Neste aspecto, apenas com os experimentos de espectrometria de massas não é possível distinguir qual é o produto formado. Um estudo da estabilidade térmica dos hidroperóxidos *cis* e *trans* de triptofano isolado foram realizados por Rosein et al, 2008; demonstrando que os dois hidroperóxidos são relativamente estáveis quando mantido a 4, 25 e 37 °C durante 8 horas de incubação. Os experimentos levaram a confirmação de que após 4 h de incubação, tanto o WOOH *trans* e *cis* não apresentaram uma decomposição significativa e formação de FMK, sendo que o hidroperóxido *cis* apresentou uma pequena formação do respectivo álcool. Entretanto, com o triptofano isolado, tem-se a ciclização e formação da 3 α -hidroperóxido-hexahidro-pirrol-indólico **7** que ocasiona estabilidade adicional aos hidroperóxidos, em proteínas após o processo de digestão trípica esses hidroperóxidos podem ser degradados em FMK.

A modificação para o Trp¹⁰⁸ foi identificada nos peptídeos com resíduos no intervalo de 97-112 e 98-112 com adição de +16 Da. Os íons tri-protonados identificados para o peptídeo K⁹⁸IVSDGNGMNAW¹⁰⁸VAW¹¹¹R¹¹² foram com *m/z* de 612,9609 e 613,9707, respectivamente aos isótopos de oxigênio ¹⁶O e ¹⁸O. O peptídeo di-protonado referente a sequência I⁹⁷VSDGNGMNAW¹⁰⁸VAW¹¹¹R¹¹² apresentou-se com *m/z* de 854,4002 e 856,4046 para os isótopos de oxigênio ¹⁶O e ¹⁸O, respectivamente. Os espectros de MS e MS/MS estão apresentados na Figura 39 e referem-se ao sequenciamento para a modificação do Trp¹⁰⁸, incluindo uma modificação de +16 Da ao resíduo de Met¹⁰⁵. Os íons identificados para os isótopos de oxigênio ¹⁶O e ¹⁸O (Tabela A9); foram os y₁-y₇, y₉, y₁₁-y₁₅ e os íons b₂-b₃, b₆, b₈-b₁₀, b₁₂-b₁₄, dos quais, apenas os íons y₁-y₄, b₂-b₃ e b₆ não são modificados. A diferenciação e confirmação da modificação para o Trp¹⁰⁸ devem-se aos íons y₂-y₄ e b₁₂-b₁₃ que apresentam o Trp¹¹¹ sem nenhuma modificação. Os íons em vermelho y₆-y₇, y₉, y₁₁-y₁₄ e b₈-b₁₀, b₁₂-b₁₄ são íons modificados com adição de massas de +36 Da, referentes a dois átomos de oxigênio-18 no resíduo de Met¹⁰⁵ e Trp¹⁰⁸.

Para o resíduo Trp¹²³ foram identificados modificações com adição de massas de +4 ,+16 e +32 Da no peptídeo referente aos resíduos no intervalo de 115-125, e para o peptídeo no intervalo de 117-125 foi identificado a adição de +32 Da. A formação da quinurenina foi identificada com *m/z* de 669,3359 e 670,3397, respectivamente aos isótopos de oxigênio ¹⁶O e ¹⁸O. Análises de MS e MS/MS para o peptídeo C¹¹⁵KGTVQAW¹²³IR¹²⁵ estão apresentadas na Figura 40 e o sequenciamento manual e os íons identificados da série y- e b- (Tabela A10).

A oxidação com adição de um átomo de oxigênio para o resíduo Trp¹²³ foi identificado com duas e três cargas com *m/z* 675,3364 e *m/z* 450,5589 para o ¹⁶O, e o íon triplamente carregado com *m/z* de 676,3389 para o isótopo de ¹⁸O. A formação do produto com adição de +32 Da ao resíduo de Trp¹²³ também apresentou dois íons duplamente e triplamente carregados e *m/z* de 683,3348 e 455,8907 para o isótopo de ¹⁶O, e o íon triplamente carregado com *m/z* de 685,3379 para o isótopo de ¹⁸O. Os espectro de MS e MS/MS estão descritos nas Figura 41 e Figura 42 para a adição de um átomo e dois átomos de oxigênio, respectivamente. O sequenciamento manual levou a identificação de todos os íons da serie y- para as duas modificações, sendo os íons y₃-y₁₀ em vermelhos referentes à adição de um ou dois átomos de oxigênio-18 (Tabela A11 e A12).

Figura 35 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $G^{22}YSLGNW^{28}VCAAK^{34}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 671.3172 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 672.3198 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 672.3198; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 672.3198. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 36 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $G^{22}YSLGNW^{28}VCAAK^{34}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 679.3146 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 679.3146 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 672.3198; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 681.3194. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 37 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $\text{W}^{62}\text{W}^{63}\text{CNDGR}^{68}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 499.2016 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 500.2037 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 499.2016; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 500.2037. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 38 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $W^{62}W^{63}CNDGR^{68}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 513.1995 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 515.2038 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 513.1995; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 515.2038. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isotópo do oxigênio-18.

Figura 39 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $^{18}\text{VSDGNGMNAW}^{108}\text{VAWR}^{112}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 854.4002 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 856.4046 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 854.4002; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 856.4046. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isotópo do oxigênio-18.

Figura 40 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $C^{115}KGTDVQAW^{123}IR^{125}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 669.3359 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 670.3397 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 669.3359; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 670.3397. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isotópo do oxigênio-18.

Figura 41 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $C^{115}KGTDVQAW^{123}IR^{125}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 675.3364 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 676.3389 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 675.3364; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 676.3389. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 42 Espectros duplamente carregados referentes ao peptídeo modificado $C^{115}KGTDVQAW^{123}IR^{125}$. (a): espectro nLC-MS com m/z 683.3348 corresponde ao peptídeo não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 685.3379 corresponde ao peptídeo marcado com oxigênio-18. (c) espectro nLC-MS/MS com m/z 683.3348; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 685.3379. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

4.4. Identificação do cross-link e quantificação relativa por SDS-PAGE

A foto-oxidação com RB e as oxidações em presença de DHPN¹⁶O₂ em diferentes condições de pH foram avaliadas por SDS-PAGE (Figura 43). Novas bandas em aproximadamente 28 kDa, referentes a formação de dímeros, apareceram após oxidação, assim como pequenas bandas em 42 kDa para a formação de trímeros. Adicionalmente, as oxidações foram também realizadas em presença de NaN₃ (Figura 43 (b)) um inibidor de ¹O₂. As reações em presença de NaN₃ não levaram a formação dos respectivos dímeros ou trímeros. Os dados fornecem evidências para a ocorrência simultânea da formação de ligações cruzadas entre diferentes unidades proteicas após a exposição ao ¹O₂ para ambas as reações.

As intensidades das bandas de SDS-PAGE foram quantificadas a partir de análise densiométrica como apresentado na Figura 43 (c). Na irradiação, com a utilizando de luz visível sob uma atmosfera de oxigênio e na presença de RB, a intensidade do dímero em 28 kDa foi de uma abundância relativa de 10% após 15 minutos de foto-oxidação. As reações a partir da termólise do DHPN¹⁶O₂ foram dependentes do pH, com um aumento na intensidade da banda do dímero: menos favoráveis em condições ácidas e aumentando em condições de pH básico. Em pH fisiológico a abundância relativa foi de 20%

As oxidações em presença de DHPN¹⁶O₂ em diferentes condições de temperatura e concentração foram também avaliadas por SDS-PAGE (Figura 44). Os resultados confirmam que o aumento da concentração de ¹O₂ no meio reacional leva a uma maior formação de dimerização, e adicionalmente, da formação de trímeros.

Figura 43 Formação de dimerização da lisozima (70 μ M) promovido foto quimicamente com RB e quimicamente por termólise do DHPN¹⁶O₂. (a) Análise por SDS-PAGE da foto-oxidação por RB por 15 min e oxidada em diferentes condições de pH; (b) Análise por SDS-PAGE da foto-oxidação por RB por 15 min e oxidada em diferentes condições de pH em presença de NaN₃; (c) Análise densitométrica e quantificação relativa das bandas da proteína em 28 kDa (n=3, p<0.05)

Figura 44 Formação de dimerização da lisozima promovido quimicamente pela termólise do DHPN¹⁶O₂. (a) Análise por SDS-PAGE da oxidação em diferentes concentrações e temperatura; (b) Análise densitométrica e quantificação relativa das bandas da proteína em 28 kDa (c) Análise densitométrica e quantificação relativa das bandas da proteína em 42 kDa (n=3, p<0.05).

4.5. Identificação e caracterização dos cross-links por nano-LC-ESI-MS/MS

As bandas identificadas em torno de 28 kDa foram cortadas e submetidas a digestão trípica e os ligações cruzadas foram investigadas por UHR-nano-ESI-Q-TOF-nano-LC-MS e MS/MS baseados nos peptídeos identificados após digestão e os produtos oxidados de amino ácidos pelo ¹O₂, sendo investigados diferentes tipos de ligações cruzadas. O foco principal era a análise da ligação cruzada com o único resíduo de His na lisozima com a 2-oxo-histidina. Entretanto, foram identificadas ligações cruzadas entre a 2-oxo-histidina e resíduos de lisina, além de, ligações cruzadas com resíduos de triptofanos oxidados. Todas as ligações cruzadas identificadas com a 2-oxo-histidina estão sumarizadas na Tabela 9. Além disso, ligações cruzadas entre triptofanos modificados foram investigados e estão descritos na Tabela 10. Os erros observados são menores que 3 ppm.

Tabela 9. Formação de ligações cruzadas com a 2-oxo-His

Resíduo	Peptídeo	Carga	Oxigênio não marcado (^{16}O)			Oxigênio marcado (^{18}O)		
			Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
His ¹⁵	HGLDNYR	([M+2H] ²⁺)	881.4073 ¹	881.4062	1.2	882.4098 ²	882.4084	1.6
Lys ¹	KVFG	([M+2H] ²⁺)	669.3346 ³	669.3334	1.8	670.3371 ⁴	670.3355	2.4
Lys ¹¹⁶	CKGTDVQAWIR	([M+3H] ³⁺)	741.0251 ⁵	741.0237	1.9	741.6932 ⁶	741.6918	1.9
Trp ⁶²	WWCNDGR	([M+3H] ³⁺)	628.9335 ⁷	628.9325	1.6	630.2698 ⁸	630.2686	1.9
Trp ¹²³	CKGTDVQAWIR	([M+3H] ³⁺)	742.3564 ⁹	742.3553	1.5	743.6933 ¹⁰	743.6915	2.4

(1): fórmula molecular: $\text{C}_{74}\text{H}_{108}\text{N}_{26}\text{O}_{25}$ e massa exata 1760.7978; (2): fórmula molecular: $\text{C}_{74}\text{H}_{108}\text{N}_{26}\text{O}_{24}^{18}\text{O}$ e massa exata 1762.8021; (3): fórmula molecular $\text{C}_{59}\text{H}_{88}\text{N}_{18}\text{O}_{18}$ e massa exata 1336,6523; (4): fórmula molecular $\text{C}_{59}\text{H}_{88}\text{N}_{18}\text{O}_{17}^{18}\text{O}$ e massa exata 1338,6566; (5): fórmula molecular $\text{C}_{94}\text{H}_{145}\text{N}_{31}\text{O}_{30}\text{S}_1$ e massa exata 2220,0494; (6): fórmula molecular $\text{C}_{94}\text{H}_{145}\text{N}_{31}\text{O}_{29}\text{S}_1^{18}\text{O}$ e massa exata 2222,0536; (7): fórmula molecular $\text{C}_{79}\text{H}_{109}\text{N}_{27}\text{O}_{26}\text{S}$ e massa exata 1883.7757; (8): fórmula molecular $\text{C}_{79}\text{H}_{109}\text{N}_{27}\text{O}_{24}\text{S}^{18}\text{O}_2$ e massa exata 1887.7842; (9): fórmula molecular $\text{C}_{93}\text{H}_{145}\text{N}_{31}\text{O}_{31}\text{S}$ e massa exata 2224.0443; (10): fórmula molecular $\text{C}_{93}\text{H}_{145}\text{N}_{31}\text{O}_{29}\text{S}^{18}\text{O}_2$ e massa exata 2228.0528.

Tabela 10. Ligações cruzadas identificados entre Trp oxidados e quinurenina

Resíduo	Peptídeo	Carga	Oxigênio não marcado (^{16}O)			Oxigênio marcado (^{18}O)		
			Massa observada	Massa teórica	Error (ppm)	Massa observada	Massa teórica	Erro (ppm)
Trp ⁶²	WWCNDGR	([M+3H] ³⁺)	669.2670 ¹	669.2654	2.4	670.6027 ²	670.6015	1.8
Trp ¹²³	CKGTDVQAWIR	([M+3H] ³⁺)	704.0288	704.0273	2.1	705.3647	705.3635	1.7

(1): fórmula molecular $\text{C}_{85}\text{H}_{112}\text{N}_{28}\text{O}_{26}\text{S}_2$ e massa exata 2004.7744; (2): fórmula molecular $\text{C}_{85}\text{H}_{112}\text{N}_{28}\text{O}_{24}\text{S}_2^{18}\text{O}_2$ e massa exata 2008.7828; (3): fórmula molecular $\text{C}_{91}\text{H}_{144}\text{N}_{28}\text{O}_3$.

4.6. Identificação e caracterização do cross-link 2-oxo-His-His e 2-oxo-His-Lys

Foi observada a formação de ligação cruzada entre a 2-oxo-histidina e a histidina não modificada para o peptídeo H¹⁵GLDNYR²¹. Os íons duplamente carregados observados, foram os de m/z 881,4073 com oxigênio-16 e m/z 882,4098 utilizando oxigênio-18 marcado. Ligação cruzada entre a 2-oxo-His¹⁵ e a His¹⁵ não modificada foram observados nas reações utilizando DHPN¹⁶O₂ e DHPN¹⁸O₂ nas diferentes condições de pH avaliadas, além de, ser identificada na foto-oxidação com RB. Os espectros de MS e MS/MS estão apresentados na Figura 45. A fragmentação levou a total identificação dos íons da série b- e y- e estão consistentes com a proposta para a ligação cruzada (Tabela A13). Série y₁ ao y₆ correspondes a íons produtos, de acordo com o peptídeo não modificado sem a ligação cruzada, enquanto que, a série b₁ ao b₆ são equivalentes a fragmentos com a ligação cruzada entre 2-oxo-His¹⁵ e a His¹⁵ não modificada. Os íons b- em vermelho correspondem a um acréscimo de massa de 2 Da, referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 45 Espectros duplamente carregados referentes a ligação cruzada 2-oxo-His-His. (a): espectro nLC-MS com m/z 881,4073 corresponde a ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 882,4098 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 881,4073; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 882,4098. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

A lisozima possui seis resíduos de lisina em sua estrutura primária: lys¹, lys¹³, lys³³, lys⁹⁶, lys⁹⁷ e lys¹¹⁶. Todos os resíduos estão dispostos na região hidrofóbica da proteína e foi investigado a formação da ligação cruzada com a

histidina oxidada. Dentre todos os resíduos de lisina presentes na lisozima, foram identificadas duas ligações cruzadas entre a Lys¹ e Lys¹¹⁶ com a 2-oxo-His¹⁵. As ligações cruzadas foram identificadas em todos os experimentos de MS na faixa de pH 7,4, 9,6 e 11,4.

Os íons duplamente carregados para a ligação cruzada com a lys¹ foram identificados com *m/z* de 669,3346 e 670,3371, respectivamente para o oxigênio não marcado ¹⁶O e marcado ¹⁸O. Enquanto que, os íons triplamente carregados para a ligação cruzada com a lys¹¹⁶ foram identificados com *m/z* de 741,0251 com oxigênio-16 e *m/z* 741,6932 utilizando oxigênio-18 marcado. Os espectros de MS e MS/MS estão ilustrados nas Figura 46 e Figura 47 para a ligação cruzada com a Lys¹ e a Lys¹¹⁶, respectivamente.

