



**Susana Loureiro  
Marçal**

**Stress oxidativo e oxidação proteica: caracterização  
estrutural da  $\alpha$ -amilase**



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2009

**Susana Loureiro  
Marçal**

**Stress oxidativo e oxidação proteica: caracterização  
estrutural da  $\alpha$ -amilase**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos “meus cotinhas” e ao “mérito”.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**  
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
Professora coordenadora convidada do Instituto Politécnico de Saúde do Norte

## **agradecimentos**

Quero expressar o meu profundo agradecimento ao meu orientador, Doutor Pedro Domingues, pelos seus ensinamentos e orientação que permitiram o desenvolvimento deste trabalho. O apoio e palavras de encorajamento que me ajudaram e incentivaram nos momentos mais difíceis e por me ajudar a crescer não só a nível do conhecimento mas também a outros níveis. O meu sincero, muito obrigado.

Ao Doutor Rui Vitorino pelos seus ensinamentos, compreensão, acompanhamento e apoio no laboratório.

À Doutora Rosário Domingues, pela sua boa disposição, ânimo, incentivo e encorajamento.

Aos colegas de laboratório de espectrometria de massa, Ana Isabel, Ana Reis, Armando Caseiro, Cláudia Simões, Miguel, Renato Alves, Rita Pereira, Sofia Guedes, pelo apoio, incentivo e boa disposição.

À Cristina Barros, um agradecimento especial por me ter recebido tão bem no laboratório como “caloira”, pela sua boa disposição, apoio, incentivo e carinho.

À minha grande amiga Ana Lúcia, pelo seu apoio, amizade, encorajamento e companheirismo. Muito obrigado.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram desde o início e me incentivaram.

Aos meus pais, cujo apoio foi fundamental ao longo de toda esta jornada académica e sempre me incentivaram a alcançar os meus objectivos. Pelo seu esforço dia-a-dia a eles dedico do fundo do meu coração tudo o que tenho conseguido até hoje. A eles, um muito obrigado.

Às minhas irmãs e ao meu cunhado.

## palavras-chave

$\alpha$ -amilase, espectrometria de massa, oxidação de proteínas

## resumo

A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* ( $\alpha$ -1,4-D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glucosídicas em oligossacarídeos e polissacarídeos. A  $\alpha$ -amilase humana é uma proteína secretora que é produzida tanto nas glândulas pancreáticas como salivares, constituindo uma porção significativa da saliva e desempenhando um papel importante na digestão inicial do amido, glicogénio e outros polissacarídeos. A oxidação catalisada por metais (MCO) das proteínas possui um papel importante durante o stress oxidativo. O objectivo principal da realização deste trabalho foi a caracterização e identificação das modificações sofridas pela  $\alpha$ -amilase quando oxidada pelo peróxido de hidrogénio (10, 1 e 0,1mM) numa reacção catalisada por metais num sistema *in vitro*. A espectrometria de massa combinada com a cromatografia líquida foi usada para identificar as modificações sofridas por cada uma das  $\alpha$ -amilases em estudo.

Relativamente à actividade enzimática, após sujeito a processo oxidativo, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* sofre menor perda de actividade enzimática do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Quando se utiliza uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM observa-se uma maior diminuição da actividade enzimática para cada uma das  $\alpha$ -amilases quando comparado com uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM e 0,1mM.

Quando comparamos os resultados das modificações sofridas por cada uma das  $\alpha$ -amilases verificamos que a  $\alpha$ -amilase salivar humana, quando sujeita a uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM possui um menor número de resíduos modificados (23) quando comparada com a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (26). Para uma concentração de reagente de  $H_2O_2$  de 1mM, a  $\alpha$ -amilase salivar humana apresenta também um menor número de resíduos oxidados (26) ao fim de 4 horas quando comparado o número dos resíduos oxidados observados para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (44). Os resultados sugerem que o processo de oxidação na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* progride mais rapidamente do que na  $\alpha$ -amilase humana. Isto apesar de a actividade do *Bacillus amyloliquefaciens* se manter, em termos relativos, mais elevada. O número de resíduos de cisteína é significativamente superior na  $\alpha$ -amilase salivar humana, não existindo outras diferenças significativas que permitam justificar a diferença de resíduos oxidados observados. A observação da oxidação da cisteína na posição 399 aos 30 minutos pode justificar a perda mais rápida da actividade enzimática, observada no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. O número diferente de resíduos observados reside muito provavelmente no facto de o processo oxidativo ser mais lento no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. Este facto pode ser justificado pela presença de inúmeras pontes dissulfureto nesta proteína, o que a torna mais compacta e portanto o acesso do radical hidroxilo aos resíduos mais difícil. É importante notar que estes resíduos de cisteína se verificaram ser, em grande medida, resistentes ao processo oxidativo.

## keywords

$\alpha$ -amylase, mass spectrometry, protein oxidation

## abstract

The  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* ( $\alpha$ -1,4-D-glucan glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -1,4-glycosidic links in oligosaccharides and polysaccharides. The human  $\alpha$ -amylase is a secretory protein that is produced both in pancreatic and salivary gland, and is a significant constituent of saliva, playing an important role in the initial digestion of starch, glycogen and other polysaccharides. The oxidation catalyzed by metals (MCO) of the protein has an important role during oxidative stress. The main purpose of this work is the characterization and identification of  $\alpha$ -amylase oxidative modifications by hydrogen peroxide catalyzed by metals in a system in vitro Fenton system. Mass spectrometry, combined with liquid chromatography, was used to identify the oxidative changes of each of the  $\alpha$ -amylase under study.

Regarding enzyme activity, after the oxidative process, the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* suffers less loss of enzyme activity than the human salivary  $\alpha$ -amylase. When using a concentration of  $H_2O_2$  of 10mM there is a greater decrease in enzyme activity for each of the  $\alpha$ -amylase when compared to a concentration of 1mM and 0.1mM of  $H_2O_2$ . When comparing the results of the changes of each of the  $\alpha$ -amylases we found that the human salivary  $\alpha$ -amylase, when subjected to a concentration of 10mM of  $H_2O_2$ , has a smaller number of modified residues (23) when compared with  $\alpha$ -amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* (26). For a concentration of 1 mM of  $H_2O_2$ , the human salivary  $\alpha$ -amylase also has a smaller number of oxidized residues (26) after 4 hours of oxidation when compared the number of oxidized residues observed for  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* (44). The results suggest that the oxidation process in  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* progresses more rapidly than in human salivary  $\alpha$ -amylase. This occurs despite the fact that the activity of *Bacillus amyloliquefaciens* remains relatively higher. The number of cysteine residues is significantly higher in human salivary  $\alpha$ -amylase and no other significant differences justify the difference observed in the number of oxidized residues. The observation of oxidation of cysteine at position 399 at 30 minutes, observed for the human salivary  $\alpha$ -amylase, can justify the faster loss of enzyme activity. The different number of residues observed is very likely to be the result of the slower oxidative process in the case of human salivary  $\alpha$ -amylase. This can be justified by the presence of numerous disulfide bridges in this protein, which makes it more compact and therefore the access of the hydroxyl radical to the amino acid residues is more difficult. It is important to note that these cysteine residues were found to be very resistant to the oxidative process.