Figura 46 Espectros duplamente carregados referentes a ligação cruzada 2-oxo-His-Lys¹. (a): espectro nLC-MS com m/z 669,3346 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 670,3371 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 669,3346; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 670,3371. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

Figura 47 Espectros triplamente carregados referentes a ligação cruzada 2-oxo-His-Lys¹¹⁶. (a): espectro nLC-MS com m/z 741.0251 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 741.6932 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 741.0251; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 741.6932. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 2 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18

Os experimentos de MS/MS obtidos por fragmentação por CID dos respectivos íons precursores levaram a formação dos respectivos íons produtos referentes a série b- e y- consistentes com a estrutura proposta para ambos compostos, confirmando a formação da ligação cruzada entre o resíduo de 2-oxo-His e as (Tabela A14 e A15). A série y- identificada de y₁ a y₆ é a mesma para todas as diferentes ligações cruzadas com o resíduo de Lys; são referentes aos fragmentos de íons y- gerados pela clivagem da ligação peptídica em H¹⁵GLDNYR²¹.

4.7. Identificação e caracterização do cross-link 2-oxo-His-Trp e Trp[O]-Trp[O]-

Dentre todos os resíduos de Trp presentes na lisozima e diferentes íons monitorados, foram identificados e caracterizados por MS e MS/MS as ligações cruzadas com os resíduos Trp⁶² e Trp¹²³. O monitoramento foi realizado nas reações da lisozima utilizando RB como fotossensibilizador e nas oxidações com diferentes valores de pH com DHPN¹⁶O₂ e DHPN¹⁸O₂, sendo identificados apenas nas reações em pH 5,0 e 7,4.

A formação da ligação cruzada entre o peptídeo com 2-oxo-His e o Trp⁶² no peptídeo W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ (Figura 48) foram identificados às triplas cargas com m/z de 628,9335 e 630,2698, assim como, a m/z de 742,3564 e 743,6933 para o Trp¹²³ em CKGTDVQAWIR (Figura 49), respectivamente com os isótopos de ¹⁶O e ¹⁸O.

As ligações cruzadas entre os dois resíduos de Trp oxidados foram identificadas às triplas cargas com m/z de 669,2679 e 670,6027 no peptídeo W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ (Figura 50) e quatro cargas com m/z de 704,0288 e 705,3647 para o peptídeo GTDVQAWIR (Figura 51), respectivamente com os isótopos de ¹⁶O e ¹⁸O. Os produtos formados e a fragmentação por CID dos respectivos íons da série b- e y- são consistentes com a estrutura proposta para os dois compostos. A fragmentação levou a total identificação da série de íons para todos os compostos (Tabela A16, A17, A18 e A19).

Figura 48 Espectros duplamente carregados referentes a ligação cruzada oxo-His-Trp⁶²[O]. (a): espectro nLC-MS com m/z 628,9335 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 630,2698 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 628,9335; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 630,2698. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18

Figura 49 Espectros triplamente carregados referentes a ligação cruzada oxo-His-Trp¹²³[O]. (a): espectro nLC-MS com m/z 742,3564 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 743,6933 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 742,3564; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 743,6933. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18

Figura 50 Espectros duplamente carregados referentes a ligação cruzada Trp¹²³[O]- Trp¹²³[O]. (a): espectro nLC-MS com m/z 669,2670 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 670,6027 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 669,2670; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 670,6027. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18

Figura 51 Espectros duplamente carregados referentes a ligação cruzada Trp⁶²[O]-Trp⁶²[O]. (a): espectro nLC-MS com m/z 704,0288 corresponde ao ligação cruzada não marcado com oxigênio-16; (b) espectro nLC-MS com m/z 705,3647 corresponde ao ligação cruzada marcado com oxigênio-18; (c): espectro nLC-MS/MS com m/z 704,0288; (d) espectro nLC-MS/MS com m/z 705,3647. Os íons b em vermelho corresponde ao acréscimo de 4 Da de massas referente ao isótopo do oxigênio-18.

4.8. Quantificação relativa dos cross-links obtidos nas reações em diferentes condições de pH

Os diferentes cross-links avaliados e formados foram quantificados após a extração dos respectivos íons gerados, os cromatogramas extraídos para as diferentes *m/z* estão apresentados na Figura 52. A formação de 2-oxo-His-His foi verificada em toda a faixa de pH avaliada. Para formação dos cross-links com os resíduos de Lys, somente não foram encontrados em pH 5.0. Em contrapartida, os cross-links formados com e entre os resíduos de triptofano oxidados foram apenas encontrados em pH 5,0 e 7,4.

Os gráficos comparativos em porcentagem para os diferentes pHs 5.0, 7,4, 9,6 e 11,4 estão apresentados na Figura 53. Em linhas gerais, os valores obtidos para a formação ficaram entre 2,42 a 11,28%. Em pH fisiológico, a maior porcentagem obtida foi para o cross-links 2-oxo-His-His com 6.97%. O aumento do pH acarretou um aumento da porcentagem de formação para os produtos com os resíduos de His e Lys, em acordo, com o gráfico de titulação desses aminoácidos, que se tornam desprotonados e mais reativos e susceptíveis a ataque nucleofílico. As ligações com os resíduos de Trp ficaram entre 2,42 a 3,28%.

Figura 52 Cromatogramas dos espectros extraídos (EIC) dos diferentes dímeros formados em solução na reação da lisozima e DHPN¹⁶O₂ em diferentes condições de pH. (a): EIC para a formação do dímero oxo-His-His; (b): EIC para a formação do dímero 2-oxo-His-Lys¹; (c): EIC para a formação do dímero 2-oxo-His-Lys¹¹⁶; (d): EIC para a formação do dímero oxo-His-Trp⁶²[O]; (e): EIC para a formação do dímero oxo-His-Trp¹²³[O]; (f): EIC para a formação do dímero Trp¹²³[O]- Trp¹²³[O]; (f): EIC para a formação do dímero Trp⁶²[O]- Trp⁶²[O].

Figura 53 Gráficos comparativos da formação de cross-links em porcentagem para os diferentes pHs; (a) 5,0; (b) 7,4; (c) 9,6 e (d) 11,4. Representam a média de três análises independentes realizadas sequencialmente no mesmo dia.

4.9. Análise por LC-MS e SDS-PAGE das proteínas do olho bovino

Os sete pares de olhos bovinos foram avaliados por SDS-PAGE utilizando-se 15% de SDS, a separação obtida está apresentada na Figura 54. Duas bandas intensas são verificadas em aproximadamente 10 e 20 kDa, além de diversas bandas entre 25 e 55 kDa.

As proteínas extraídas dos olhos bovinos foram investigadas por LC-UHR-ESI-Q-TOF-MS. Os resultados obtidos para um par de olhos estão apresentados na Figura 54. Na Figura 55 (a) tem-se os espectros multi-carregados para as proteínas identificadas, enquanto que os espectros deconvoluídos, com as respectivas massas médias na região de 0 a 100 kDa, estão apresentados na

Figura 55 (b). As Figura 55 (c) e (d) apresentam as ampliações nas regiões de massas em torno de 20 kDa e 40 kDa, respectivamente. Além disto, na Figura 55 (e) é apresentado a massa média do monômero do cristalino com massa intensa em 11,991.10.

Figura 54 Análise por SDS-PAGE das proteínas extraídas dos diferentes pares de olhos bovinos. (total 7 pares, D=olho direito; E=olho esquerdo).

Figura 55 Espectros de massas obtidos a partir de LC-MS das proteínas extraídas do olho bovino. (a) espectro de massas multi carregado; (b) espectro de massas deconvoluido na região de m/z 0 – 100 kDa; (c) ampliação do espectro de massas deconvoluido na região de m/z 20000; (d) ampliação do espectro de massas deconvoluido na região de m/z 40000; (e) espectro de massas deconvoluido do monômero com m/z 11991,0928.

4.10. Análise por nLC-MS/MS das proteínas do olho bovino

Os diferentes pares de proteínas extraídos dos olhos bovinos foram digeridos com tripsina e analisadas através de nLC-MS/MS utilizando-se o orbitrap Figura 56. As proteínas identificadas foram identificadas a partir do banco de dados Mascot.

As proteínas identificadas foram identificadas a partir do banco de dados Mascot. Os sete pares apresentaram um total de 14 proteínas proteoformas para o cristalino. Os resultados para uma amostra estão sumarizados na Tabela 11. Diferentes tipos de modificações foram avaliados, sendo verificada principalmente a formação de deaminações, porém foi verificada oxidação para os resíduos de metionina, tirosina, triptofano, histidina e formação de oxo-histidina. Nas tabelas 12 e 13 são apresentados os dados identificados para os peptídeos modificados as proteínas alfas cristalinos cadeias A e B que apresentaram 100% de cobertura da sequência proteica.

Sequencialmente, as proteínas presentes nos olhos bovinos foram analisadas buscando a identificação de formação de dimerização proteica entre resíduos de histidina, com ênfase para a busca do dímero 2-oxo-His-His. Os dados obtivos são apresentados na Figura 57.

Figura 56 Cromatogramas do massas (BPC) obtidos por nLC-MS/MS da digestão trípica das proteínas do olho bovino.

Tabela 11 Resultados das diferentes isoformas do cristalino identificadas da digestão total (100 µg) das proteínas extraídas do olho bovino.

Accession	Score	Mass	Num. of matches	Num. of significant matches	Num. of sequences	Num. of significant sequences	emPAI	Description
P02470	9761	19835	466	342	39	30	56905.98	Alpha-crystallin A (chain CRYAA
P02510	6217	20024	334	233	39	30	53690.26	Alpha-crystallin B (chain CRYAB
P02522	5215	23397	497	285	49	41	59441.62	Beta-crystallin B2 (CRYBB2)
P11843	4684	25571	393	209	35	28	118009.4	Beta-crystallin A3 (CRYBA1)
P11842	2047	24130	165	100	23	18	583.84	Beta-crystallin A4 (CRYBA4)
P06504	3292	21256	229	147	30	26	82343.63	Beta-crystallin S (CRYGS)
P19141	2752	24427	244	128	41	26	13299.25	Beta-crystallin B3 (CRYBB3)
P07318	1964	28354	222	101	46	32	989.21	Beta-crystallin B1 (CRYBB1)
P26444	1504	22445	112	64	22	18	346.51	Beta-crystallin A2 (CRYBA2)
P02526	1196	21482	137	66	29	17	244.42	Gamma-crystallin B (CRYGB)
Q28088	784	21431	112	49	28	15	77.73	Gamma-crystallin C (CRYGC)
P23005	664	21358	129	44	30	14	92.14	Gamma-crystallin F (CRYGF)
P08209	363	21138	100	25	25	11	18.2	Gamma-crystallin D (CRYGD)
O97764	892	35532	57	41	25	22	14.89	Zeta-crystallin (CRYZ)

Tabela 12 Peptídeos modificados hidrolisados com tripsina referentes à proteína alfa-cristalino cadeia A e identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS no cristalino do olho.

m/z observada [M+n] ⁽ⁿ⁺⁾	Mr (expt)	Mr (calc)	Erro (ppm)	Score	Peptídeo
368,8283	1103,4632	1103,4632	-0,031	14	R.QDDHGYISR.E + oxo-His (H)
603,329	1806,9651	1806,9476	9,71	32	R.QSLFRTVLDSGISEVR.S + Deamidated (NQ)
651,3217	1300,6288	1300,6299	-0,86	52	K.VQEDFVEIHGK.H + Deamidated (NQ)
434,5517	1300,6334	1300,6299	2,64	44	K.VQEDFVEIHGK.H + Deamidated (NQ)
543,2443	1626,7112	1626,7135	-1,4	39	K.HNERQDDHGYISR.E + Deamidated (NQ)
814,3637	1626,7128	1626,7135	-0,42	13	K.HNERQDDHGYISR.E + Deamidated (NQ)
407,6855	1626,7129	1626,7135	-0,35	36	K.HNERQDDHGYISR.E + Deamidated (NQ)
543,2452	1626,7139	1626,7135	0,24	41	K.HNERQDDHGYISR.E + Deamidated (NQ)
613,2988	1836,8745	1836,8755	-0,55	65	K.VQEDFVEIHGKHNER.Q + Deamidated (NQ)
460,2259	1836,8746	1836,8755	-0,46	44	K.VQEDFVEIHGKHNER.Q + Deamidated (NQ)
368,386	1836,8937	1836,8755	9,94	28	K.VQEDFVEIHGKHNER.Q + Deamidated (NQ)
973,2201	3888,8515	3888,8146	9,49	15	R.LPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPKIPSGVDAGHSER.A + 2 Deamidated (NQ)
819,0743	2454,2012	2454,2067	-2,25	29	K.HFSPEDLTVKVQEDFVEIHGK.H + Deamidated (NQ)
491,852	2454,2238	2454,2067	6,95	6	K.HFSPEDLTVKVQEDFVEIHGK.H + Deamidated (NQ)
614,5634	2454,2243	2454,2067	7,18	67	K.HFSPEDLTVKVQEDFVEIHGK.H + Deamidated (NQ)
895,0969	2682,2688	2682,2517	6,4	78	R.LPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK.I + Deamidated (NQ)
1342,1433	2682,272	2682,2517	7,59	49	R.LPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK.I + Deamidated (NQ)
1001,4841	3001,4305	3001,4161	4,79	120	R.YRLPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK.I + Deamidated (NQ)
751,3661	3001,4353	3001,4161	6,39	94	R.YRLPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK.I + Deamidated (NQ)
1122,553	3364,6372	3364,622	4,51	33	R.YRLPSNVDQSALSCSLADGMLTFSGPK.I + Deamidated (NQ)
972,9686	3887,8454	3887,8306	3,82	31	R.LFDQFFGEGLFEYDLLPFLSSTISPYR.Q + Deamidated (NQ)

Tabela 13 Peptídeos modificados hidrolisados com tripsina referentes à proteína alfa-cristalino cadeia B e identificados através de sequenciamento por nLC-MS/MS no cristalino do olho.

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Score	Peptide
368.8404	1103.4993	1103.4996	-0.22	9	R.QDEHGFISR.E + Oxidation (HW)
597.3113	1192.6081	1192.6088	-0.54	44	K.DRFSVNLDVK.H + Deamidated (NQ)
707.3525	2119.0358	2119.0368	-0.46	23	R.APSWIDTGLSEMRLEKDR.F + Oxidation (M)
739.8497	1477.6848	1477.6871	-1.59	51	R.APSWIDTGLSEMR.L + Oxidation (HW)
739.8509	1477.6872	1477.6871	0.047	61	R.APSWIDTGLSEMR.L + Oxidation (M)
414.6938	1654.7461	1654.7448	0.77	9	K.HEERQDEHGFISR.E + Oxidation (HW)
553.2658	1656.7754	1656.7757	-0.17	5	R.QDEHGFISREFHR.K
616.9768	1847.9085	1847.9087	-0.13	44	R.APSWIDTGLSEMRLEK.D + Oxidation (M)
929.8043	2786.391	2786.3736	6.23	19	K.VLGDVIEVHGKHEERQDEHGFISR.E + Deamidated (NQ)
530.0417	2116.1377	2116.1204	8.16	51	R.FSVNLDVKHFSPEELKVK.V + Deamidated (NQ)
424.2351	2116.1389	2116.1204	8.73	21	R.FSVNLDVKHFSPEELKVK.V + Deamidated (NQ)
530.7668	2119.038	2119.0368	0.59	18	R.APSWIDTGLSEMRLEKDR.F + Oxidation (M)
433.0273	2160.1003	2160.0851	7.02	24	K.DRFSVNLDVKHFSPEELK.V + Deamidated (NQ)
478.4607	2387.2669	2387.2485	7.72	41	K.DRFSVNLDVKHFSPEELKVK.V + Deamidated (NQ)
597.8240	2387.267	2387.2485	7.74	49	K.DRFSVNLDVKHFSPEELKVK.V + Deamidated (NQ)
1298.180	2594.3454	2594.3439	0.58	111	R.IPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPR.K + Deamidated (NQ)
865.7897	2594.3472	2594.3439	1.28	94	R.IPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPR.K + Deamidated (NQ)
681.6169	2722.4385	2722.4389	-0.13	37	R.IPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPRK.Q + Deamidated (NQ)
908.4869	2722.4388	2722.4389	-0.028	89	R.IPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPRK.Q + Deamidated (NQ)
558.2856	2786.3916	2786.3736	6.47	33	K.VLGDVIEVHGKHEERQDEHGFISR.E + Deamidated (NQ)
971.8485	2912.5238	2912.5244	-0.19	91	K.YRIPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPR.K
729.3842	2913.5077	2913.5084	-0.21	68	K.YRIPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPR.K + Deamidated (NQ)
972.1775	2913.5105	2913.5084	0.74	105	K.YRIPADVDP LAITSSSSDGVLT VNGPR.K + Deamidated (NQ)

603.7178	3013.5526	3013.537	5.18	15	K.VKVLGDVIEVHGKHEERQDEHGFISR.E + Deamidated (NQ)
1014.8749	3041.6029	3041.6033	-0.15	106	R.KYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPR.K + Deamidated (NQ)
1521.8098	3041.605	3041.6033	0.57	15	R.KYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPR.K + Deamidated (NQ)
761.4088	3041.6061	3041.6033	0.91	85	R.KYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPR.K + Deamidated (NQ)
793.4321	3169.6993	3169.6983	0.34	69	R.KYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRK.Q + Deamidated (NQ)
1057.5739	3169.6999	3169.6983	0.5	26	R.KYRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRK.Q + Deamidated (NQ)
862.9535	3447.7851	3447.7845	0.16	52	R.IPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRKQASGPER.T + Deamidated (NQ)
863.2037	3448.7858	3448.7685	5.01	66	R.IPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRKQASGPER.T + 2 Deamidated (NQ)
754.4010	3766.9685	3766.949	5.19	87	K.YRIPADVDPLAITSSLSSDGVLTVNGPRKQASGPER.T + Deamidated (NQ)

Figura 57 Identificação de formação de ligação cruzada 2-oxo-His-His entre proteínas presentes em lentes de olhos bovinos.

5. Discussão

O objetivo deste trabalho foi investigar a oxidação com $^1\text{O}_2$ em proteínas, dessa forma escolheu-se a lisozima como proteína modelo porque é uma proteína pequena (129 aminoácidos) com apenas um resíduo de histidina, seis de triptofano e duas metioninas. A lisozima é facilmente acessível e apresenta características notáveis, como o baixo custo e a conformação tridimensional bem caracterizada.

As lisozimas são definidas como uma 1,4- β -*N*-acetil muramidase e são responsáveis por destruir a parede celular de bactérias, através da clivagem das ligações glicosídicas entre os carbonos C-1, do ácido *N*-acetil murâmico e o carbono C-4, da *N*-acetil glucosamina em peptideoglicanos. (Jollès e Jollès, 1984).

O sítio catalítico da lisozima contém dois grupos carboxil oriundos de dois resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo, o Glu-35 e o Asp-52. O grupo carboxil do Glu-35 em sua forma não ionizada é um doador de próton, enquanto que o Asp-52, em sua forma ionizada, estabiliza-o através de uma interação eletrostática, formando um carbocátion estável intermediário oxônio. O Asp-52 é rodeado por vários resíduos polares conservados e formam uma complexa rede de ligações de hidrogênio e fica carregado negativamente na faixa de pH 3 e 8. O grupo carboxila do Glu-35 encontra-se em um bolsão predominantemente apolar e permanece protonado em valores de pH extremamente altos

O mecanismo de hidrólise (Blake et al. 1967) apresenta que a lisozima primeiramente se liga através de uma ligação de hidrogênio e por forças eletrostáticas, ao polissacarídeo da parede celular bacteriana, formadas por alternadas unidades de *N*-acetilglicosamina (NAG) e ácido *N*-acetilmurâmico (NAM). Neste processo, o anel do resíduo NAM torna-se distorcido e contribui para a formação de íon carbânio no carbono C-1, levando conseqüentemente ao enfraquecimento da ligação carbono-oxigênio do C-1. O resíduo de Asp-35 atua como um doador de próton facilitando a formação de um grupo hidroxil com o átomo de oxigênio (O1) do anel Asp. A ligação C1-O1 é heteroliticamente clivada, liberando o resíduo adjacente NAG, formando em C-1, um íon oxônio que é

estabilizado por ressonância. Além disso, o grupo carboxila ionizado de Asp-52 atua também estabilizando o íon oxônio por interações carga-carga. Em sequência, o resíduo de Glu é hidrolisado, produzindo um intermediário glicosil-enzima catiônica não covalente. Finalmente, uma molécula de água ataca o íon carbânio completando a hidrólise. A enzima libera como produto o anel de Asp com seu sacarídeo ligado, completando o processo catalítico.

A lisozima já foi fotooxidada por oxigênio singlete molecular com a utilização de diferentes fotossensibilizadores e luz, entretanto os produtos gerados foram pouco explorados e ainda necessitam de caracterização (Lissi *et al.*, 2000). Diversos outros oxidantes foram também investigados frente à lisozima, tais como ozônio (Dooley & Mudd, 1982), ácido hipocloroso (Hawkins & Davies, 2005) e peroxinitrito (Augusto *et al.*, 2009). Até o momento, nenhum trabalho visando a geração química de oxigênio singlete (com e sem marcação isotópica) sem a presença de luz foi descrito.

Geração química de $^1\text{O}_2$, por via química, em ambiente aquoso, tem sido investigada e são requeridas para o estudo da reatividade do $^1\text{O}_2$ com diferentes biomoléculas (Martinez *et al.*, 2000). Os primeiros endoperóxidos estudados foram os derivados do rubreno e antraceno, entretanto, eles geravam oxigênio apenas em condições de refluxo, descartando a sua utilização em sistemas biológicos (Turro & Chow, 1981). Os endoperóxidos derivados do antraceno com substituintes metóxi liberam quantidades razoáveis de $^1\text{O}_2$ em baixa temperatura. Entretanto, os endoperóxidos de naftalenos tornaram-se mais eficientes na geração de $^1\text{O}_2$. Diversos aspectos relacionados à substituição do anel aromático mostraram a importância de estabilização do endoperóxido. Estudos com a utilização do 1,4-difenilnaftaleno não foram positivos e apenas, com a síntese do 1,4-dimetoxi-5,8-difenilnaftaleno (HMN) foi possível o isolamento e caracterização do endoperóxido. A síntese de um derivado éter do HMN levou a formação de um composto com cadeia lateral dihidroxipropil com reatividade, com o $^1\text{O}_2$, 500 vezes maior que o HMN, entretanto, o endoperóxido formado se mostrou (Pierlot *et al.*, 2000). O problema decorre das duas possíveis posições de formação do endoperóxido, a 1,4 e 5,8. Quando um grupo metilênico separa o oxigênio do anel

aromático, a reatividade é 10 vezes menor do que com a cadeia lateral dihidroxipropil.

Todavia, a formação de endoperóxido na posição 5,8 tinha sido demonstrada na síntese do *N,N',N'',N'''*-tetrakis(2,3-dihidroxipropil)2,2'-(naftaleno-1,4-diilddimetil)bis(malonamida) sugerindo que efeitos eletrônicos e estéricos afetam a regioseletividade da adição [4+2] do $^1\text{O}_2$ ao anel aromático, sendo também demonstrado que sua decomposição é mais lenta quando comparado com a posição 1,4.

Dessa forma, neste trabalho foi utilizado como gerador de $^1\text{O}_2$ o endoperoxido DHPNO₂. A termólise de endoperoxidos tem sido utilizada como fonte limpa e útil de $^1\text{O}_2$. A decomposição térmica de DHPN¹⁶O₂ e DHPN¹⁸O₂ gera $^1\text{O}_2$ estequiometricamente e é uma fonte limpa de oxigênio singlete, com um rendimento de 59% a 37 °C. Pierlot *et al.*, 2000 descreveram que a 37°C são necessários 23 minutos para que 50% do oxigênio seja liberado no meio, e para a liberação de 95% são necessários 99 minutos. Com isso, a 37°C a constante *k* é de $5,02 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. A termólise do endoperóxido naftalénico segue uma cinética de primeira ordem com uma constante de velocidade *k*. O tempo de meia vida de decomposição é então dado por: $t_{50\%} = \ln 2 / k$. A termólise é praticamente finalizada após 150 min de incubação a 37 °C (Martinez Let *et al.*, 2000).

A constante de velocidade é apenas dependente da temperatura, influenciando assim a velocidade da reação. Desta forma, a termólise do endoperóxido e a oxidação da lisozima foi também avaliada a 50°C; o aumento da temperatura leva a uma maior concentração de oxigênio singlete liberada no meio reacional no mesmo intervalo de tempo.

A utilização de DHPNO₂ com isótopos de oxigênio-16 e marcado com oxigênio-18 representa uma metodologia eficiente para o estudo da reação entre os resíduos de aminoácidos e o $^1\text{O}_2$, uma vez que é a única espécie reativa de oxigênio gerada no meio reacional. As metodologias para formação $^1\text{O}_2$ com a utilização de fotossensibilizadores envolvem a absorção de um fóton de luz pelo sensibilizador no estado fundamental elevando-se ao estado excitado singlete que transfere energia para seu estado triplete. Uma vez formado o oxigênio no estado

triplete, este poderá decair ao estado fundamental, com liberação de fosforescência ou reagir através de mecanismos foto-químicos por duas vias reacionais diferentes denominadas do tipo I e II.

No mecanismo de foto-oxidação do tipo I haverá transferência de elétrons que geram íons radicais que interagem com o oxigênio. Já no mecanismo do tipo II, tem-se uma transferência de energia do estado triplete para o oxigênio no estado fundamental gerando oxigênio no estado singlete. Em ambos os casos se tem a formação de produtos oxidados. Estes processos poderão ocorrer simultaneamente, sendo influenciados principalmente pela transferência de energia do sensibilizador, sua concentração e disponibilidade de oxigênio no meio reacional.

A utilização de DHPNO₂ ou os correspondentes endoperóxidos de naftaleno marcados com [¹⁸O], em associação com análises de espectrometria de massa são altamente eficientes e adequados para estudos de reações destinadas na elucidação de mecanismos de reação do ¹O₂ com aminoácidos ou com biomoléculas, tais como proteínas. Além disso, uma abordagem baseada em espectrometria de massa leva a identificação de fragmentos iônicos característicos e seqüenciamento de peptídeos modificados. Até o presente momento, a oxidação de proteínas pelo oxigênio singlete usando átomos de ¹⁸O e caracterização por espectrometria de massa não foram descritas.

A caracterização dos peptídeos modificados foi baseada na nomenclatura proposta por Roepstorff-Fohlmann Biemann, 1984, os sequenciamentos foram realizados manualmente com o auxílio das fragmentações teóricas para cada peptídeo. Os íons utilizados para o sequenciamento foram os íons da série b- e y-, decorrentes da clivagem da ligação C-N da ligação peptídica. As regiões correspondentes a baixas massas foram verificadas, a fim de identificar os imônios modificados pelo oxigênio singlete.

Kerkaert, *et al.*, 2013 identificaram peptídeos modificados da lisozima apenas através de LC-TOF-MS, sem nenhuma informação estrutural sobre a sequência e caracterização dos peptídeos. Neste trabalho de doutorado, tem-se a

total caracterização dos aminoácidos oxidados pelo oxigênio singlete, tais como os resíduos de metionina, triptofano e histidina.

O resíduo de metionina é estruturalmente importante em diversas enzimas, tal como a lisozima, pois é responsável por acarretar estabilidade a proteína através de interações hidrofóbicas. Além disso, a metionina interage com resíduos de aminoácidos que contêm anéis aromáticos, levando a estabilidade adicional (Valley, *et al.*, 2012). Todavia, a oxidação da metionina e a formação do respectivo sulfóxido (MetSO) leva a diminuição da hidrofobicidade e ao perturbamento das interações de dispersão e eletrostáticas com os resíduos aromáticos (Vogt, 1995). A oxidação da metionina leva a uma modificação pós-traducional, ocasionando mudanças conformacionais e perda de função proteica (Chao *et al.*, 1997) além de estar envolvida em processos patofisiológicos, como câncer, envelhecimento e doenças neurodegenerativas (Stadtman *et al.*, 2005).

A oxidação da metionina pode ser reparada, ao contrário dos outros resíduos de aminoácidos. A maioria das células possuem duas diferentes enzimas, que catalisam e reduzem o respectivo sulfóxido ao resíduo de metionina. Essas enzimas são redutases conhecidas como metionina sulfóxido redutases – MsrA e MsrB. Essa função reparadora representa uma resposta evolutiva a danos induzidos por oxigênio na atmosfera terrestre. Particularmente, as exposições dos resíduos de metionina atuam como um antioxidante endógeno, e representam uma proteção oxidativa para outros resíduos de aminoácidos em um ambiente de estresse oxidativo (Garner *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 1996).

A constante de velocidade de reação do $^1\text{O}_2$ com a metionina é de $1,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. A reação de foto-oxidação dos resíduos da metionina é dependente do pH. Propõe-se que a oxidação ocorra através da formação de uma espécie zwitterionica **1** ($\text{R}_2\text{S}^+-\text{OO}^-$) em $\text{pH} \leq 6$, reagindo com uma segunda molécula de metionina para formar duas moléculas de sulfóxido **2** (MetSO). Em pH básico ($\text{pH} \geq 9$), a presença de íons hidroxila (^-OH) ataca o átomo de enxofre acarretando uma substituição do sulfóxido formado, resultando na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma proporção de 1:1. Além disso, intermediários cíclicos estáveis que envolvem o grupo α -amino e o átomo do enxofre do tioéster, com

posterior hidrólise e formação de uma razão 1:1 de MetSO e H₂O₂ tem sido reportado (Straight e Spikes, 1985) esse intermediário cíclico, conhecido como deidrometionina **3**, é formado quando $7 \leq \text{pH} \leq 12$. Os produtos formados nas diferentes condições de pH estão descritos na Figura 58.

Figura 58 Reação da metionina com $^1\text{O}_2$ em diferentes condições de pH.

Estudos em fase gasosa, entre o $^1\text{O}_2$ e o resíduo de metionina foram realizados e monitorados por espectrometria de massas, através de um sistema on line, em modo positivo e negativo e ionização por *Electrospray*; esses estudos demonstraram, assim como em solução, a formação do sulfóxido (MetSO) em ambas condições reacionais, ácidas e básicas (Liu e Liu, 2012).

A histidina (His) contém uma cadeia lateral com um anel imidázol e está presente em sítios ativos de diferentes enzimas. Resíduos de His estão envolvidos na catálise da oxidação reversível de hidrogênio em hidrogenases (Volbeba *et al.*, 1995) e atuam cooperativamente na catálise da tríade Ser-His-Asp em quimiotripsina (Blow *et al.*, 1969).

O resíduo de His isolado apresenta uma constante de velocidade de $10 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a reação química com o $^1\text{O}_2$. A oxidação da His livre e em peptídeos pelo oxigênio singlete, tem sido extensamente estudada (Agon *et al.*, 2006; Tomita *et al.*, 1969) em solução e ocorre via a formação inicial de um ou mais endoperóxidos. Entretanto, apenas recentemente, foi realizado um estudo teórico da foto-oxidação da His (Méndes-Hurtado *et al.*, 2012). A foto-oxidação da His envolve um grupo complexo de produtos formados ainda sem total caracterização. A reação entre His e $^1\text{O}_2$ levará à oxidação do grupo imidazol através da formação de endoperóxidos instáveis por um mecanismo de cicloadição do tipo [1,4]. A reação poderá levar a formação de dois isômeros de endoperóxidos **1** e **2**, uma vez que o anel imidazol possui formas isoméricas. Contudo, endoperóxidos são

extremamente instáveis e formam imidazolonas pela clivagem da ligação O-O, convergindo em peróxidos intermediários **3**, **4** e **5**, 2-oxo-histidina **6** (2-oxo-His) e intermediários de His com incrementos de massas com +32 Da, **7** e **8**; estes possuem dois carbonos eletrofílicos em C4 e C5 e poderão ser atacados nucleofilicamente por uma outra molécula de His levando a formação de dímeros (Shen *et al.*, 2000). Em altas temperaturas os endoperóxidos degradam rapidamente formando diversos produtos, que incluem ácido aspártico, asparagina e úreia (Kai e Suzuki, 1996; Tomita *et al.*, 1968). Os principais produtos formados estão descritos na Figura 59.

Figura 59 Reação da histidina com $^1\text{O}_2$ e principais produtos formados

Liu *et al.* 2014 investigaram a reação de oxidação da His em solução em diferentes pHs, por espectrometria de massas em tempo real nos modos positivo e negativo, e chegaram na conclusão de que a reação em pH 10,4 é muito mais rápida que em pH 7,4; demonstraram a formação dos compostos com adição de dois átomos de oxigênio, como sendo os compostos majoritários. Entretanto, em solução básica houve a identificação de um dímero de histidina-histidina oxidado.