**Índice**

I. Introdução geral.....	1
II. Oxidação de proteínas.....	5
1. Stress Oxidativo.....	7
2. Oxidação de proteínas .....	10
3. Tipos de modificações oxidativas nas proteínas.....	14
4. Grupos carbonilo em proteínas oxidadas .....	23
5. Danos oxidativos nas proteínas no envelhecimento e na doença .....	25
III. Espectrometria de Massa .....	29
1. Introdução.....	31
2. Técnicas de ionização .....	33
2.1. Ionização electrospray (ESI) .....	33
2.2. MALDI (ionização/desorção por matriz assistida por laser).....	35
3. Analisadores de massa.....	37
4. Instrumentos Híbridos .....	40
5. Espectrometria de Massa Tandem.....	43
IV. Proteómica.....	45
1. Introdução.....	47
2. Princípios e ferramentas para Proteómica .....	48
2.1. Modificações pós-translacionais .....	51
V. Oxidação da $\alpha$ -amilase.....	55
1. Introdução.....	57
2. $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	58
3. $\alpha$ -amilase salivar humana .....	59
VI. Materiais e métodos.....	61
1. Determinação da actividade enzimática da $\alpha$ -amilase.....	63
2. Oxidação da $\alpha$ -amilase .....	63
3. Determinação de grupos carbonilo .....	64
4. Caracterização e identificação das modificações oxidativas da $\alpha$ -amilase por Espectrometria de Massa.....	65
4.1. Digestão em solução com Tripsina.....	65
4.2. Análise das amostras digeridas por nano-HPLC .....	66



4.3. Espectrometria de Massa (MALDI-TOF-TOF) .....	66
4.4. Pesquisa nas bases de dados .....	67
VII. Resultados e discussão.....	68
1. Oxidação da $\alpha$ -amilase e determinação da sua actividade enzimática.....	70
2. Determinação de grupos carbonilo.....	74
3. Identificação e caracterização das modificações oxidativas da $\alpha$ -amilase.....	74
VIII. Conclusão .....	111
Referências bibliográficas .....	113

---

**Índice de figuras**

<b>Figura 1:</b> Factores que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). (adaptado de (Stadtman 1998)). .....	12
<b>Figura 2:</b> Derivados carbonilo produzidos por oxidação directa das cadeias laterais de aminoácidos (adaptado de (Isabella Dalle-Donne 2003)) .....	23
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo de um espectrómetro de massa (adaptado de Sandra Lee, 2005).....	32
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática do processo de ionização electrospray.....	34
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo do processo de ionização MALDI. (adaptado de <a href="http://www.magnet.fsu.edu">www.magnet.fsu.edu</a> ) .....	36
<b>Figura 6:</b> Estrutura da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> . (adaptado de <a href="http://www.pubmed.gov">www.pubmed.gov</a> ) .....	58
<b>Figura 7:</b> Estrutura da $\alpha$ -amilase salivar humana. (adaptado de (Fisher, Govindasamy et al. 2006)) .....	60
<b>Figura 8:</b> Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da $\alpha$ -amilase <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e da $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM .....	71
<b>Figura 9:</b> Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da $\alpha$ -amilase <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e da $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração do reagente de Fenton de 1mM .....	71
<b>Figura 10:</b> Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da $\alpha$ -amilase <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e da $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração do reagente de Fenton de 0,1mM .....	72

- Figura 11:** Conteúdo em grupos carbonilo na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* após a incubação com diferentes concentrações  $H_2O_2$  a  $37^\circ C$  em tampão fosfato (20mM, pH 6.9).....75
- Figura 12:** Conteúdo em grupos carbonilo na  $\alpha$ -amilase salivar humana após a incubação com diferentes concentrações  $H_2O_2$  a  $37^\circ C$  em tampão fosfato (20mM, pH 6.9) .....75
- Figura 13:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM.....77
- Figura 14:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM .....78
- Figura 15:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 0,1mM .....78
- Figura 16:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.....79
- Figura 17:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.....80
- Figura 18:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 0,1mM.....80
- Figura 19:** Sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* com as modificações sofridas para os diferentes períodos de incubação (0-4h) .....84

<b>Figura 20:</b> Resíduos modificados identificados na sequência da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para os vários períodos de incubação em estudo (0-4h) para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM .....	85
<b>Figura 21:</b> Resíduos modificados identificados na sequência da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para os vários períodos de incubação em estudo (0-4h) para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 1mM .....	85
<b>Figura 22:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e a % actividade enzimática da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM.....	86
<b>Figura 23:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e a % actividade enzimática da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 1mM.....	87
<b>Figura 24:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e conteúdo em grupos carbonilo da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM, em função dos diferentes períodos de incubação .....	88
<b>Figura 25:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 1mM, em função dos diferentes períodos de incubação	89
<b>Figura 26:</b> Resíduos oxidados para cada período de incubação da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM.....	91
<b>Figura 27:</b> Resíduos oxidados para cada período de incubação da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 1mM.....	91
<b>Figura 28:</b> Percentagem de resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM .....	92

<b>Figura 29:</b> Percentagem de resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de $H_2O_2$ de 1mM .....	93
<b>Figura 30:</b> Sequência da $\alpha$ -amilase salivar humana com as modificações sofridas com o decorrer dos diferentes períodos de incubação (0-4h) .....	95
<b>Figura 31:</b> Resíduos modificados identificados para os diferentes períodos de incubação (0-4h) da $\alpha$ -amilase salivar humana, para uma concentração de $H_2O_2$ de 10mM .....	96
<b>Figura 32:</b> Resíduos modificados identificados para os diferentes períodos de incubação (0-4h) da $\alpha$ -amilase salivar humana, para uma concentração de $H_2O_2$ de 1mM .....	96
<b>Figura 33:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e a % de actividade enzimática da $\alpha$ -amilase salivar humana em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de $H_2O_2$ de 10mM .....	98
<b>Figura 34:</b> Relação entre o número de resíduos oxidados e a % de actividade enzimática da $\alpha$ -amilase salivar humana em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de $H_2O_2$ de 1mM .....	99
<b>Figura 35:</b> Relação entre o conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados com o decorrer dos diferentes períodos de incubação da $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de $H_2O_2$ de 10mM .....	101
<b>Figura 36:</b> Relação entre o conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados com o decorrer dos diferentes períodos de incubação da $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de $H_2O_2$ de 1mM .....	101
<b>Figura 37:</b> Resíduos oxidados da $\alpha$ -amilase salivar humana para cada período de incubação para uma concentração de $H_2O_2$ de 10mM .....	104

**Figura 38:** Resíduos oxidados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para cada período de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM ..... 104

**Figura 39:** Percentagem de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.. 106

**Figura 40:** Percentagem de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.... 106



---

**Índice de Esquemas**

<b>Esquema 1:</b> Esquema da reacção de oxidação da arginina a semialdeído glutâmico. (adaptado de (Requena, Chao et al. 2001)) .....	14
<b>Esquema 2:</b> Esquema da reacção de oxidação da lisina a semialdeído aminoadípico. (adaptado de (Requena, Chao et al. 2001)) .....	15
<b>Esquema 3:</b> Esquema da reacção de oxidação da Prolina a ácido piroglutâmico. (adaptado de (Amici, Levine et al. 1989)) .....	15
<b>Esquema 4:</b> Esquema da reacção de oxidação da Prolina a 2-pirrolidona. (adaptado de (Barelli 2008)) .....	16
<b>Esquema 5:</b> Estrutura da metionina e os seus produtos de oxidação. (adaptado de (Vogt 1995))..	16
<b>Esquema 6:</b> Esquema de reacção proposto para a formação de aductos MDHDC – proteína. (adaptado de (Tuma, Kearley et al. 2001)) .....	17
<b>Esquema 7:</b> Reacção de formação da Quineurina a partir da oxidação do Triptofano. (adaptado de (Taylor, Fahy et al. 2003)) .....	18
<b>Esquema 8:</b> Reacção de formação da 3 - hidroxiquineurina a partir da oxidação do Triptofano. (adaptado de (Stadtman and Levine 2003)) .....	19
<b>Esquema 9:</b> Reacção de formação do ácido cisteico a partir da oxidação da Cisteína. (adaptado de (Barelli 2008)) .....	19
<b>Esquema 10:</b> Reacção de deaminação da asparagina. (adaptado de (Robinson 2004)).....	20
<b>Esquema 11:</b> Reacção de formação da tetrahydropterina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003)) .....	21
<b>Esquema 12:</b> Reacção de hidroxilação da Tirosina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003)) .....	22
<b>Esquema 13:</b> Reacção de hidroxilação da Fenilalanina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003)) .....	22
<b>Esquema 14:</b> Reacção de hidroxilação do Triptofano. (adaptado de (Fitzpatrick 2003)) .....	22





---

**Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Resultados obtidos para as diferentes concentrações do reagente de Fenton utilizadas para a $\alpha$ -amilase <i>Bacillus</i> sp e $\alpha$ -amilase salivar humana. ....	70
<b>Tabela 2:</b> Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para cada uma das concentrações de reagente de Fenton em estudo, para a $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> . ( $\sigma$ - desvio padrão) .....	74
<b>Tabela 3:</b> Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para cada uma das concentrações de reagente de Fenton em estudo, para a $\alpha$ -amilase salivar humana (50 $\mu$ g). ( $\sigma$ – desvio padrão) .....	74
<b>Tabela 4:</b> Lista das modificações oxidativas. (Fonte: <a href="http://www.unimod.org">www.unimod.org</a> ).....	82
<b>Tabela 5:</b> Resumo do processo de oxidação da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para os diferentes períodos de incubação e percentagem de actividade correspondente, para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM e 1mM.....	86
<b>Tabela 6:</b> Número de resíduos oxidados e respectiva concentração de grupos carbonilo para os diferentes períodos de incubação da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM e 1mM.....	88
<b>Tabela 7:</b> Resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação da $\alpha$ -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM e 1mM .....	90
<b>Tabela 8:</b> Número de resíduos modificados correspondente a cada período de incubação para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM e 1mM.....	92
<b>Tabela 9:</b> Resumo do processo de oxidação para os diferentes períodos de incubação e percentagem de actividade da $\alpha$ -amilase salivar humana correspondente a uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM .....	98
<b>Tabela 10:</b> Número de resíduos oxidados e respectiva concentração de grupos carbonilo da $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação, para uma concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de 10mM e 1mM.....	100

**Tabela 11:** Resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM ..... 103

**Tabela 12:** Número de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana correspondente a cada período de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM ..... 105

**Abreviaturas**

2-DE – electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

ACN - acetonitrilo

ALS – esclerose amiotrófica lateral, do inglês “amyotrophic lateral sclerosis”

BSA – albumina de soro bovino

Da - Dalton

DNA – ácido desoxiribonucleíco

DNP – 2,4-dinitrofenilhidrazona

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

ESI – ionização electrospray

HPLC – cromatografia líquida de alta pressão

ICR – ressonância ciclótrão de ião

IT – trapa de iões

MALDI – ionização/desorção por laser por matriz assistida

MS – espectrometria de massa

MS/MS – espectrometria de massa tandem

Q - quadrupolar

ROS – espécies reactivas de oxigénio

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio – electroforese em gel de poliacrilamida

TCA – ácido tricloroacético

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – tempo-de-vôo

TOF/TOF – tempo-de-vôo tandem



## **I. Introdução geral**

---



Os organismos aeróbicos não podem viver sem oxigénio, contudo viver com oxigénio também pode ser perigoso. (Davies 2000) Em consequência do metabolismo aeróbico normal, formam-se alguns intermediários reactivos de oxigénio que, sob determinadas circunstâncias (stress oxidativo), podem danificar constituintes celulares. O stress oxidativo está associado com uma grande variedade de processos degenerativos, doenças e síndromas. Os danos oxidativos no ADN são responsáveis pela mutagenicidade, transformação celular e cancro. (Valko, Rhodes et al. 2006) Há evidências de que o stress oxidativo está relacionado com diversas doenças como doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, arteriosclerose, enfartes cardíacos. (Pham-Huy 2008) Distúrbios do sistema nervoso central também têm sido investigados por poderem estar relacionados com o stress oxidativo, como a esclerose amiotrófica lateral, a esclerose múltipla, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. (Migliore and Coppede 2009)

O stress oxidativo é definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, que pode causar danos oxidativos. (Betteridge 2000) A maioria dos oxidantes nos organismos vivos são radicais livres e, porque contém pares de electrões não emparelhados, são espécies muito reactivas. (Sies 1997) O radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) e o anião superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) são alguns exemplos desses radicais livres e são chamados de espécies reactivas de oxigénio (ROS). As espécies reactivas de azoto (RNS), como o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), são radicais livres enquanto o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) não é um radical livre mas é um oxidante importante que está presente nos sistemas biológicos. Os oxidantes podem ser formados por diferentes mecanismos, como o metabolismo celular (por exemplo respiração aeróbica, resposta imune), diferentes tipos de radiação (raios-X, luz ultravioleta, ultrasons e radiação microondas) e por reacções tipo-Fenton (reacções catalisadas por metais de transição). (Valko, Morris et al. 2005)