Uma característica única da foto-oxidação da His é a dependência dos valores de pH do meio reacional. A oxidação não é relevante em pH abaixo de 6,0, aumentando acima desse valor até pH 8 (Weil *et al.*, 1965). A dependência da

reatividade do resíduo de His é devida a curva de titulação do imidazol (pK_a 6,04), que influencia seus estados de ionização. A His é o terceiro maior amino ácido básico e o único resíduo que pode apresentar-se neutro, protonado e desprotonado em pH fisiológico

A absorção de radiação na região do UV-vis pelo resíduo de His (210 nm) é baixa e o mecanismo radicalar não é favorecido (Huvaere e Skibsted, 2009). A oxidação da His, e outros derivados de imidazóis, são extremamente influenciados pela presença desses nitrogênios. Iminas apresentam facilidade em formar complexos com prótons, ácidos de Lewis e moléculas de solventes próticos, via formação de ligação de hidrogênio levando a uma deslocalização da densidade eletrônica do anel imidazólico. Como consequência, o grupo retirador prejudica a densidade eletrônica, e protege o resíduo de Histidina contra espécies reativas. Supoe-se que o radical histidinil esteja envolvido apenas em pequenos processos de degradação. Pela mesma razão, a foto-oxidação, por mecanismo não radicalar do tipo II, com o envolvimento do oxigênio singlete, é considerada mais importante que o mecanismo via transferência de elétrons (Agon *et al.*, 2006). Além disso, estudos envolvendo a formação de agregados entre a lisozima e a SOD através de mecanismos radicalares foram investigados por Paviani *et al.*, 2015, entretanto os resultados obtidos não levaram a oxidação do resíduo de histidina neste sistema radicalar.

A oxidação do citocromo C pelo 1O_2 foi realizada por Kim *et al.* 2008. Neste trabalho foram caracterizadas diferentes modificações com +14, +16, +26, +32, +34 e -22 Da de duas histidinas, das três histidinas presentes na proteína, entretanto, dentre todas as modificações identificadas, a formação da oxo-histidina (+14 Da) foi a mais expressiva, sendo identificada e quantificada em alta intensidade no modelo avaliado; esta constatação levou a proposta de que a formação de His+14 apresenta-se com alto potencial como biomarcador de 1O_2 em mitocôndrias. Além disso, Au and Madison 2000 identificaram que uma hidroxila foi incorporada com ^{17}O quando 1O_2 foi gerado em $H_2^{17}O$ (Au e Madison, 2000). Dessa forma, as modificações da histidina com +14 e +32 Da parecem ser realmente específicas para oxidações pelo 1O_2 . São necessários ainda, mais

estudos para o total envolvimento do $^1\text{O}_2$ na oxidação de His em meio biológico, haja visto que, os trabalhos neste aspecto são ainda inexpressivos.

O resíduo de triptofano pertence ao grupo dos amino ácidos com substituinte aromático e apresenta uma ocorrência relativamente rara em proteínas (1.4%). O triptofano é constituído de um anel heterocíclico indólico e pode participar de interações hidrofóbicas. Dentre todos os aminoácidos, é o resíduo com a maior área superficial, e conseqüentemente, isso acarreta alta formação de *clusters* com cadeias laterais de resíduos (Samantha *et al.*, 2000). Os “*clusters*” são formados para reduzir os espaços durante o enovelamento proteico e os espaços conformacionais, e ajudar a manter o processo de enovelamento e da estabilidade estrutura (Heringa e Argos 1991). O triptofano desempenha um importante papel na estrutura terciária de diversas proteínas e interage com outras moléculas, bem como, em proteínas de membranas, que apresentam alta abundância desse amino ácido, preferencialmente próximos da interface lipídeo-água (Jesus e Allen, 2013). Dessa forma, alterações por vias biológicas ou químicas dos resíduos de triptofano, nas proteínas, acarretam alterações diretas na estrutura proteica. *In vivo*, os resíduos de triptofano podem sofrer diversas modificações oxidativas, induzidas pela exposição à luz UV e por diversos agentes oxidativos (Perdivara *et. al.*, 2010).

A oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$ tem sido extensamente estudada (Nakagawa *et. al.*, 1975; Nakagawa *et. al.*, 1977; Saito *et al.*, 1977; Rosein *et al.*, 2009). A reação entre o triptofano e o $^1\text{O}_2$ ocorre através de uma reação de adição [2+2] e formação de um intermediário dioxetano **1** instável entre C-2 e C-3 do anel indólico. Além disso, pode reagir através de uma reação Alder-ene levando a formação de dois diastereoisômeros 3-hidroperóxido-pirrol-indólico **2** (hidróperóxidos de triptofano) como produtos principais. A redução dos hidroperóxidos formam a 3-hidroxi-pirrol-indólico **3**. As decomposições desses intermediários formam a *N*-formil-quinurenina (FMK) **4**. A hidrólise da FMK origina a quinurenina (Kn) **5**.

Além disso, foi identificada a formação de dois diastereoisômeros (*R,R* / *S,R* DiOia) **6** a partir da redução do dioxetano (Rosein *et al.*, 2011) através de uma

de clivagem da ligação O-O, seguida de uma transferência intermolecular de próton e um rearranjo interno, que levará aos isômeros. Estudos com o amino ácido isolado demonstram que o composto **2** sofre uma adição intramolecular levando a ciclização e formação de 3 α -hidroperóxido-hexahidro-pirrol-indólico **7**, e o produto reduzido 3 α -hidroxipirrolindólico **8**, entretanto em peptídeos e proteínas esses produtos não são possíveis de serem formados. Os principais produtos estão descritos na Figura 60. Dados cinéticos e estudos mecanísticos com dipetídeos de triptofano demonstraram que a foto-oxidação pelo $^1\text{O}_2$ ocorre de forma similar ao amino ácido isolado (Posadaz *et al.*, 2004). Este não é um comportamento comum em di e polipeptídeos para outros tipos de amino ácidos, cuja ligação peptídica influência consideravelmente na reatividade fotodinâmica (Todorovski *et al.*, 2011). Contudo, demonstrou-se que a reação com peptídeos contendo triptofano forma principalmente os compostos **2** e **3**, e em menores quantidades quinurenina (Plowman *et al.*, 2013).

Figura 60 Mecanismo proposto e possíveis produtos formados na reação entre triptofano e $^1\text{O}_2$.

A grande maioria das investigações da reação do triptofano e $^1\text{O}_2$ foram realizadas em solução, e em condições oxidativas com o auxílio de

fotossensibilizadores; os produtos reacionais foram identificados por técnicas cromatográficas e métodos espectrométricos. Consequentemente, diversos aspectos do mecanismo de oxidação do triptofano, produtos e intermediários envolvidos ainda não foram caracterizados. Um estudo teórico, juntamente com o experimental da reação em fase gasosa com triptofano protonado e a geração química e limpa de $^1\text{O}_2$ foi realizado através de espectrometria de massas, demonstrando que os produtos principais são hidroperóxidos que sofrem eliminações e dão origem a 3-(2-amino-vinil)indól-1-ico, H_2O_2 , CO_2 (Liu *et al.*, 2012).

Plowman *et al.* 2013 identificaram por MS, utilizando peptídeos modelos contendo um resíduo de triptofano, que o ataque do oxigênio singlete favorece vias oxidativas com a formação de quinurenina e seus derivados, através da abertura do anel indol com a formação de FMK. Este estudo levou em comparação resultados utilizando o radical hidroxila e chegou na hipótese de que os produtos derivados de quinurenina podem ser considerados bons marcadores moleculares para a reação via $^1\text{O}_2$.

A lisozima apresenta em sua estrutura seis resíduos de triptofano (Trp²⁸, Trp⁶², Trp⁶³, Trp¹⁰⁸, Trp¹¹¹, Trp¹²³). Neste estudo, com exceção para os resíduos Trp⁶³ e Trp¹¹¹, todos os demais se apresentaram modificados. As oxidações identificadas por UHR-nano-ESI-Q-TOF-LC-MS e MS/MS foram, à adição de massas de +4 Da (descrita como quinurenina), +16 e +32 Da.

Na Figura 61 verificam-se as regiões em que os resíduos de Trp estão na estrutura terciária da proteína. Os resíduos Trp⁶², Trp⁶³, Trp¹⁰⁸ e Trp¹²³ encontra-se em regiões hidrofóbicas, dos quais, o Trp⁶² é o mais disponível para oxidação, enquanto que dos quatro, o resíduo Trp⁶³ encontra-se em uma região próxima a um α -hélice e mais protegido do que os demais. Interessantemente, para o resíduo Trp⁶³ não foi encontrado nenhuma oxidação sendo que o motivo poderia ser devido essa menor hidrofobicidade e influencia na reatividade devido ao Trp⁶².

A constante de reação do $^1\text{O}_2$ depende significativamente em que local o resíduo de triptofano se encontra em uma proteína. Ogilby *et al.*, 2012

demonstraram em solução que a ordem de reatividade depende significativamente do local em que se encontra o resíduo de triptofano e da acessibilidade do $^1\text{O}_2$.

Os resíduos Trp²⁸ e Trp¹¹¹ encontram-se internamente na região hidrofílica da proteína, o que acarreta uma maior barreira física para a oxidação desses resíduos. Além disso, um estudo através de uma metodologia gráfica para a detecção de clusters com cadeias laterais em estruturas tri-dimensionais para a lisozima foi estudado e levou a determinação de sete centros a partir dos resíduos: Tyr²⁰, Phe³, Tyr⁵⁴, Trp¹¹¹, Trp²⁸, Val⁹⁹ (Kannan *et al.*, 1999). Entretanto, o Trp²⁸ foi identificado oxidado nas condições com DHPN¹⁶O₂ a 37 e 50 °C, enquanto que o Trp¹¹¹ foi apenas identificado oxidado nas condições a 50 °C. A lisozima é relativamente estável termicamente nas temperaturas de 25 a 50 °C, dessa forma, a temperatura não foi responsável pela modificação da estrutura proteica de forma a disponibilizar esses resíduos para oxidação, provavelmente o decorrer das oxidações aos outros resíduos disponíveis, levaram a uma alteração na estrutura terciária que acarretou, assim as oxidações do Trp²⁸ e Trp¹¹¹.

Figura 61 Estrutura tridimensional da lisozima com os respectivos resíduos de triptofano em destaque.

Um outro aspecto relevante na oxidação de proteínas é que pode acarretar formação de ligações covalentes entre os aminoácidos. A oxidação leva em muitos casos a uma dimerização covalente e/ou oligomerização definida como ligações cruzadas. Muitas proteínas podem se agrupar (intra e inter molecularmente) na presença de diferentes sensibilizadores. As proteínas apresentam ligações cruzadas intrínsecas nos sistemas biológicos, tais como, as ligações de sulfeto responsáveis pela estabilidade térmica da proteína.

Os efeitos biológicos do $^1\text{O}_2$ tem, há tempos, intrigado os pesquisadores e sugerem que o oxigênio singlete está envolvido na formação de ligações cruzadas (Wlaschek et al., 1995; Kakehashi et al., 1993; Tamura e Ishikawa, 2001; Au e Madison, 2000, Balasubramanian *et al.*, 1990; Wang e Wu 2008; Renston *et al.*, 1980). Entretanto, não existem evidências de caracterização dos produtos formados. Neste aspecto, o segundo passo deste trabalho foi investigar a formação de ligações cruzadas na lisozima, após a oxidação com $^1\text{O}_2$.

Figura 63 apresenta resumidamente, os principais compostos gerados e o possível mecanismo de formação de ligação cruzada com resíduos de His. Teoricamente, a reação leva a quatro possíveis dímeros de His. A reação entre o resíduo de His e o $^1\text{O}_2$ levará aos endoperóxidos estáveis que por clivagem heterolítica, formam os isômeros **1** e **2**. A adição nucleofílica ao composto **1** levará a formação dos isômeros **1a** e **1a'**; estes sofrerão desidratação por eliminação de uma molécula de água formando uma dupla ligação carbono-carbono, e os respectivos compostos **2b** e **2b'**. Os isômeros **2b** e **2b'** possuem estrutura estável devido à efeitos de *ressonância* promovidos pela *conjugação* da dupla ligação. Entretanto, o isômero **1a** apresenta um menor impedimento estérico durante a adição nucleofílica em relação ao composto **1a'**, sendo a estrutura de ressonância mais estável entre os dois produtos. Além disso, uma adição nucleofílica de um resíduo de His ao isômero **2** formará os compostos **2a** e **2b**. Contudo, estes isômeros podem sofrer facilmente uma eliminação de uma molécula de água levando novamente aos intermediários iniciais, as hidroximidazolinonas e a His livre (Shen *et al.*, 1996).

Nos peptídeos o grupo imidazol do resíduo de His é o único grupo funcional disponível para a formação de uma ligação, uma vez que o grupo α -amino não esta disponível. A formação da ligação entre His-His pode ocorrer entre um resíduo modificado e não modificado ou entre dois grupos imidazóis modificados. Modelos utilizando aminoácidos isolados demonstraram que a formação intermolecular entre os resíduos His-His é formada após reação em presença de $^1\text{O}_2$ com diferentes fotossensibilizadores, tais como RB, MB e PP (Verweij e Steveninvk, 1982; Dubbelman *et al.*, 1978). Além disso, foi demonstrada também

a formação de ligação cruzada entre grupos imidazóis de His utilizando copolímeros de *N*-2-hidroxipropil metacrilamida (HPMA) em presença de RB como sensibilizador. Esses estudos com o resíduo de His com o grupo α -amino bloqueado levou a formação majoritária, isolamento e caracterização do composto **1b** descrito na equação 3 (Shen *et al.*, 1996).

Liu *et al.*, 2014 identificaram e caracterizaram a ligação cruzada His-His foto-oxidado no anticorpo IgG1. Os resultados demonstraram que a ligação cruzada foi formada entre dois distintos resíduos de histidina (His²²⁰) a partir de duas unidades proteicas em uma região dobrável altamente flexível e acessível à interação com solvente. A formação da ligação cruzada entre a His oxidada e o resíduo sem modificação obtidos com a lisozima estão consistentes com os dados obtidos neste trabalho. Na Figura 62 esta apresentada a estrutura tridimensional da lisozima e o respectivo resíduo de histidina em destaque; verifica-se que o resíduo se encontra ao final de uma α -hélice e se encontra em uma região hidrofílica bem disponível para a realização de ligações cruzadas.

Figura 62 Estrutura tridimensional da lisozima com o respectivo resíduo de histidina em destaque.

Figura 63 Mecanismo de formação de ligação cruzada entre resíduos de 2-oxo-His-His e 2-oxo-His-Lys a partir dos intermediários formados na oxidação com $^1\text{O}_2$ em proteínas.

A reação do oxigênio singlete com resíduo de His geram os produtos oxidados com +32 e +14 Da que não são observados por outros ROS e podem servir como marcadores *in vivo* para sistemas (Kin *et al.*, 2008) com a formação de $^1\text{O}_2$. Isto foi evidenciado para o resíduo de His²⁶ no citocromo C e em estudos com terapia fotodinâmica (PDT) em que os fotosensibilizadores se acumulam nas mitocôndrias (Giulivi *et al.*, 1990). Desta forma, dímeros formados *in vivo* com resíduos de His oxidados podem também serem utilizados como biomarcadores em sistemas com a formação de oxigênio singlete.

Uma nova possibilidade de ligação cruzada foi identificada com a histidina modificada e o resíduo de lisina. O resíduo de His modificado com +32 Da de massas poderá reagir com o grupo ϵ -amino dos resíduos de Lys, levando a formação dos isômeros **3a** e **3b** (Equação 3). Acredita-se que o composto **3a** seja o produto majoritário, pois a estabilização por ressonância do composto, acoplado ao menor impedimento estérico verificado durante a adição nucleofílica favoreçam a sua formação. O composto **3b** poderá sofrer uma desidratação e regenerar os produtos iniciais; possivelmente sua formação não será expressiva nas condições experimentais realizadas.

A lisina não é um bom nucleófilo. Sabe-se que o pKa do grupo ϵ -amino do resíduo de lisina é 10,53, portanto permanecerá em sua forma protonada na faixa de pH de 2 – 9. Seu ponto isoelétrico é 9,6, nesse valor de pH a carga global da lisina será totalmente igual a zero. Em pH 10,54 tem-se uma desprotonação de 50% do seu grupo ϵ -amino; em pH acima de 11,0 o substituinte do resíduo de lisina estará totalmente desprotonado, e conseqüentemente, disponível para ataque nucleofílico. Todavia, sabe-se que a disposição espacial dos diferentes resíduos na estrutura proteica, a interação com o solvente e o microambiente criado entre os substituintes dos aminoácidos podem interferir nos seus respectivos valores de pKa. Esta interferência poderia ser a responsável pela formação das ligações com os resíduos de Lys mesmo em condições reacionais não favoráveis.

Reações nucleofílicas com resíduos de lisina em condições também não favoráveis são encontradas em trabalhos com citocromo C e aldeídos reativos; o

citocromo C possui um ponto isoelétrico de 9,6 e 19 resíduos de lisina; modificações covalentes da proteína podem modificar a carga da molécula e promover mudanças estruturais e funcionais, e conseqüentemente a formação de adutos com aldeídos com os resíduos básicos através de bases de shift (Sigolo *et al.*, 2007).

Shen *et al.*, 1996 demonstraram que na faixa de pH de 5,0 a 11,4 a reação entre o $^1\text{O}_2$ e uma mistura de peptídeos contendo resíduos de His e Lys em C-terminal tem-se um aumento da eficiência de formação da ligação cruzada com o aumento do pH. Mesmo em condições não favoráveis para a reação do grupo ϵ -amino do resíduo de lys, uma pequena parcela da ligação cruzada com a 2-oxo-His é formada, de qualquer forma em pH 11,4 a porcentagem formada é máxima, exatamente pois em pH bem básico o grupo ϵ -amino encontra-se totalmente desprotonado e reagirá mais rapidamente com as espécies reativas de His.

A oxidação do triptofano pelo $^1\text{O}_2$, como observado na Figura 64, poderá levar a formação de diferentes produtos, além disso, a oxidação em C3 leva a geração de compostos reativos e susceptíveis ao ataque nucleofílico em C2. A hidrólise da FMK levará a formação da quinurenina, que poderá atuar como um nucleófilo, reagindo com espécies com carbonos eletronicamente deficientes. Na Figura 64 é apresentada uma proposta mecanística de formação de dímeros entre resíduos oxidados de His com Trp oxidado e a formação de dímeros decorrente da adição nucleofílica entre kn com Trp oxidado. Dentre todas as aminas, as alifáticas são mais básicas que as aromáticas, as benzoaminas não representam um potencial de nucleofilicidade, fazendo com que a sua disponibilidade para a formação de uma ligação covalente diminua. Entretanto, os resultados obtidos na oxidação do $^1\text{O}_2$ com triptofano bloqueado na porção amino demonstram a identificação de diferentes dímeros que estão de acordo com a proposta de dimerização aqui apresentada. Um aspecto relevante na formação da Kn em proteínas é que o ambiente eletrônico presente na estrutura terciária pode interferir na densidade eletrônica, ocasionando uma influência relevante na nucleofilicidade da Kn.

Figura 64 Proposta mecanística de formação de ligação cruzada entre resíduos de His-Trp e Trp-Trp a partir dos intermediários formados na oxidação com $^1\text{O}_2$.

As ligações cruzadas com resíduos de Trp, identificadas e caracterizadas neste trabalho, configuram um novo tipo de formação de dímeros em proteínas, e representam a formação de ligações covalentes à partir de um mecanismo nucleofílico, que foram induzidos após oxidação com oxigênio singlete. Na literatura, foi descrita a formação de dímeros de Trp, a partir de mecanismos radiculares. Recentemente, demonstramos a formação de um dímero de Trp em lisozima pela formação de radical carbonato, além de dímeros de lisozima-SOD (Paviani *et al.*, 2015). Entretanto, ainda existem muitas questões a serem respondidas na elucidação dos mecanismos de dimerização e o envolvimento do triptofano e suas espécies oxidadas. Trabalhos com o estudo de quinureninas ligadas a proteínas das lentes dos olhos demonstram a formação de dimerização entre quinureninas, que sofreram deaminações, provenientes de uma reação similar aos produtos aqui apresentados (Parker *et al.*, 2007).

Dado os resultados obtidos com a lisozima, iniciou-se a investigação preliminar da formação de dimerização e agregados proteicos em cristalinos dos olhos bovinos. Sabe-se que o Brasil é o país com o maior índice de radiação, nossos gados são criados em ambiente aberto e estão diariamente em contato com a luz solar sem nenhuma proteção, configurando um ótimo modelo para a investigação do oxigênio molecular no estado singlete na formação de agregados proteicos. Estudos quantitativos demonstraram a geração de níveis mensuráveis de radical superóxido e peróxido de hidrogênio em resposta à radiação UVA *in*

vitro Linetsky, James and Ortwerth, 1996), entretanto a espécie predominantemente formada (>95%) é o oxigênio singlete (Linetsky and Ortwerth, 1997). Sabe-se que nos olhos tem-se diferentes sensibilizadores endógenos e podem participar na formação de oxigênio molecular singlete (Baier *et al.*, 2006). Estudos demonstram que as diferenças da distribuição e pressão de oxigênio nos olhos com a idade são significativas (Siegfried *et al.*, 2016). Assim, os trabalhos sequenciais visam à busca desses dímeros neste modelo biológico, e em outros, com ênfase, para o dímero oxo-histidina-histidina buscando correlacionar o oxigênio molecular singlete com a formação dos agregados, e possivelmente, como responsável, em partes também, para o desenvolvimento da catarata. Os resultados obtidos a partir da digestão das proteínas dos cristalinos dos diferentes olhos, com os experimentos obtidos com espectrometria de massas com o analisador orbitrap e auxílio da bioinformática corroboram nossa hipótese, e demonstraram sem nenhuma indução em laboratório a identificação da formação do produto 2-oxo-His-His.

6. Conclusões

Os experimentos utilizando $^1\text{O}_2$, com dois átomos de oxigênio marcados [^{18}O], formado pela termólise de endoperóxido derivado do naftaleno, em associação com análises de nLC-MS/MS, representam uma metodologia altamente sensível e adequada na obtenção de informações mecanísticas relevantes sobre a formação de produtos de reação do $^1\text{O}_2$ em proteínas intactas.

No presente estudo, a reação da lisozima com o oxigênio molecular singlete resultou na oxidação dos resíduos de metionina, histidina e triptofano, e na formação de dímeros proteicos.

Os estudos comparativos com a formação de oxigênio molecular singlete em presença de luz e fotossensibilizador, em comparação com a termólise de endoperóxido derivado de naftaleno (uma fonte limpa de $^1\text{O}_2$) demonstraram o papel importante da luz e sensibilizadores endógenos, na formação de oxigênio molecular singlete em meio biológico. O papel do $^1\text{O}_2$ na oxidação de biomoléculas, em especial em proteínas, dada a sua grande concentração encontrada nos organismos, também foi evidenciado no presente estudo.

Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, de forma inequívoca, a identificação e o sequenciamento, através de espectrometria de massa, de peptídeos oxidados por oxigênio molecular singlete, à partir de uma proteína modelo. Esses resultados reiteram o importante papel do $^1\text{O}_2$ no envolvimento dessa espécie reativa de oxigênio em reações com proteínas. Em 1980, Renston e colaboradores associaram o envolvimento do $^1\text{O}_2$ na formação de ligações cruzadas em proteínas das lentes oculares, entretanto, até hoje nenhum estudo de elucidação desses produtos havia sido realizado. O presente estudo demonstrou o envolvimento do $^1\text{O}_2$ na formação de agregados proteicos. Com o monitoramento da formação de ligações cruzadas em presença de luz e através da termólise de endoperóxido derivados de naftaleno com [^{18}O]-marcado, demonstramos o envolvimento direto do $^1\text{O}_2$ na formação de ligações cruzadas entre resíduos oxidados de 2-oxo histidina e histidina (2-oxo-His-His) e lisina (2-oxo-His-Lys). Adicionalmente, um novo tipo de formação de ligação cruzada com resíduos de triptofano oxidado 2-oxo-His-Trp[O] e Trp[O]-Trp[O] foi proposta. Além disso, a

formação de dímeros na ligação cruzada em 2-oxo-His-His representa um possível novo tipo de biomarcador para o $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos.

7. Perspectivas

Os resultados apresentados demonstram um papel relevante do $^1\text{O}_2$ na formação de dimerização, dessa forma, necessitam de abordagens sequenciais no estudo do esclarecimento dos mecanismos de oxidação e posterior formação de dimerização provenientes dos produtos oxidados.

O entendimento de que o dímero 2-oxo-His-His é um biomarcador relevante para oxidações promovidos por $^1\text{O}_2$, acoplados à evolução evidenciada nos últimos anos em sensibilidade por espectrometria de massas, representa uma molécula candidata para a verificação desta espécie reativa em sistemas biológicos mais complexos, como em cristalinos do olho.

8. Referências

AGON, V.V.; BUBB, W.A.; WRIGHT, A.; HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. **Free Radic Biol Med**, v. 40(4), p. 698-710, 2006.

AU, V.; MADISON, S.A. Effects of singlet oxygen on the extracellular matrix protein collagen: oxidation of the collagen crosslink histidinohydroxylysine and histidine. **Arch Biochem Biophys**, v. 384(1), p.133-142, 2000.

BAIER, J.; MAISCH, T.; MAIER, M.; ENGEL, E.; LANDTHALER, M.; BÄUMLER, W. Singlet Oxygen Generation by UVA Light Exposure of Endogenous Photosensitizers. **Biophysical Journal**, v. 91(4), p. 1452-1459, 2006.

BALASUBRAMANIAN, D.; DU, X.; ZIGLER, J.S. JR. The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. **Photochem Photobiol**, v. 52(4), p.761-768, 1990.

BLAKE, C.C.F.; KOENIG, D.F.; MAIR, G.A.; NORTH, A.C.T.; PHILLIPS, D.C.; SARMA, V.R. Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Å Resolution. **Nature**, v. 206, p. 757-761, 1965.

BLOW, D.M.; BIRKTOFT, J.J.; HARTLEY, B.S. Role of a Buried Acid Group in the Mechanism of Action of Chymotrypsin. **Nature**, v. 221, p. 337–340, 1969.

CHANG, K.Y.; CARR, C.W. Studies on the structure and function of lysozyme. I. The effect of pH and cation concentration of lysozyme activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 229(2), p. 496-503, 1971.

CHAO, C.C.; MA, Y.S.; STADTMAN, E.R. Modification of Protein Surface Hydrophobicity and Methionine Oxidation by Oxidative Systems Proc. **Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, p. 2969– 2974, 1997.

CHIEN, C.C.; MA, Y.S.; STADTMAN, E.R. Modification of Protein Surface Hydrophobicity and Methionine Oxidation by Oxidative Systems. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 2969– 2974, 1997.

DAVIERS, R.C.; NEUBERGER, A. Modification of lysine and arginine residues of lysozyme and the effect on enzymatic activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 178(2), p. 306-317, 1969.

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

DAVIES, M.J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 305(3), p. 761-770, 2003.

DAVIES, R.C.; NEUBERGER, A.; WILSON, B.M. The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. **Biochim Biophys Acta**, v. 78(2), p. 294-305, 1969.

DI MASCIIO, P.; SIES, H. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylene)dipropionate endoperoxide. Monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111(8), p. 2909-2914, 1989.

DICKMAN, S.R.; PROCTOR, C.M. Factors affecting the activity of egg white lysozyme. **Arch Biochem Biophys**, v. 40(2) p. 364-372, 1952.

DICKMAN, S.R.; PROCTOR, C.M. Factors affecting the activity of egg white lysozyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 40, p. 364-372, 1952.

DOOLEY, M.M.; MUDD, J.B. Reaction of ozone with lysozyme under different exposure conditions. **Arch Biochem Biophys**, v. 218(2), p. 459-471, 1982.

DUBBELMAN, T.M.A.R.; DE GOEIJ, A.F.P.M.; VAN STEVENINCK, J. Photodynamic effects of protoporphyrin on human erythrocytes. Nature of the cross-linking of membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 511(2), p. 141-151, 1978.

FOOTE, C.S.; PETERS, J.W. Chemistry of singlet oxygen. XIV. A reactive intermediate in sulfide photooxidation. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 93, p. 3795, 1971.

GAO, X.; GUO, M.; ZHANG, Z.; SHEN, P.; YANG, Z.; ZHANG, N. Baicalin promotes the bacteriostatic activity of lysozyme on *S. aureus* in mammary glands and neutrophilic granulocytes in mice. **Oncotarget**, v. 8(12), p. 19894-19901, 2017.

GARNER, B.; WALDECK, A.R.; WITTING, P.K.; RYE, K.A.; STOCKER, R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **J Biol Chem**, v. 273(11), p. 6088-6095, 1998.

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. **Anal Biochem**, v. 273 (2), p. 149-155, 1999.

GIAUQUE, W.F.; JOHNSTON, H.L. an isotope of oxygen, mass 17, in the earth's atmosphere. **J. Am. Chem. Soc**, v. 51(12), p. 3528–3534, 1929.

Giulivi, C.; Sarcansky, M.; Rosenfeld, E.; Boveris, A. The photodynamic effect of rose bengal on proteins of the mitochondrial inner membrane. **Photochem Photobiol**, v. 52(4), p. 745-751, 1990.

GOOSEY, J.D.; ZIGLER, J.S.JR.; KINOSHITA, J.H. Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: a process mediated by singlet oxygen. **Science**, v. 208(4449), p. 1278-1280, 1980.

GRACANIN, M.; HAWKINS, C.L.; PATTINSON, D.I.; DAVIES, M.J. Singlet oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products. **Free Radical Biol. Med.**, v. 47, p. 92-102, 2009.

GUPTASARMA, P.; BALASUBRAMANIAN, D.; MATSUGO, S.; SAITO, I. Hydroxyl radical mediated damage to proteins, with special reference to the crystallins. **Biochemistry**, v. 31(17), p. 4296-4303, 1992.

HAWKINS, C.; DAVIES, M.J. Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function. **Chem Res Toxicol**, v. 18(10), p. 1600-1610, 2005.

HERINGA, J.; ARGOS, P. Side-chain clusters in protein structures and their role in protein folding. **J Mol Biol**, v. 220(1), p. 151-171, 1991.

HUVAERE, K.; SKIBSTED, L.H. Light-induced oxidation of tryptophan and histidine. Reactivity of aromatic N-heterocycles toward triplet-excited flavins. **J Am Chem Soc**, v. 131(23), p. 8049-8060, 2009.

JARDIM, W.F. A evolução da atmosfera terrestre. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. **SBQ**, p. 5-9, 2001.

JESUS, A.J.; ALLEN, T.W. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. **Biochim Biophys Acta**, v. 1828(2), p. 864-876, 2013.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research?. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63(2), p. 165-189, 1984.

KAI, S.; SUZUKI, M. Dye-sensitized photooxidation of 2,4-disubstituted imidazoles - the formation of isomeric imidazolinones. **Heterocycles**, v. 43, p. 1185–1188, 1996.

KAKEHASHI, A.; AKIBA, J.; UENO, N.; CHAKRABARTI, B. Evidence for singlet oxygen-induced cross-links and aggregation of collagen. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 196(3), p. 1440-1446, 1993.

KANNAN, N.; VISHVESHWARA, S. Identification of side-chain clusters in protein structures by a graph spectral method. **J Mol Biol**, v. 292(2), p. 441-464, 1991.

Kerkaert, B.; Mestdagh, F.; Obando, M.; Cucu, T.; Meulenaer, B. Identification of Modified Lysozyme Peptides upon Photo-oxidation by LC-TOF-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61 (51), p. 12727–12736, 2013.

KIM, J.; RODRIGUEZ, M.E.; GUI, M.; KENNEDY, M.E.; OLEINICK, N.L.; ANDERSON V.E. Oxidative modification of cytochrome c by singlet oxygen. **Free Radic Biol Med**, v. 44(9), p. 1700-1711, 2008.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species, in Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, v. 1, p.1-21, 2016.

LEVINE, R.; MOSONI, L.; BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.D. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93(26), p. 15036-15040, 1996.

LIMA, D.B.; LIMA, T.B.; BALBUENA, T.S.; FERREIRA, A.G.C.N.; BARBOSA, V.C.; GOZZO, F.C.; CARVALHO, P.C. SIM-XL: a powerful and user-friendly tool for

peptide cross-linking analysis. **Journal of Proteomics (129) - Special Issue: Computational Proteomics**, p. 51-55, 2015.

LIU, F.; FANG, Y.; CHEN, Y.; LIU, J. Reactions of deprotonated tyrosine and tryptophan with electronically excited singlet molecular oxygen ($a^1\Delta_g$): A guided-ion-beam scattering, statistical modeling and trajectory study. **J. Phys. Chem. B**, v. 116, p. 6369-6379, 2012.

LIU, F.; LIU, J. Oxidation Dynamics of Methionine with Singlet Oxygen: Effects of Methionine Ionization and Microsolvation. **J. Phys Chem B**, v. 119(25), p. 8001-8012, 2015.