Em organismos saudáveis, a produção de oxidantes é equilibrada pelas defesas antioxidantes. Em alguns casos, níveis moderados de oxidantes, podem funcionar como sinais de transdução e ser benéficos para o organismo. Mas noutros casos, este balanço pode ser perturbado, como resultado do aumento da produção de oxidantes, ou diminuição das defesas antioxidantes, ou mesmo de ambos. Nestes casos, a resposta celular pode ser variada, incluindo o aumento da proliferação, a prevenção da divisão celular, a senescência e a morte celular (por apoptose ou necrose). (Halliwell 2007)



A proteômica em geral prende-se com a determinação, em larga escala, dos genes e com a função celular ao nível das proteínas. Uma abordagem poderosa da proteômica foca-se na análise *de novo* de proteínas ou populações de proteínas isoladas a partir de células ou tecidos. Tais estudos geralmente colocam desafios devido ao elevado grau de complexidade dos proteomas celulares e a baixa abundância de muitas proteínas, que necessitam de técnicas analíticas altamente sensíveis. (Aebersold and Mann 2003) A espectrometria de massa (MS) é cada vez mais o método de escolha para análise de amostras de proteínas complexas. A espectrometria de massa (MS) baseada na proteômica é uma disciplina que se tornou possível graças à disponibilidade de bases de dados de sequências de genes e genomas. (Pandey and Mann 2000), tendo-se estabelecido como uma tecnologia indispensável na interpretação da informação codificada nos genomas. A análise de proteínas (sequência primária, modificações pós-translacionais ou interações proteína-proteína) por espectrometria de massa tornou-se bem sucedida na análise de pequenos grupos de proteínas isolados, em determinados contextos funcionais específicos. (Aebersold and Goodlett 2001)

Neste trabalho descreve-se o processo de oxidação de duas proteínas e a caracterização e identificação das modificações oxidativas sofridas por estas ao longo do processo de oxidação. O estudo centrou-se em duas  $\alpha$ -amilases diferentes: a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Neste estudo, usaram-se três condições oxidativas, correspondendo, respectivamente, a concentrações de 10mM, 1mM e 0,1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As amostras foram analisadas após diferentes períodos de incubação (0-4h). Posteriormente procedeu-se à determinação da actividade enzimática e dos grupos carbonilo. Após a determinação dos grupos carbonilo, cada uma das amostras de  $\alpha$ -amilase foram digeridas em solução com tripsina e posteriormente analisadas por nano-HPLC e por MALDI-TOF/TOF. A análise por MALDI-TOF/TOF permitiu identificar as modificações sofridas ao longo dos vários períodos de incubação por cada uma das  $\alpha$ -amilases.

## **II. Oxidação de proteínas**

---



## 1 Stress Oxidativo

Aparentemente, o stress oxidativo existe desde que existe vida. A vida começou espontaneamente a partir de elementos químicos básicos simples na presença de radiação ionizante solar. O aumento do oxigénio atmosférico e das reacções fotoquímicas conhecidas como fontes de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot\cdot}$  tornaram a evolução da vida possível, permitindo que os organismos tivessem a capacidade de realizar processos metabólicos utilizando oxigénio e radicais livres resultantes de reacções de oxidação/redução. (Hagerman 2006) A longevidade das espécies depende de como estas se ajustam a ambientes oxidativos e da sua capacidade adaptativa. A fase inicial desse processo de adaptação foi a adaptação ao oxigénio, como uma função de defesa por parte do organismo contra a radiação e contra ameaças oxidativas. (Byung Pal Yu 2006) Existem vários factores ambientais que induzem o stress oxidativo. O stress oxidativo induzido por factores ambientais pode causar alterações metabólicas que aumentam a produção de ROS ou diminuem a produção de antioxidantes. (Hagerman 2006) O excesso de radiação, a temperatura, os poluentes químicos ou tóxicos, o stress nutritivo, a competição entre organismos incluindo parasitas, a anoxia e a doença são factores que contribuem para danos oxidativos.

A irradiação é um dos factores ambientais que induz o stress oxidativo. A radiação ultravioleta (280-320nm) pode causar danos no ADN, proteínas e membranas, e está associada ao cancro da pele e também às cataratas nos seres humanos. A irradiação de elevada energia como os raios - X e os raios  $\gamma$  causam danos oxidativos severos. No entanto, este tipo de radiação tem menor contribuição para o stress oxidativo global excepto durante tratamentos médicos, ou em ambientes com elevados níveis de radioactividade. (Hagerman 2006)

As temperaturas extremas também afectam o stress oxidativo. O choque térmico afecta o transporte de electrões e altera a integração de moléculas enzimáticas e antioxidantes, levando à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). (Gong 2001) Baixas temperaturas, especialmente quando acompanhadas por uma elevada iluminação, induzem a produção de ROS nas plantas. As fases enzimáticas da fotossíntese são mais lentas devido às baixas temperaturas, conduzindo a um excesso de excitação de electrões quando os níveis de luz são elevados. (Prasad, Anderson et al. 1994) Nos animais, a

tolerância ao frio é frequentemente atingida por uma diminuição no metabolismo mesmo em estado de hibernação. O stress oxidativo é uma consequência não do frio, mas do rápido aumento no metabolismo oxidativo quando as temperaturas voltam ao normal. (Storey 1996)

Os poluentes e químicos tóxicos são outro dos factores que induzem o stress oxidativo. O ozono é um poluente do ar que é formado pela interacção de óxidos de azoto, hidrocarbonetos e radiação UV. Os níveis de ozono na atmosfera têm vindo a aumentar nas últimas décadas. O ozono é um forte oxidante que origina ROS como  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$ ,  $^1O_2$  (oxigénio singuleto) e radicais hidroperóxido. (Hagerman 2006) O ozono tem efeitos agudos e crónicos nos pulmões, estimulando respostas inflamatórias que causam danos oxidativos directos nos tecidos dos pulmões. A acumulação de metais pesados geralmente tem efeitos drásticos nas espécies, incluindo mecanismos de toxicidade como a indução de ROS por auto-oxidação e reacções de Fenton; obstrução de grupos funcionais essenciais e deslocamento de iões metálicos a partir de proteínas essenciais. (Gallego 1996)