LIU, F.; LU, W.; FANG, Y.; LIU, L. Evolution of oxidation dynamics of histidine: Non-reactivity in the gas phase, peroxides in hydrated clusters, and pH dependence in solution. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, p. 22179, 2014.

MAAR, J. H. História da química. 2 ed. Florianópolis: Conceito Editorial, p. 946, 2008.

MANAHAN, S.E. Environmental Chemistry. Monterrey-Califórnia: Brooks-Cole Publishing Company, p. 612, 1984.

MARTINEZ, G.R.; RAVANAT, J.L.; MEDEIROS, M.H.; CADET, J.; DI MASCIO, P. Synthesis of a Naphthalene Endoperoxide as a Source of ^{18}O -labeled Singlet Oxygen for Mechanistic Studies. **J. Am. Chem. Soc**, v. 122 (41), p.10212–10213, 2000.

MEDEIROS, M. H. G.; SIGOLO, C.A.O.; Di MASCIO, P. Covalent Modification of Cytochrome. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1099-1110, 2007.

MÉNDEZ-HURTADO, J.; LÓPEZ, R.; SUÁREZ, D.; MENÉNDEZ, MI. Theoretical study of the oxidation of histidine by singlet oxygen. **Chemistry**, v. 18(27), p. 8437-8447, 2012.

MICHAELI, A.; FEITELSON, J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59(3), p. 284-289, 1994.

MIYAMOTO, S.; MARTINEZ, R.G.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 139, p. 24-33, 2014.

MONROE, B.M. Singlet oxygen in solution: lifetimes and reaction rate constants. Singlet O₂. Frimer, A.A. Florida, CRC Press, Boca Raton, p. 177-224, 1985.

MOZETO, A.A. Química atmosférica: a química sobre nossas cabeças. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola. **SBQ**, p. 41 – 49, 2001.

NAKAGAWA, M.; YOSHIKAWA, K.; HINO, T. The photosensitized oxygenation of Nb-methyltryptamine. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, p. 6496, 1975.

NAKAGAWA, M.; WATANABE, H.; KODATO, S.; OKAJIMA, H.; HINO, T.; FLIPPEN, J.L. WITKOP, B. A valid model for the mechanism of oxidation of tryptophan to formylkynurenine -25 years later. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 74, p. 4730–4733, 1977.

PATTISON, D.I.; RAHMANTO, A.S.; DAVIES, M.J. Photo-oxidation of proteins. **Photochem Photobiol Sci**, v. 11(1), p. 38-53, 2012.

PAVIANI, V.; QUEIROZ, R.F.; MARQUES, E.F.; DI MASCIO, P.; LISSI, O. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a

ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 89, p. 72-82, 2015.

PERDIVARA, IRINA.; DETERDING, L.J.; PRZYBYLSKI, M.; TOMER, K.B. Mass spectrometric identification of oxidative modifications of tryptophan residues in proteins: chemical artifact or post-translational modification. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 21(7), p. 1114–1117, 2010.

PIERLOT, C.; AUBRY, J.M.; BRIVIDA, K.; SIES, H.; DI MASCIO, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 3-20, 2010.

PIERLOT, C.; POPRAWSKI, J.; MARKO, J.; AUBRY, J.M. Effects of oxygenated substituents on the [4+2] cycloaddition of singlet oxygen in the photooxygenation of water-soluble naphthyl ethers. **Tetrahedron Letters**, v. 40(26), p. 5063–5067, 2000.

PLOWMAN, J.E.; Deb-Choudhury, S.; Grosvenor, A.J.; Dyer, J.M. Protein oxidation: identification and utilisation of molecular markers to differentiate single oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. **Photochem Photobiol Sci**, v. 12, p. 1960–1967, 2013.

POSADAZ, A.; BIASUTTI, A.; CASALE, C.; SANZ, J.; AMAT-GUERRI, F.; GARCÍA, N.A. Rose Bengal-sensitized photooxidation of the dipeptides L-tryptophyl-L-phenylalanine, L-tryptophyl-L-tyrosine and L-tryptophyl-L-tryptophan: kinetics, mechanism and photoproducts. **Photochem Photobiol**, v. 80, p. 132-138, 2004.

PREIN, M.; ADAM, W. The Schenck Ene Reaction: Diastereoselective Oxyfunctionalization with Singlet Oxygen in Synthetic Applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl**, v. 35: 477–494, 1996.

REDMOND, R.W.; GAMLIN, J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochem. Photobiol**, v. 70, p. 391, 1999.

RENSTON, R.H.; JONES, A.; CHRISTIANSEN, W.D.; HRADEK, G.T. Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: a process mediated by singlet oxygen. **Science**, v. 208, 1980.

ROESPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomed Mass Spectrom**, v. 11(11), p. 601, 1984.

RONSEIN, G.E.; OLIVEIRA, M.C.; MEDEIROS, M.H.; DI MASCIIO P. Mechanism of dioxindolylalanine formation by singlet molecular oxygen-mediated oxidation of tryptophan residues. **Photochem Photobiol Sci**, v. 10(11), p.1727-1730, 2011.

RONSEIN, G.E.; OLIVEIRA, M.C.B.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIIO, P. Characterization of O₂ (¹Δg) - Derived Oxidation Products of Tryptophan: A Combination of Tandem Mass Spectrometry Analyses and Isotopic Labeling Studies. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 20(2), p. 188–197, 2009.

ROSEIN, G.E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MACIO, P.; MARTINEZ, G.R. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quim. Nova**, v. 29, No. 3, p. 563-568, 2006.

ROUGEE. M.; BENSASSON, R.V.; LAND, E.J.; PARIENTE R. Deactivation of singlet molecular oxygen by thiols and related compounds, possible protectors against skin photosensitivity. **Photochem. Photobiol**, v. 47, p. 485–489, 1988.

RYU, A.; NARU, E.; ARAKANE, K.; MASUNAGA, T.; SHINMOTO, K.; NAGANO, T.; HIROBE, M.; MASHIKO, S. Cross-linking of collagen by singlet oxygen generated with UV-A. **Chem Pharm Bull**, v.45(8), p. 1243-1247, 1997.

SABA, M.M.F.; EPIPHANIO, I.D.V. Abrindo o olho - Dissecando um olho de boi para entender a óptica do olho humano. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, 2001.

SAITO, I.; MATSUURA, T.; NAKAGAWA, M.; HINO, T. Peroxidic intermediates in photosensitized oxygenation of tryptophan derivatives. **Acc. Chem. Res.**, v. 10, p. 346–352, 1977.

SAMANTA, U.; PAL, D.; CHAKRABARTI, P. Environment of tryptophan side chains in proteins. **Proteins**, v. 38(3), p. 288-300, 2000.

SENKO, M.W.; REMES, P.M.; CANTERBURY, J.D.; MATHUR, R.; SONG, Q.; ELIUK, S.M.; MULLEN, C.; EARLEY, L.; HARDMAN, M.; BLETHROW, J.D.; BUI, H.; SPECHT, A.; LANGE, O.; DENISOV, E.; MAKAROV, A.; HORNING, S.; ZABROUSKOV, VLAD. Novel Parallelized Quadrupole/Linear Ion Trap/Orbitrap Tribid Mass Spectrometer Improving Proteome Coverage and Peptide Identification Rates. **Analytical Chemistry**, v. 85(24), p. 11710-11714, 2013.

SHEN, H.R.; SPIKES, J.D.; Kopečková, P.; Kopeček, J. Photodynamic crosslinking of proteins. I. Model studies using histidine- and lysine-containing N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers. **J Photochem Photobiol B**, v. 34(2-3), p. 203-210, 1996.

SHEN, H.R.; SPIKES, J.D.; SMITH, C.J.; KOPECEK, J. Photodynamic cross-linking of proteins IV. Nature, of the His-His bond(s) formed in the Rose Bengal-photosensitized cross-linking of N-benzoyl-L-histidine. **J. Photochem. Photobiol**, v. 130, p. 1–6, 2000.

SIEGFRIED, C.J.; SHUI, Y.B.; HOLEKAMP, N.M.; BAI, F.; BEEBE, D.C. Oxygen Distribution in the Human Eye: Relevance to the Etiology of Open-Angle Glaucoma after Vitrectomy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51(11), p. 5731-5738, 2010.

SILVA, E.; DE LANDEA, C.; EDWARDS, A.M.; LISSI, E. Lysozyme photo-oxidation by singlet oxygen: properties of the partially inactivated enzyme. **J Photochem Photobiol B**, v. 55(2-3), p. 196-200, 2000.

STADTMAN, E.R.; REMMEN, H.V.; RICHARDSON, A.; WEHR, N.B.; LEVINE, R.L. Methionine Oxidation and Aging. **Biochim Biophys Acta**, v. 1703, p. 135–140, 2005.

STEINBECK, M.J.; KHAN, A.U.; KARNOVSKY, M.J.; HEGG, G.G. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J. Bio. Chem**, v. 267, p. 1342, 1992.

STRAIGHT, R.C.; SPIKES, J.D. Photosensitized oxidation of biomolecules, in Singlet O₂. ed. A.A. Frimer, CRC Press, Boca Raton, p. 91–143, 1985.

TAMURA, M.; ISHIKAWA, O. An increase of mature type skin collagen cross-link, histidinohydroxylsinorleucine, in the sclerotic skin of morphea. **J Invest Dermatol**, v. 25, p. 83-96, 2001.

TODOROVSKI, T.; FEDOROVA, M.; HOFFMANN, R. Mass spectrometric characterization of peptides containing different oxidized tryptophan residues. **J Mass Spectrom**, v. 46(10), p. 1030-1038, 2011.

TOMITA, M.; IRIE, M.; UKITA, T. Sensitized photooxidation of N-benzoyl histidine. **Tetrahedron Lett**, v. 9, p. 4933–4936, 1968.

TOMITA, M.; IRIE, M.; UKITA, T. Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. **Biochemistry**, v. 8, p. 5149–5160, 1968.

TRIGUIGNEAUX, M.M.; EHRENSHAFT, M.; ROTH, E.; SILMAN, I.; ASHANI, Y.; MASON, R.P.; WEINER, L.; DETERDING, L.J. Targeted oxidation of Torpedo californica acetylcholinesterase by singlet oxygen: identification of N-formylkynurenine tryptophan derivatives within the active-site gorge of its complex with the photosensitizer methylene blue. **Biochem J**, v.448(1), p. 83-91, 2012.

TURRO, N.J.; CHOW, M.F. Mechanism of thermolysis of endoperoxides of aromatic compounds. Activation parameters, magnetic field, and magnetic isotope effects. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 103 (24), p. 7218–7224, 1981.

VALLEY, C. C.; CEMBRAN, A.; PERLMUTTER, J. D.; LEWIS, A. K.; LABELLO, N. P.; GAO, J.; SACHS, J. N. The Methionine-Aromatic Motif Plays a Unique Role in Stabilizing Protein Structure. **J. Biol. Chem**, v.287, p. 34979– 34991, 2012.

VAN AU; MADISON, S.A.; Effects of singlet oxygen on the extracellular matrix protein collagen: oxidation of the collagen crosslink histidinohydroxylysine and histidine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 384, n.1, p. 133-142, 2000.

VAZ, S.M.; PRADO, F.M.; DI MACIO, P.; AUGUSTO, O. Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase. **Arch Biochem Biophys**, v. 484(2), p. 127-133, 2012.

VERWEIJ, H.; VAN STEVENINCK, J. Model studies on photodynamic crosslinking. **J Photochem Photobiol B**, v. 35, p. 265–267, 1982.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. **Free Radic Biol Med**, v. 18(1), p. 93-105, 1995.

VOLBENA, A.; CHARON, M.H.; PIRAS, C.; HATCHIKIAN, E.C.; FREY, M.; FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of the nickel–iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. **Nature**, v. 373, 580–587, 1995.

WANG, S.S.; WU, J.W.; YAMAMOTO, S.; LIU, H.S. Diseases of protein aggregation and the hunt for potential pharmacological agents. **Biotechnol J**, v. 3(2), p.165-192, 2008.

WEIL, L. On the mechanism of the photo-oxidation of amino acids sensitized by methylene blue. **Arch Biochem Biophys**, v. 110, 57-68, 1965.

WILKINSON, F., HELMAN, W.P., ROSS, A.B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised compilation. **J. Phys. Chem**, v. 24, p. 663-1021, 1995.

WILM, M.S.; MANN, M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, v. 136, p. 167-180, 1994.

WILMARTH, P.A.; TANNER, S.; DASARI, S.; NAGALLA, S.R.; RIVIERE, M.A.; BAFNA, V.; PEVZNER, P.A.; DAVID, L.L. Age-Related Changes in Human Crystallins Determined from Comparative Analysis of Post-Translational Modifications in Young and Aged Lens: Does Deamidation Contribute to Crystallin Insolubility? **J Proteome Res**, v. 5(10), p. 2554–2566, 2006.

WLASCHEK, M.; BRIVIBA, K.; STRICKLIN, G.P.; SIES, H.; SCHARFFETTER-KOCHANKEK, K. Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. **J Invest Dermatol**, v. 104(2), p. 194-8, 1995.

WRIGHT, A.; BUBB, W. A.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side-chain peroxides on tyrosine residues. **Photochem. Photobiol**, v. 76, p. 35–46, 2002.

WYSOCKI, V.H.; TSAPRAILIS, G.; SMITH, L.L.; BRECI, L.A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. **J Mass Spectrom**, v. 35(12), p.1399-406, 2000.

9. Apêndice

Tabela A1. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +16 Da) ao peptídeo C⁶ELAAAM¹²KR¹³ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado(¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b ₁	C	-	-	y ₈	CELAAAMK	-	-
b ₂	CE	290,0822	290,0825	y ₇	ELAAAMK	749,3873	751,3915
b ₃	CEL	403,1655	403,1659	y ₆	LAAAMK	620,3444	622,3489
b ₄	CELA	474,2026	474,2028	y ₅	AAAMK	507,2664	509,2652
b ₅	CELAA	545,2397	545,2401	y ₄	AAMK	436,2235	438,2280
b ₆	CELAAA	616,2770	616,2774	y ₃	AMK	365,1866	367,1906
b ₇	CELAAAM	763,3124	765,3169	y ₂	MK	294,1495	296,1538
b ₈	CELAAAMK	-	-	y ₁	K	147,1135	147,1138

Tabela A2. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +14 Da) ao peptídeo C⁶ELAAAM¹²KR¹⁵HGLDNYR²¹ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	C	-	-	y ₁₆	CELAAAMKRH*GLDNYR	-	-
b ₂	CE	290,0846	290,0847	y ₁₅	ELAAAMKRH*GLDNYR	879,9398 (2+)	880,9421 (2+)
b ₃	CEL	403,1668	403,1671	y ₁₄	LAAAMKRH*GLDNYR	815,4282 (2+)	816,4209 (2+)
b ₄	CELA	-	474,2052	y ₁₃	AAAMKRH*GLDNYR	758,8760 (2+)	759,8790 (2+)
b ₅	CELAA	545,2407	-	y ₁₂	AAMKRH*GLDNYR	723,3563 (2+)	724,3604 (2+)
b ₆	CELAAA	616,5945	-	y ₁₁	AMKRH*GLDNYR	687,8404 (2+)	688,8419 (2+)
b ₇	CELAAAMK	-	-	y ₁₀	MKRH*GLDNYR	652,3211 (2+)	653,3219 (2+)
b ₈	CELAAAMK	-	-	y ₉	KRH*GLDNYR	586,8015 (2+)	587,8032 (2+)
b ₉	CELAAAMKR	-	-	y ₈	RH*GLDNYR	522,7543 (2+)	523,7561 (2+)
b ₁₀	CELAAAMKRH*	591,7805 (2+)	591,7829 (2+)	y ₇	H*GLDNYR	888,3971 (2+)	890,1014 (2+)
b ₁₁	CELAAAMKRH*G	-	561,3034 (2+)	y ₆	GLDNYR	737,3582	737,3589
b ₁₂	CELAAAMKRH*GL	-	677,8359 (2+)	y ₅	LDNYR	680,3395	680,3391
b ₁₃	CELAAAMKRH*GLD	-	-	y ₄	DNYR	567,2541	567,2552
b ₁₄	CELAAAMKRH*GLDN	-	-	y ₃	NYR	452,2268	452,2273
b ₁₅	CELAAAMKRH*GLDNY	872,8944 (2+)	873,9025 (2+)	y ₂	YR	338,1842	338,1839
b ₁₆	CELAAAMKRH*GLDNYR	-	-	y ₁	R	175,1220	175,1206