Outro factor a ter em conta e que induz o stress oxidativo é o stress nutritivo. As necessidades nutricionais das plantas e dos animais são diferentes, sendo as plantas autotróficas e os animais heterotróficos. O  $CO_2$  atmosférico é essencial para o crescimento das plantas, e as actividades humanas causam uma duplicação na concentração de  $CO_2$  atmosférico. (IPCC 2001, fonte: [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch)) Concentrações elevadas de  $CO_2$  aumentam a taxa fotossintética. Outras alterações climáticas incluindo temperaturas elevadas irão contribuir para o aumento do stress oxidativo. (Marabottini, Schraml et al. 2001) As plantas dependem do solo e da água para obterem os seus nutrientes essenciais incluindo azoto, fósforo e enxofre. Uma inadequada disponibilidade de nutrientes no solo conduz a um défice nutritivo para a planta, levando inevitavelmente à limitação da fotossíntese. (Grossman and Takahashi 2001) O stress nutritivo em animais pode incluir deficiências específicas na obtenção de nutrientes como aminoácidos essenciais, vitaminas e metais pesados. Os metais pesados são essenciais para a actividade de enzimas como a superóxido dismutase (Mn, Cu e/ou Zn); catalase; e glutathione peroxidase (Se), mas estas deficiências resultam em danos oxidativos raros. (Finkel and Holbrook 2000)

A falta de oxigénio (anoxia) inibe a respiração tanto nas plantas como nos animais, com consequências significativas para todas as suas funções celulares. Nas plantas, a saturação com água pode causar anoxia especialmente nas raízes. A saturação com água

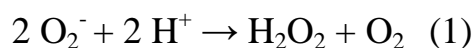
limita a capacidade fotossintética através de alterações nas relações hídricas, fechando os estomas e, finalmente, limitando o CO<sub>2</sub>. (Vartapetian 1997) Nos animais, isquemia (fornecimento inadequado de oxigênio a um determinado órgão ou tecido) pode ser uma consequência da aterosclerose ou coágulos no sangue (bloqueiam as artérias); hipotensão (baixa pressão sanguínea); ou um tumor. O dano oxidativo acompanha a reperfusão de um tecido quando o tecido é re-fornecido com sangue, e a suplementação com antioxidantes pode limitar o dano isquémico-reperfusão. (Ramires and Ji 2001)

O stress oxidativo desempenha um papel complexo na doença, tanto nas plantas como nos animais. Nos animais, a acumulação de produtos do stress oxidativo endógenos contribui para doenças crônicas incluindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, e vários tipos de cancro. Embora o stress oxidativo não seja a causa final de qualquer uma destas doenças, a acumulação de produtos do stress oxidativo contribui para o seu desenvolvimento e sintomas. Nos animais e nas plantas, o ataque por parasitas e micróbios patogénicos pode resultar na produção de ROS como resposta defensiva contra esses mesmos micróbios patogénicos. (Cao, Baldini et al. 2001) O sistema imunitário dos animais depende das ROS para eliminar os micróbios patogénicos, servindo também como sinais para actividades inflamatórias adicionais. Se a resposta inflamatória não é controlada, poderá ser responsável por doenças como a artrite e a doença de Crohn, com destruição do tecido saudável através de uma resposta entre a produção de ROS e a estimulação da resposta inflamatória. (Hagerman 2006)

O stress oxidativo produz profundas alterações na membrana celular de lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, prejudicando o metabolismo celular. O stress oxidativo ocorre quando o equilíbrio entre a formação de oxidantes excede a capacidade dos sistemas antioxidantes removerem ROS (espécies reactivas de oxigênio). (Shacter 2000) Com o stress oxidativo, aumenta a produção de radicais livres, espécies reactivas de oxigênio (ROS) e a ocorrência de reacções relacionadas com oxidantes. (Shacter 2000; Stadtman and Levine 2000)

## 2 Oxidação de proteínas

Os organismos aeróbicos estão expostos a diversas espécies reactivas de oxigénio (ROS) que podem danificar, quer directa ou indirectamente, todas as biomoléculas como proteínas, lípidos, DNA e hidratos de carbono. (Byung Pal Yu 2006) As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são compostas derivados a partir do oxigénio molecular,  $O_2$ , por redução química parcial. Os ROS incluem compostos da família do oxigénio como o peróxido de hidrogénio,  $H_2O_2$ , produzido quando o  $O_2$  é reduzido; formas reactivas de oxigénio incluindo o anião superóxido,  $O_2^{\cdot-}$ ; e radicais hidroxilo,  $\cdot OH$ . A redução completa do  $O_2$  por adição de quatro electrões origina duas moléculas de água, um composto estável que não é ROS. (Hagerman 2006) Quando uma espécie tem um par de electrões desemparelhado é chamada de radical livre. O oxigénio molecular pode ser reduzido a um electrão originando superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a primeira espécie produzida em muitas cascatas oxidativas biológicas. O  $H_2O_2$  pode sofrer clivagem homolítica originando dois radicais hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Os radicais livres são considerados ROS mesmo quando eles não são derivados directamente a partir do oxigénio. (Beal 2002; Hagerman 2006) O radical superóxido é moderadamente reactivo com a maioria dos compostos biológicos, mas em solução aquosa este reage rapidamente para formar peróxido de hidrogénio (eq. 1):