Tabela A3. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +16 Da) ao peptídeo C⁶ELAAAM¹²KRH¹⁵GLDNYR²¹ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	C	-	-	y ₁₆	CELAAAM*KRH*GLDNYR	-	-
b ₂	CE	290,0825	290,0822	y ₁₅	ELAAAM*KRH*GLDNYR	888,9458 (2+)	890,9501 (2+)
b ₃	CEL	403,1678	403,1674	y ₁₄	LAAAM*KRH*GLDNYR	824,4231 (2+)	826,4281 (2+)
b ₄	CELA	474,2031	474,2029	y ₁₃	AAAM*KRH*GLDNYR	767,8810 (2+)	769,8860 (2+)
b ₅	CELAA	545,2397	545,2396	y ₁₂	AAM*KRH*GLDNYR	732,3641 (2+)	734,3677 (2+)
b ₆	CELAAA	-	-	y ₁₁	AM*KRH*GLDNYR	696,8448 (2+)	698,8483 (2+)
b ₇	CELAAAM	-	765,3173	y ₁₀	M*KRH*GLDNYR	661,3259 (2+)	663,3304 (2+)
b ₈	CELAAAM*K	-	-	y ₉	KRH*GLDNYR	587,8087 (2+)	588,8107 (2+)
b ₉	CELAAAM*KR	-	-	y ₈	RH*GLDNYR	523,7619 (2+)	524,7642 (2+)
b ₁₀	CELAAAM*KRH*	600,7850 (2+)	602,7897 (2+)	y ₇	H*GLDNYR	890,4127 (2+)	892,4175 (2+)
b ₁₁	CELAAAM*KRH*G	629,2948 (2+)	631,3008 (2+)	y ₆	GLDNYR	737,3589	737,3590
b ₁₂	CELAAAM*KRH*GL	-	-	y ₅	LDNYR	680,3375	680,3379
b ₁₃	CELAAAM*KRH*GLD	743,3505 (2+)	745,3561 (2+)	y ₄	DNYR	567,2543	567,2551
b ₁₄	CELAAAM*KRH*GLDN	800,3733(2+)	802,3779 (2+)	y ₃	NYR	452,2252	452,2266
b ₁₅	CELAAAM*KRH*GLDNY	881,9050 (2+)	883,9081 (2+)	y ₂	YR	338,1831	338,1834
b ₁₆	CELAAAM*KRH*GLDNYR	-	-	y ₁	R	175,1212	175,1209

Tabela A4. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +32 Da) ao peptídeo C⁶ELAAAM¹²KRH¹⁵GLDNYR²¹ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	H*	-	-	y ₁₉	H*GLDNYRGYDLGNWVCAAK	-	-
b ₂	H*G	227,0783	231,0871	y ₁₈	GLDNYRGYDLGNWVCAAK	-	-
b ₃	H*GL	340,1627	344,1707	y ₁₇	LDNYRGYDLGNWVCAAK	993,9797 (+2)	993,9798 (+2)
b ₄	H*GLD	-	-	y ₁₆	DNYRGYDLGNWVCAAK	937,4380 (+2)	937,4382 (+2)
b ₅	H*GLDN	569,2326	573,2405	y ₁₅	NYRGYDLGNWVCAAK	879,9239 (+2)	879,9238 (+2)
b ₆	H*GLDNY	-	-	y ₁₄	YRGYDLGNWVCAAK	822,9023 (+2)	822,9019 (+2)
b ₇	H*GLDNYR	888,3971	892,4065	y ₁₃	RGYDLGNWVCAAK	741,3704 (+2)	-
b ₈	H*GLDNYRG	-	-	y ₁₂	GYDLGNWVCAAK	1325,6318	-
b ₉	H*GLDNYRGY	554,7451 (+2)	556,7493 (+2)	y ₁₁	YDLGNWVCAAK	1268,6112	-
b ₁₀	H*GLDNYRGYD	598,2619 (+2)	600,2655 (+2)	y ₁₀	DLGNWVCAAK	1105,5473	-
b ₁₁	H*GLDNYRGYDL	654,8036 (+2)	656,8078 (+2)	y ₉	LGNWVCAAK	509,7626	509,7627
b ₁₂	H*GLDNYRGYDLG	683,3140 (+2)	685,3185 (+2)	y ₈	GNWVCAAK	905,4306	905,4311
b ₁₃	H*GLDNYRGYDLGN	740,3358 (+2)	742,3398 (+2)	y ₇	NWVCAAK	848,4098	848,4097
b ₁₄	H*GLDNYRGYDLGNW	833,3757 (+2)	835,3797 (+2)	y ₆	WVCAAK	734,3671	734,3669
b ₁₅	H*GLDNYRGYDLGNWV	-	-	y ₅	VCAAK	548,2884	548,2875
b ₁₆	H*GLDNYRGYDLGNWVC	-	-	y ₄	CAAK	449,2177	449,2191
b ₁₇	H*GLDNYRGYDLGNWVCA	-	-	y ₃	AAK	289,1890	289,1888
b ₁₈	H*GLDNYRGYDLGNWVCAA	-	-	y ₂	AK	218,1518	218,1517
b ₁₉	H*GLDNYRGYDLGNWVCAAK	-	-	y ₁	K	175,1135	175,1138

Tabela A5. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +16 Da) ao peptídeo G²²YSLGNW²⁸VCAAK³³ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺			<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	G	-	-	y ₁₂	GYSLGNW*VC*AAK	-	-
b ₂	GY	221,0933	-	y ₁₁	YSLGNW*VC*AAK	1284,6055	1286,6097
b ₃	GYS	308,1256	308,1258	y ₁₀	SLGNW*VC*AAK	1121,5419	1123,5464
b ₄	GYSL	-	-	y ₉	LGNW*VC*AAK	1034,5097	1036,5143
b ₅	GYSLG	478,2308	478,2311	y ₈	GNW*VC*AAK	921,4256	923,4302
b ₆	GYSLGN	-	-	y ₇	NW*VC*AAK	864,4045	866,4088
b ₇	GYSLGNW*	794,3476	796,3523	y ₆	W*VC*AAK	750,3612	752,3659
b ₈	GYSLGNW*V	-	-	y ₅	VC*AAK	548,2874	548,2875
b ₉	GYSLGNW*VC*	1053,4472	1055,4519	y ₄	C*AAK	449,2188	449,2191
b ₁₀	GYSLGNW*VC*A	-	-	y ₃	AAK	289,1884	289,1882
b ₁₁	GYSLGNW*VC*AA	1195,5215	1197,5255	y ₂	AK	218,1508	218,1510
b ₁₂	GYSLGNW*VC*AAK	-	-	y ₁	K	147,1137	147,1139

Tabela A6. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +32 Da) ao peptídeo G²²YSLGNW²⁸VCAAK³³ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b ₁	G	-	-	y ₁₂	GYSLGNW*VC*AAK	-	-
b ₂	GY	221,0933	221,0944	y ₁₁	YSLGNW*VC*AAK	1300,6007	1304,6089
b ₃	GYS	308,1256	308,1258	y ₁₀	SLGNW*VC*AAK	1137,5371	1141,5163
b ₄	GYSL	-	-	y ₉	LGNW*VC*AAK	1050,5040	1054,5139
b ₅	GYSLG	478,2308	478,2311	y ₈	GNW*VC*AAK	937,4208	941,4296
b ₆	GYSLGN	592,2742	592,2744	y ₇	NW*VC*AAK	880,3997	884,4082
b ₇	GYSLGNW*	810,3433	814,3519	y ₆	W*VC*AAK	766,3567	770,3651
b ₈	GYSLGNW*V	-	-	y ₅	VC*AAK	548,2874	548,2875
b ₉	GYSLGNW*VC*	-	-	y ₄	C*AAK	449,2188	449,2191
b ₁₀	GYSLGNW*VC*A	1140,4796	1144,4878	y ₃	AAK	289,1884	289,1882
b ₁₁	GYSLGNW*VC*AA	1211,5171	1215,5255	y ₂	AK	218,1508	218,1510
b ₁₂	GYSLGNW*VC*AAK	-	-	y ₁	K	147,1137	147,1139

Tabela A7. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +4 Da) ao peptídeo W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b ₁	W*	-	-	y ₇	W*WCDNGR	-	-
b ₂	W*W	377,1621	379,1665	y ₆	WCDNGR	807,3219	807,3224
b ₃	W*WC	537,1927	539,1973	y ₅	CDNGR	621,2422	621,2431
b ₄	W*WCD	651,2367	653,2398	y ₄	DNGR	461,2118	461,2121
b ₅	W*WCDN	766,2625	768,2671	y ₃	NGR	347,1687	347,1686
b ₆	W*WCDNG	823,2840	825,2883	y ₂	GR	232,1421	232,1426
b ₇	W*WCDNGR	-	-	y ₁	R	175,1202	175,1204

Tabela A8. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +32 Da) ao peptídeo W⁶²W⁶³CNDGR⁶⁸ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b ₁	W*	-	-	y ₇	W*WCDNGR	-	-
b ₂	W*W	405,1565	409,1655	y ₆	WCDNGR	807,3219	807,3224
b ₃	W*WC	565,1877	569,1862	y ₅	CDNGR	621,2422	621,2426
b ₄	W*WCD	680,2144	684,2225	y ₄	DNGR	461,2117	461,2122
b ₅	W*WCDN	794,2577	798,2659	y ₃	NGR	347,1686	347,1687
b ₆	W*WCDNG	851,2785	855,2874	y ₂	GR	232,1419	232,1423
b ₇	W*WCDNGR	-	-	y ₁	R	175,1199	175,1204

Tabela A9. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +16 Da) ao peptídeo $^{198}\text{VSDGNGM}^{65}\text{NAW}^{105}\text{VAWR}^{112}$ com ^{16}O e ^{18}O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (^{16}O)	Oxigênio marcado (^{18}O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (^{16}O)	Oxigênio marcado (^{18}O)
		m/z [M+nH] $^{n+}$	m/z [M+nH] $^{n+}$			m/z [M+nH] $^{n+}$	m/z [M+nH] $^{n+}$
b₁	I	-	-	y₁₅	IVSDGNGM*NAW*VAWR	-	-
b₂	IV	213,1611	213,1614	y₁₄	VSDGNGM*NAW*VAWR	797,8584 (2+)	1598,7164
b₃	IVS	300,1931	300,1932	y₁₃	SDGNGM*NAW*VAWR	748,3228 (2+)	750,3283 (2+)
b₄	IVSD	-	-	y₁₂	DGNGM*NAW*VAWR	1408,6075	1412,6159
b₅	IVSDG	-	-	y₁₁	GNGM*NAW*VAWR	1293,5806	1297,5890
b₆	IVSDGN	586,2845	586,2846	y₁₀	NGM*NAW*VAWR	-	-
b₇	IVSDGNG	-	-	y₉	GM*NAW*VAWR	1122,5161	1126,5246
b₈	IVSDGNGM*	790,3419	792,3461	y₈	M*NAW*VAWR	-	-
b₉	IVSDGNGM*N	904,3847	906,3885	y₇	NAW*VAWR	918,4595	920,4640
b₁₀	IVSDGNGM*NA	975,4221	977,4266	y₆	AW*VAWR	804,4172	806,4205
b₁₁	IVSDGNGM*NAW*	-	-	y₅	W*VAWR	733,3792	735,3822
b₁₂	IVSDGNGM*NAW*V	1276,5640	1280,5725	y₄	VAWR	531,3053	531,3055
b₁₃	IVSDGNGM*NAW*VA	1347,6012	1351,6097	y₃	AWR	432,2374	432,2369
b₁₄	IVSDGNGM*NAW*VAW	1533,6807	1537,6891	y₂	WR	361,2002	361,2004
b₁₅	IVSDGNGM*NAW*VAWR	-	-	y₁	R	175,1209	175,1208

Tabela A10. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +4 Da) ao peptídeo C¹¹⁵KGTDVQAW¹²³IR¹²⁵ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	C	-	-	y ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-
b ₂	CK	289,1345	289,1340	y ₁₀	KGTDVQAW*IR	1177,6344	1179,6780
b ₃	CKG	346,1564	346,1568	y ₉	GTDVQAW*IR	1049,5389	1051,5429
b ₄	CKGT	-	-	y ₈	TDVQAW*IR	992,5172	994,5218
b ₅	CKGTD	562,2302	562,2304	y ₇	DVQAW*IR	891,4697	893,4737
b ₆	CKGTDV	661,2988	661,2989	y ₆	VQAW*IR	776,4425	778,4471
b ₇	CKGTDVQ	789,3580	789,3582	y ₅	QAW*IR	677,3743	679,3788
b ₈	CKGTDVQA	860,3943	860,3944	y ₄	AW*IR	549,3161	551,3198
b ₉	CKGTDVQAW*	525,3790 (2+)	526,7409 (2+)	y ₃	W*IR	478,2787	480,2829
b ₁₀	CKGTDVQAW*I	582,2704 (2+)	583,2830 (2+)	y ₂	IR	288,2042	288,2045
b ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-	y ₁	R	175,1212	175,1205

Tabela A11. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +16 Da) ao peptídeo C¹¹⁵KGTDVQAW¹²³IR¹²⁵ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	C	-	-	y ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-
b ₂	CK	-	-	y ₁₀	KGTDVQAW*IR	1189,6347	1191,6403
b ₃	CKG	346,1570	346,1569	y ₉	GTDVQAW*IR	1061,5389	1063,5431
b ₄	CKGT	447,2034	447,2035	y ₈	TDVQAW*IR	1004,5174	1006,5219
b ₅	CKGTD	-	-	y ₇	DVQAW*IR	903,4698	905,4739
b ₆	CKGTDV	661,2991	661,2989	y ₆	VQAW*IR	788,4425	790,4471
b ₇	CKGTDVQ	-	-	y ₅	QAW*IR	689,3742	691,3787
b ₈	CKGTDVQA	860,3931	860,3945	y ₄	AW*IR	561,3158	563,3198
b ₉	CKGTDVQAW*	-	-	y ₃	W*IR	490,2786	492,2830
b ₁₀	CKGTDVQAW*I	-	-	y ₂	IR	288,2043	288,2047
b ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-	y ₁	R	175,1203	175,1201

Tabela A12. Íons da série b- e y- identificados com a modificação (adição de +32 Da) ao peptídeo C¹¹⁵KGTDVQAW¹²³IR¹²⁵ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y	Sequência do peptídeo	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b ₁	C	-	-	y ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-
b ₂	CK	-	-	y ₁₀	KGTDVQAW*IR	1205,6287	1209,6369
b ₃	CKG	346,1542	346,1543	y ₉	GTDVQAW*IR	1077,5337	1081,5418
b ₄	CKGT	447,2043	447,2045	y ₈	TDVQAW*IR	1020,5122	1024,5206
b ₅	CKGTD	562,2301	562,2303	y ₇	DVQAW*IR	919,4645	923,4728
b ₆	CKGTDV	-	-	y ₆	VQAW*IR	804,4374	808,4457
b ₇	CKGTDVQ	789,3572	789,3575	y ₅	QAW*IR	705,3689	709,3774
b ₈	CKGTDVQA	860,3944	860,3943	y ₄	AW*IR	577,3102	581,3180
b ₉	CKGTDVQAW*	-	-	y ₃	W*IR	506,2732	510,2805
b ₁₀	CKGTDVQAW*I	-	-	y ₂	IR	288,2040	288,2041
b ₁₁	CKGTDVQAW*IR	-	-	y ₁	R	175,1204	175,1203

Tabela A13. Íons da série b- e y- identificado para a ligação cruzada entre oxo-His¹⁵ e His¹⁵ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+H] ²⁺	m/z [M+2] ²⁺			m/z [M+n] ⁿ⁺	m/z [M+n] ⁿ⁺
b ₁	H*(HGLDNYR)	513,2323	514,2349	y ₆	GLDNYR	737,3583	737,3585
b ₂	H*(HGLDNYR)G	541,7436	542,7468	y ₅	LDNYR	680,3369	680,3373
b ₃	H*(HGLDNYR)GL	598,2855	599,2881	y ₄	DNYR	567,2531	567,2535
b ₄	H*(HGLDNYR)GLD	655,7989	656,8016	y ₃	NYR	452,2262	452,2252
b ₅	H*(HGLDNYR)GLDN	712,8203	713,8233	y ₂	YR	338,1834	338,1834
b ₆	H*(HGLDNYR)GLDNY	794,3512	795,3545	y ₁	R	175,1202	175,1202