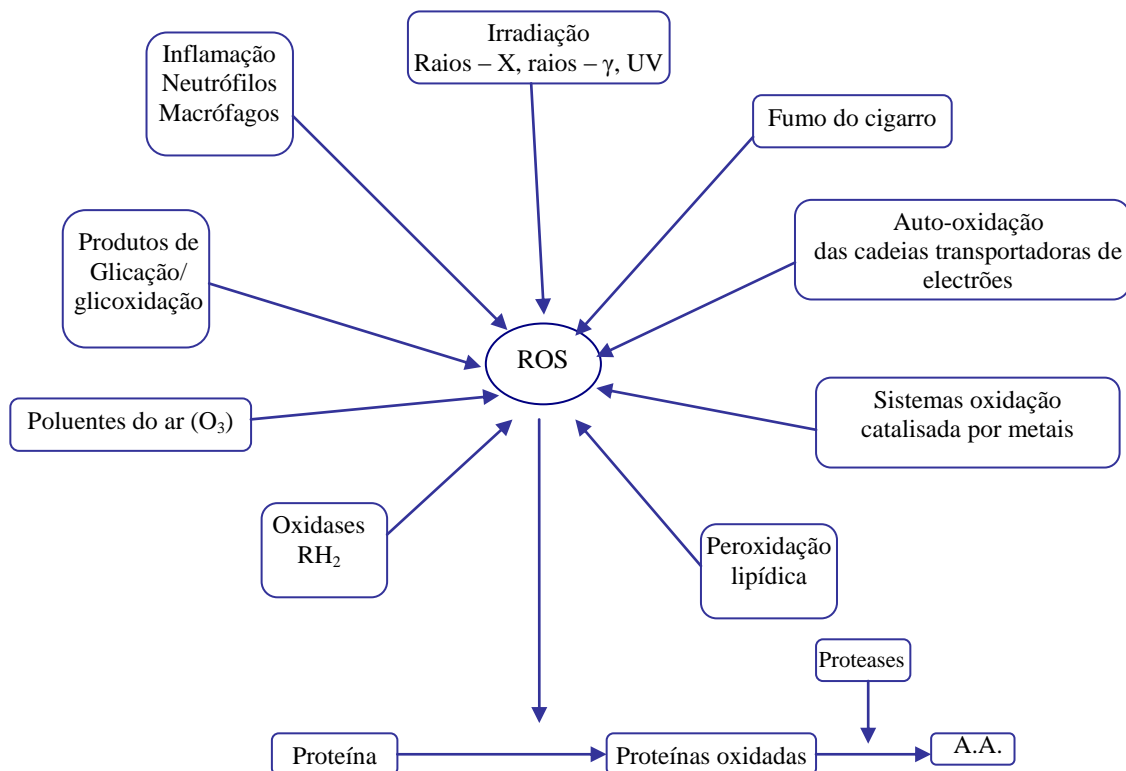


$H_2O_2$  é moderadamente reactivo, tem um tempo de vida relativamente longo e pode difundir-se a alguma distância a partir do local de produção, através das membranas celulares. (Vranova, Inze et al. 2002) O  $H_2O_2$  reage com iões metálicos reduzidos como o ferro ou o cobre para formar um radical hidroxilo altamente reactivo (química de Fenton) (eq. 2):



Em sistemas biológicos, os iões metálicos podem ser reduzidos pelo superóxido, ácido ascórbico, ou uma variedade de outros agentes redutores. O ciclo redox envolvendo reduções repetidas dos iões metálicos, e a produção contínua de radicais hidroxilo assegura

que apenas quantidades catalíticas do metal sejam necessárias para produzir radicais hidroxilo. Todas as espécies reactivas de oxigénio são produzidas como consequência do metabolismo normal. Quando qualquer uma destas espécies reactivas de oxigénio (ROS) é produzida em quantidades descontroladas pode danificar proteínas, ADN e lípidos. (Halliwell 1996) As espécies reactivas de oxigénio (ROS) podem ser produzidas por um grande número de diferentes mecanismos como mostra a figura 1.



**Figura 1:** Factores que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS). (adaptado de (Stadtman 1998)).

O ozono (O<sub>3</sub>) é um dos maiores oxidantes presentes no ar e é a causa de muitas patologias para as células epiteliais e para o tracto respiratório. (Valacchi, Pagnin et al. 2004) A pH fisiológico, o ozono reage com a água produzindo radicais livres como  $\cdot\text{OH}$ , que pode promover a oxidação de aminoácidos e lípidos. (Valentina Cecarini 2007)

O fumo do cigarro é outro dos factores que leva à formação de ROS. O fumo do cigarro está relacionado com diversas doenças como a bronquite, enfisema, doenças vasculares e um grande número de cancros. (Das 2003) O fumo do cigarro contém moléculas de quinona e hidroquinona que promovem um sistema redox muito reactivo



envolvendo  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$ ,  $NO$  e  $H_2O_2$ . (Pignatelli, Li et al. 2001) Em conjunto, estas espécies promovem danos no ADN, oxidação de proteínas e peroxidação de lípidos. O fumo do cigarro também é capaz de converter a tirosina a 3-nitrotirosina e ditirosina, promovendo uma oxidação adicional da proteína. (Valentina Cecarini 2007)

As radiações ionizantes, como os raios-X e raios- $\gamma$ , também estão envolvidas na produção de radicais livres. A formação de ROS induzida por radiação necessita da presença de oxigénio e água. (Riley 1994) As espécies altamente reactivas que se formam a partir da radiação ionizante são os radicais livres hidroxilo, que se formam a partir da radiólise da água. Uma vez formadas, estas espécies reactivas podem causar danos no ADN e nas proteínas. As proteínas com vários resíduos de cisteína e metionina são particularmente vulneráveis à oxidação por raios-X. A oxidação destas proteínas pode resultar no desenrolamento das mesmas e formação de dímeros ligados por pontes dissulfureto. (Skouri-Panet, Bonnet et al. 2001) A radiação pode causar, também, a oxidação de resíduos de aminoácidos específicos no local activo das enzimas, reduzindo a sua actividade. Por exemplo, a actividade da creatina cinase é reduzida como consequência da exposição a raios-X, possivelmente devido à oxidação de um resíduo de Triptofano essencial no local activo. (Koufen, Ruck et al. 1999)

A radiação UV é uma das formas mais potentes de produzir ROS. (Masaki, Atsumi et al. 1995) A energia produzida pela radiação UV é transferida para o oxigénio molecular a partir de cromóforos endógenos, como a riboflavina, NADH/NADPH e triptofano. Estes processos levam à produção de  $O_2^{\cdot -}$  que é rapidamente convertido a  $H_2O_2$ . O produto final é um radical livre altamente reactivo,  $\cdot OH$ . (Valentina Cecarini 2007)

Os mecanismos como a respiração aeróbica, a síntese de óxido nítrico e as vias de oxidação de NADPH podem formar ROS durante processos inflamatórios. Na respiração aeróbica, a cadeia respiratória mitocondrial produz ROS transferindo os seus electrões para a molécula da água através da redução do oxigénio molecular. Durante este processo, alguns electrões escapam da cadeia transportadora de electrões e interagem com o oxigénio formando  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$  ou  $H_2O_2$ . (Cadenas and Davies 2000) As células inflamatórias podem utilizar o complexo NADPH oxidase para originar radicais livres de oxigénio incluindo  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  a fim de eliminar bactérias e outros micróbios patogénicos. (Valentina Cecarini 2007)

A importância da oxidação de proteínas para a homeostase celular deriva do facto de que as proteínas desempenham papéis vitais na regulação da estrutura da célula, sinalização celular, e vários processos enzimáticos da célula. A oxidação de proteínas contribui para o stress oxidativo afectando directamente a sinalização celular, a estrutura celular e processos enzimáticos como o metabolismo. (Davies 2000; Grune, Jung et al. 2004) Existem várias formas diferentes de induzir a oxidação de proteínas incluindo a oxidação catalisada por metais, oxidação induzida por clivagem, oxidação de aminoácidos, e conjugação com produtos da peroxidação lipídica. (Valentina Cecarini 2007)

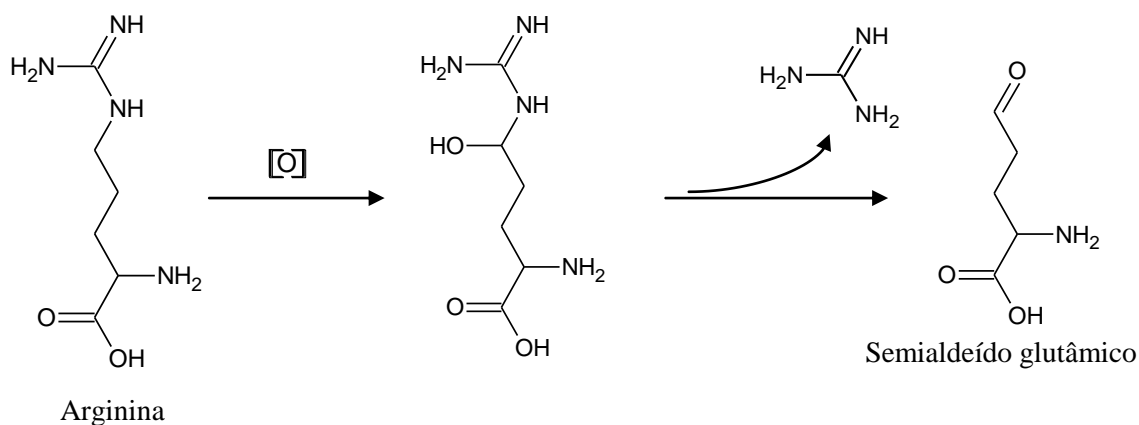
Há evidências de que a oxidação catalisada por metais de proteínas é um dos mecanismos mais comuns que induzem a oxidação de proteínas, especialmente com a formação de grupos carbonilo. Neste processo há a formação de  $H_2O_2$  e estão presentes iões como Fe (III) ou Cu (II). (Stadtman and Levine 2003) A NADH e a NADPH oxidase e outros sistemas de oxidação catalisam a formação de  $H_2O_2$  e Fe (II) ou Cu (I). Os iões Fe (II) ou Cu (I) ligam-se a locais específicos na proteína e reagem com o peróxido de hidrogénio originando  $\cdot OH$ . O radical hidroxilo formado ataca os resíduos dos aminoácidos que se encontrem próximos do local de ligação do metal. (Stadtman 1997) Os ROS podem também induzir a clivagem de ligações peptídicas nas proteínas por dois processos: via diamida e a via  $\alpha$ -amidação. O radical hidroxilo formado a partir da radiólise da água ou formado a partir do  $H_2O_2$  reage com proteínas para formar água e um radical alquilo (radical centrado no carbono). Este radical pode depois ligar-se com outros radicais alquilo e formar agregados de proteínas ou reagir com  $O_2$  para formar um radical alquil peróxido. Este pode ser depois convertido por acção do Fe (II) ou  $HO\cdot_2$  a alquil peróxido. (Stadtman 1997) A clivagem das ligações peptídicas pode também ocorrer, entre outros, por reacção do radical livre  $\cdot OH$  com resíduos de prolina, asparagina e glutamato da cadeia da proteína. (Stadtman and Levine 2000)

### 3 Tipos de modificações oxidativas nas proteínas

A oxidação de proteínas corresponde a uma modificação covalente que ocorre na proteína, que podem ser induzidas tanto por espécies reactivas de oxigénio (ROS) como pela reacção com produtos secundários resultantes do stress oxidativo. (Shacter 2000)

As modificações oxidativas nas biomoléculas podem ocorrer tanto por radicais de oxigénio livres, como anião superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), radical hidropéroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical alquilo ( $\dot{R}$ ), radical peróxilo ( $ROO^{\cdot}$ ), radical alquoxilo ( $RO^{\cdot}$ ), radical hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), radical tiol ( $RS^{\cdot}$ ), radical sulfinilo ( $RSO^{\cdot}$ ), radical tioperoxilo ( $RSOO^{\cdot}$ ); como por derivados de oxigénio não radicalares, entre os quais HOCl (modifica os aminoácidos a produtos reactivos),  $H_2O_2$ , HONOO, ONOO $^-$ , ozono, oxigénio singuleto,  $NO_2^+$ ,  $N_2O_2$ , HNE (4-hidroxi-2-nonenal), deoxiozonas, e cetoaminas. (Stadtman 1998) Os esquemas a seguir representados mostram algumas das modificações oxidativas que ocorrem nas proteínas.

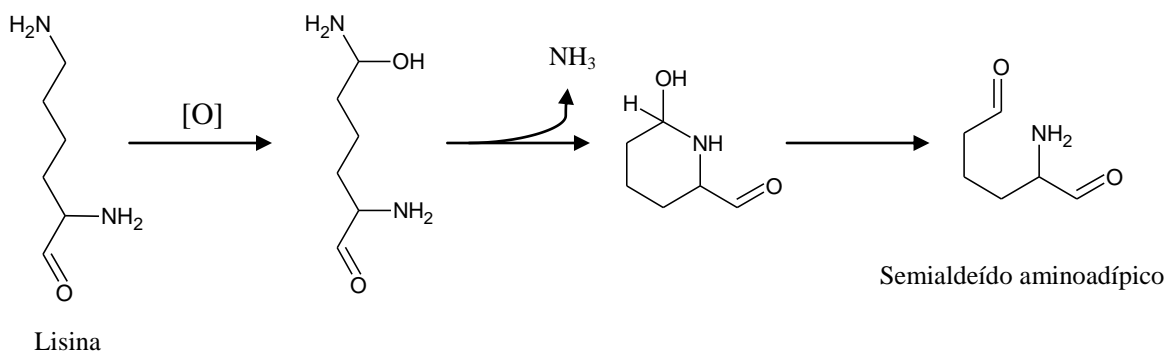
A oxidação da arginina a semialdeído glutâmico foi descoberta por *Amici et al.* (Amici, Levine et al. 1989). O esquema 1 mostra a reacção de oxidação da arginina.