Tabela A14. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre oxo-His¹⁵ e Lys¹ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+n] ⁿ⁺	m/z [M+n] ⁿ⁺			m/z [M+n] ⁿ⁺	m/z [M+n] ⁿ⁺
b₁	H*(KVFG)	601,3107	603,3140	y₆	GLDNYR	737,3586	737,3586
b₂	H*(KVFG)G	658,3324	660,3365	y₅	LDNYR	680,3371	680,3373
b₃	H*(KVFG)GL	771,4164	773,4201	y₄	DNYR	567,2533	567,2539
b₄	H*(KVFG)GLD	886,4434	888,4472	y₃	NYR	452,2261	452,2264
b₅	H*(KVFG)GLDN	1000,4863	1002,4904	y₂	YR	338,1830	338,1823
b₆	H*(KVFG)GLDNY	1163,5491	1165,5535	y₁	R	175,1201	175,1204
b₁[*]	K(H*GLDNYR)	508,7516 (n=2)	509,7531 (n=2)	y₃[*]	VFG	322,1775	322,1777
b₂[*]	KV(H*GLDNYR)	558,2849 (n=2)	559,2875 (n=2)	y₂[*]	FG	223,1089	223,1092
b₃[*]	KVF(H*GLDNYR)	631,8198 (n=2)	632,8222 (n=2)	y₁[*]	G	-	-

Tabela A15. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre oxo-His¹⁵ e Lys¹¹⁵ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)
		m/z [M+2H] ²⁺	m/z [M+2H] ²⁺			m/z [M+H] ⁺	m/z [M+H] ⁺
b₁	H*(CKGTDVQAWIR)	-	-	y₆	GLDNYR	737,3585	737,3591
b₂	H*(CKGTDVQAWIR)G	771,3692	772,3717	y₅	LDNYR	680,3374	680,3383
b₃	H*(CKGTDVQAWIR)GL	827,9117	828,9134	y₄	DNYR	567,2532	567,2543
b₄	H*(CKGTDVQAWIR)GLD	885,4246	886,4268	y₃	NYR	452,2266	452,2279
b₅	H*(CKGTDVQAWIR)GLDN	942,4461	943,4486	y₂	YR	338,1831	338,1834
b₆	H*(CKGTDVQAWIR)GLDNY	1023,9773	1024,9798	y₁	R	175,1212	175,1217
b₁[*]	C	-	-	y₁₀[*]	KGTDVQAWIR	-	-
b₂[*]	CK(H*GLDNYR)	588,7662	589,7684	y₉[*]	GTDVQAWIR	1045,5451	1045,5455
b₃[*]	CK(H*GLDNYR)G	617,2770	618,1859	y₈[*]	TDVQAWIR	988,5233	988,5240
b₄[*]	CK(H*GLDNYR)GT	667,8019	668,8044	y₇[*]	DVQAWIR	887,4761	887,4756
b₅[*]	CK(H*GLDNYR)GTD	725,3147	726,3223	y₆[*]	VQAWIR	772,4479	772,4479
b₆[*]	CK(H*GLDNYR)GTDV	774,8483	775,8511	y₅[*]	QAWIR	673,3490	673,3798
b₇[*]	CK(H*GLDNYR)GTDVQ	838,8777	839,8797	y₄[*]	AWIR	545,3214	545,3194
b₈[*]	CK(H*GLDNYR)GTDVQA	874,3963	875,3983	y₃[*]	WIR	474,2845	474,2857
b₉[*]	CK(H*GLDNYR)GTDVQAW	967,4357	968,4379	y₂[*]	IR	288,2047	288,2063
b₁₀[*]	CK(H*GLDNYR)GTDVQAWI	1023,9773	1024,9798	y₁[*]	R	175,1212	175,1217

Tabela A16. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre oxo-His¹⁵ e Trp⁶² com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b₁	H*(W*WCNDGR)	574,7219 (n=2)	576,7261 (n=2)	y₆	GLDNYR	737,3584	737,3588
b₂	H*(W*WCNDGR)G	603,2322 (n=2)	605,2372(n=2)	y₅	LDNYR	680,3372	680,3376
b₃	H*(W*WCNDGR)GL	659,7745 (n=2)	661,7787 (n=2)	y₄	DNRYR	567,2533	567,2535
b₄	H*(W*WCNDGR)GLD	717,2878 (n=2)	719,2919 (n=2)	y₃	NYR	452,2252	452,2263
b₅	H*(W*WCNDGR)GLDN	774,3094 (n=2)	776,3136 (n=2)	y₂	YR	338,1835	338,1839
b₆	H*(W*WCNDGR)GLDNY	855,8497 (n=2)	857,8441 (n=2)	y₁	R	175,1215	175,1193
b₁[*]	W*(H*GLDNYR)	539,7405 (n=2)	541,7449 (n=2)	y₆[*]	WCNDGR	807,3216	807,3226
b₂[*]	W*(H*GLDNYR)W	632,7799 (n=2)	634,7846 (n=2)	y₅[*]	CNDGR	621,2419	621,2423
b₃[*]	W*(H*GLDNYR)WC	712,7956 (n=2)	714,7998 (n=2)	y₄[*]	NDGR	461,2122	461,2128
b₄[*]	W*(H*GLDNYR)WCN	769,8169 (n=2)	771,8217 (n=2)	y₃[*]	DGR	347,1688	347,1689
b₅[*]	W*(H*GLDNYR)WCND	827,3302 (n=2)	829,3347 (n=2)	y₂[*]	GR	232,1419	232,1422
b₆[*]	W*(H*GLDNYR)WCNDG	855,8497 (n=2)	857,8441 (n=2)	y₁[*]	R	175,1215	175,1193

Tabela A17. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre oxo-His¹⁵ e Trp¹²³ com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺			m/z [M+nH] ⁿ⁺	m/z [M+nH] ⁿ⁺
b ₁	H*(CKGTDVQAW*IR)	744,8573 (n=2)	746,8602 (n=2)	y ₆	GLDNYR	737,3589	737,3583
b ₂	H*(CKGTDVQAW*IR)G	773,3669 (n=2)	775,3708 (n=2)	y ₅	LDNYR	680,3371	680,3375
b ₃	H*(CKGTDVQAW*IR)GL	829,9087 (n=2)	831,9132 (n=2)	y ₄	DNYR	567,2535	567,2538
b ₄	H*(CKGTDVQAW*IR)GLD	887,4231 (n=2)	889,4264 (n=2)	y ₃	NYR	452,2269	452,2269
b ₅	H*(CKGTDVQAW*IR)GLDN	944,4449 (n=2)	946,4479 (n=2)	y ₂	YR	338,1844	338,1844
b ₆	H*(CKGTDVQAW*IR)GLDNY	1025,9763(n=2)	1027,9794(n=2)	y ₁	R	175,1216	175,1217
b ₁ [*]	C	-	-	y ₁₀ [*]	KGTDVQAW*(H*GLDNYR)IR	689,0135 (n=3)	691,0179 (n=3)
b ₂ [*]	CK	289,1338	289,1337	y ₉ [*]	GTDVQAW*(H*GLDNYR)IR	968,9683 (n=2)	970,9726 (n=2)
b ₃ [*]	CKG	346,1566	346,1569	y ₈ [*]	TDVQAW*(H*GLDNYR)IR	940,4577 (n=2)	942,6081 (n=2)
b ₄ [*]	CKGT	447,2042	447,2041	y ₇ [*]	DVQAW*(H*GLDNYR)IR	889,9338 (n=2)	891,9383 (n=2)
b ₅ [*]	CKGTD	562,2308	562,2305	y ₆ [*]	VQAW*(H*GLDNYR)IR	832,4206 (n=2)	834,4249 (n=2)
b ₆ [*]	CKGTDV	661,2992	661,3102	y ₅ [*]	QAW*(H*GLDNYR)IR	782,8851 (n=2)	784,8902 (n=2)
b ₇ [*]	CKGTDVQ	789,3577	789,3579	y ₄ [*]	AW*(H*GLDNYR)IR	718,8569 (n=2)	720,8624 (n=2)
b ₈ [*]	CKGTDVQA	860,3943	860,3945	y ₃ [*]	W*(H*GLDNYR)IR	683,3381 (n=2)	685,3428 (n=2)
b ₉ [*]	CKGTDVQAW*(H*GLDNYR)	969,4342 (n=2)	970,9726 (n=2)	y ₂ [*]	IR	288,2045	288,2049
b ₁₀ [*]	CKGTDVQAW*(H*GLDNYR)I	1025,9763(n=2)	1027,9794(n=2)	y ₁ [*]	R	175,1216	175,1217

Tabela A18. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre Trp⁶² oxidados com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺			<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺
b₁	W*(W*WCNDGR)	600,2394 (n=2)	602,2439 (n=2)	y₆	WCNDGR	807,3219	807,3212
b₂	W*(W*WCNDGR)W	693,2798 (n=2)	695,2836 (n=2)	y₅	CNDGR	621,2418	621,2418
b₃	W*(W*WCNDGR)WC	773,2946 (n=2)	775,2989 (n=2)	y₄	NDGR	461,2124	461,2115
b₄	W*(W*WCNDGR)WCN	830,3162 (n=2)	832,3202 (n=2)	y₃	DGR	347,1686	347,1689
b₅	W*(W*WCNDGR)WCND	887,8297 (n=2)	889,8338 (n=2)	y₂	GR	232,1418	232,1407
b₆	W*(W*WCNDGR)WCNDG	916,3402 (n=2)	918,3446 (n=2)	y₁	R	175,1203	175,1199

Tabela A19. Íons da série b- e y- identificados para a ligação cruzada entre Trp¹²³ oxidados com ¹⁶O e ¹⁸O marcado.

Íon b	Cross-link sequence	Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado (¹⁸ O)	Íon y		Oxigênio não marcado (¹⁶ O)	Oxigênio marcado(¹⁸ O)
		<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺			<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺	<i>m/z</i> [M+nH] ⁿ⁺
b₁	-	-	-	y₈	TDVQAW*(GTDVQAW*IR) IR	1027,0272 (n=2)	1029,0329 (n=2)
b₂	GT	159,0779	159,0811	y₇	DVQAW*(GTDVQAW*IR)I R	976,5047 (n=2)	978,0091 (n=2)
b₃	GTD	274,1045	274,1045	y₆	VQAW*(GTDVQAW*IR)IR	918,9914 (n=2)	920,9956 (n=2)
b₄	GTDV	373,1724	373,1728	y₅	QAW*(GTDVQAW*IR)IR	869,4579 (n=2)	871,4613 (n=2)
b₅	GTDVQ	501,2322)	501,2329	y₄	AW*(GTDVQAW*IR)IR	805,4280 (n=2)	807,4319 (n=2)
b₆	GTDVQA	572,2688	572,2687	y₃	W*(GTDVQAW*IR)IR	769,9092 (n=2)	771,9134 (n=2)
b₇	GTDVQAW*(GTDVQAW*IR)	911,9413 (n=2)	913,9455 (n=2)	y₂	IR	288,2043	288,2060
	GTDVQAW*(GTDVQAW*IR)I	968,4829 (n=2)	970,4881 (n=2)	y₁	R	175,1199	175,1202

Súmula curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Emerson Finco Marques

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo, 27 de março de 1984.

Formação acadêmica

1991 - 1995 E.E.P.G. PE. LOUIS JOSEPH LEBRET

1996 - 2001 E.E.P.S.G. FIORAVANTE ZAMPOL

2004 - 2008 Graduação: Licenciatura em química – Universidade Federal de São Carlos; bolsista CNPQ e FAPESP com iniciação no programa piloto REU - Research experiences for undergraduates na Universidade da Flórida, Gainesville, EUA.

2009 - 2011 Pós-graduação: mestrado em química no Departamento de química da Universidade de São Carlos, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, bolsista FAPESP: “Estudo de plantas e produtos naturais buscando inibidores de enzimas para o desenvolvimento de protótipos para novos fármacos”.

2012 - 2017 Pós-graduação: doutorado em química no Departamento de química, Instituto de química da Universidade de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Paolo Di Mascio, sem bolsa: “Estudo de modificações em proteínas: um enfoque em resíduos de triptofano, histidina e tirosina”.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2012 ESI-TOF Advanced Operator Training Course, na Bruker Daltonic, Bremen, Alemanha.

2013 Participação do 1st Internacional Mass Spectrometry School, Università degli Studi di Siena, Itália.

2015 Treinamento operacional do Sistema LC-MS/MS SCIEX TripleTOF® 6600, AB SCIEX, Brasil.

OCUPAÇÃO

Especialista em espectrometria de massas no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP vinculado ao Núcleo de Pesquisa em Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma), coordenado pela Prof. Dra. Ohara Augusto.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

2013 *5th BrMASS Conference, Campinas, SP* – “Peptides oxidation by singlet molecular oxygen [$O_2(1\Delta g)$]: ^{18}O -labeled $O_2(1\Delta g)$ and mass spectrometry analysis”. Apresentação de **PAINEL**

2015 *23rd Annual SfRBM Meeting, São Francisco, EUA* - “Lysozyme Oxidation by Singlet Molecular Oxygen: Cross-Linking Formation and Proposed Mechanism Using ^{18}O -Labeled Oxygen, and Mass Spectrometry Measurements”. Apresentação de **PAINEL**

2016 *39ª – SBQ – Reunião anual da sociedade brasileira de química, Goiânia, Goiás* – “Oxidação da lisozima por oxigênio molecular singlete: formação de cross-linking e proposta mecanística usando oxigênio- 18 e espectrometria de massas”. Apresentação de **PAINEL**

2016 *6th BrMASS Conference and 1st Ibero american conference in mass spectrometry, Rio de Janeiro, RJ* - “Singlet molecular oxygen oxidation induced cross-Linking formation: proposed mechanism using oxygen- 18 labeling and mass spectrometry”. Apresentação de **PAINEL**

2017 *46th World Chemistry Congress, 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e IUPAC 49th General Assembly, São Paulo, SP*. “Oxygen contribution for oxidation and protein aggregation”. Apresentação **ORAL**

PUBLICAÇÕES REFERENTES AO TRABALHO

Marques, E.F.; Medeiros, M.H.G. DI Mascio, P.; **(2017)** Lysozyme oxidation by singlet molecular oxygen: peptides characterization using [^{18}O]-labeling oxygen and nLC-MS/MS. J. mass spectrom, v. 52:11, p. 739–751.

Paviani, V.; Queiroz, R.L F.; **Marques, E.F.**; DI Mascio, P.; Augusto, O. **(2015)**. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a

ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 89, p. 72-82.

Queiroz, R.F.; Paviani, V.; Coelho, F.R.; **Marques, E.F.**; DI Mascio, P.; Augusto, O. (2013). The carbonylation and covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol. *Biochemical Journal*, 455, 37-46.

PUBLICAÇÕES DIVERSAS

Marques, E.F.; Vieira, P.C.; Severino, R.P. (2015). Acridone alkaloids as inhibitors of cathepsin L and V. *Química Nova*, 1, 58-62.

Marques, E.F.; Silva, L.R.S. P.; Bueno, M.A.; Dos Santos, C.Y.; Severino, R.P.; Martinelli, A.M.; Duarte, P. D.; Corrêa, A.G.; Brömme, D.; Vieira, P.C. (2012). Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 10-21.

Severino, R.P.; Guido, R.V.C.; **Marques, E.F.**; Bromme, D.; Silva, M.F.G.F.; Fernandes, J.B.; Andricopulo, A.D.; Vieira, P.C. (2011). Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 1477-1481.

Alvim, J.; Severino, R.P.; Marques, E.F.; Martinelli, Ariane M.; Vieira, Paulo C.; Fernandes, J.B.; Da Silva, M. F.G.F.; Correa, A.G. (2010). Solution Phase Synthesis of a Combinatorial Library of Chalcones and Flavones as Potent Cathepsin V Inhibitors. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 12, 687-695.

Aponick, A.; Li, C.-Y.; Malinge, J.; Marques, E.F. (2010). A Facile Gold-Catalyzed Synthesis of Heterocycles from Propargyl Alcohols. *Synfacts: current highlights in synthetic organic chemistry*, v. 2010, p. 0093-0093.

Aponick, A.; Li, C.-Y.; Malinge, J.; Marques, E.F. (2009). An Extremely Facile Synthesis of Furans, Pyrroles, and Thiophenes by the Dehydrative Cyclization of Propargyl Alcohols. *Organic Letters*, 11, 4624-4627.