**Esquema 1:** Reacção de oxidação da arginina a semialdeído glutâmico. (adaptado de (Requena, Chao et al. 2001))

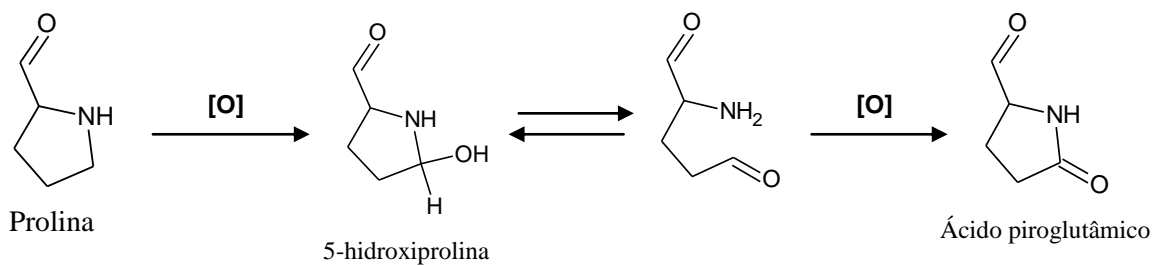
A oxidação da Lisina também foi descoberta por *Amici et al.* (Amici, Levine et al. 1989). Outros autores como (Berlett, Friguet et al. 1996) e (Requena, Chao et al. 2001)

observaram esta reacção de oxidação. A oxidação da Lisina origina semialdeído aminoalifático, como se pode observar no esquema 2.



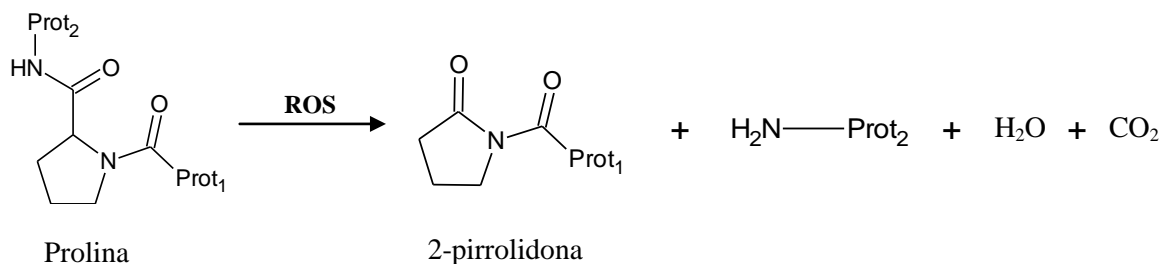
**Esquema 2:** Reacção de oxidação da lisina a semialdeído aminoalifático. (adaptado de (Requena, Chao et al. 2001))

A oxidação da Prolina foi descoberta por *Creeth* em 1983.(Creeth, Cooper et al. 1983; Stadtman and Levine 2003) Os produtos de oxidação da Prolina são o ácido piroglutâmico, 2-pirrolidona e pirrolidinona. A reacção de oxidação da Prolina a ácido piroglutâmico está representada no esquema 3.



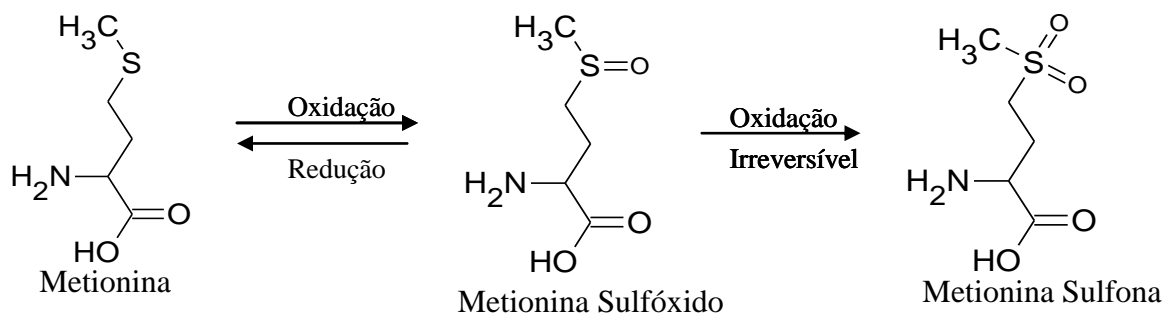
**Esquema 3:** Reacção de oxidação da Prolina a ácido piroglutâmico. (adaptado de (Amici, Levine et al. 1989))

O esquema 4 a seguir representado mostra a oxidação da Prolina a 2-pirrolidona.



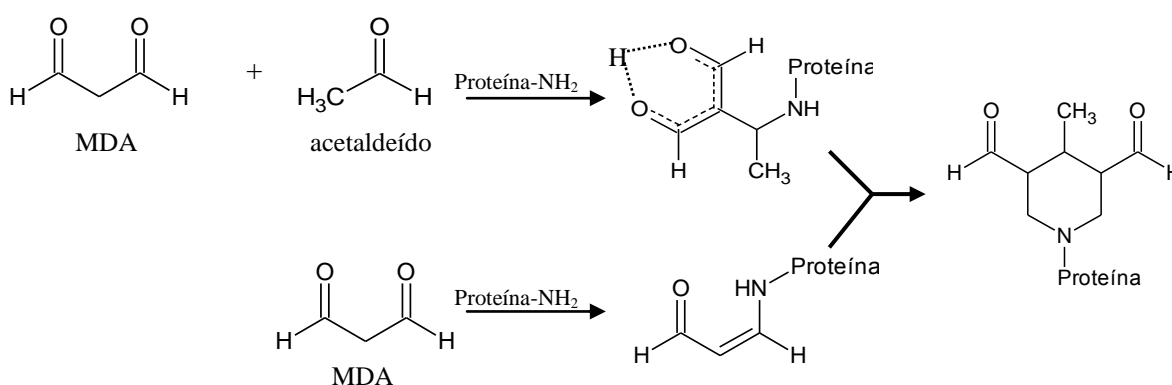
**Esquema 4:** Reacção de oxidação da Prolina a 2-pirrolidona. (adaptado de (Barelli 2008))

Em 1995, *Walther Vogt* descreveu a oxidação dos resíduos de metionina. (Vogt 1995) A metionina é um dos resíduos de aminoácidos que é mais susceptível de sofrer oxidação, juntamente com o triptofano e a cisteína. A primeira fase de oxidação da metionina leva à formação da metionina sulfóxido. O passo seguinte, oxidação a metionina sulfona, requer um ataque químico mais drástico. (Vogt 1995) A reacção de oxidação da metionina pode ser observada no esquema 5.



**Esquema 5:** Reacção de oxidação da metionina. (adaptado de (Vogt 1995))

*Pryor e Stanley* sugeriram em 1975 um mecanismo para a formação do malonilaldeído a partir da autooxidação de ácidos gordos polinsaturados. (Pryor and Stanley 1975) O MDA é um dos produtos resultantes da peroxidação lipídica. Muitos dos produtos resultantes da peroxidação lipídica reagem com proteínas e com o ADN tornando-se mutagênicos e tóxicos. O MDA parece ser o produto resultante da peroxidação lipídica mais mutagénico. (Marnett 1999) O esquema 6 a seguir representado mostra a ligação do MDA a uma proteína.

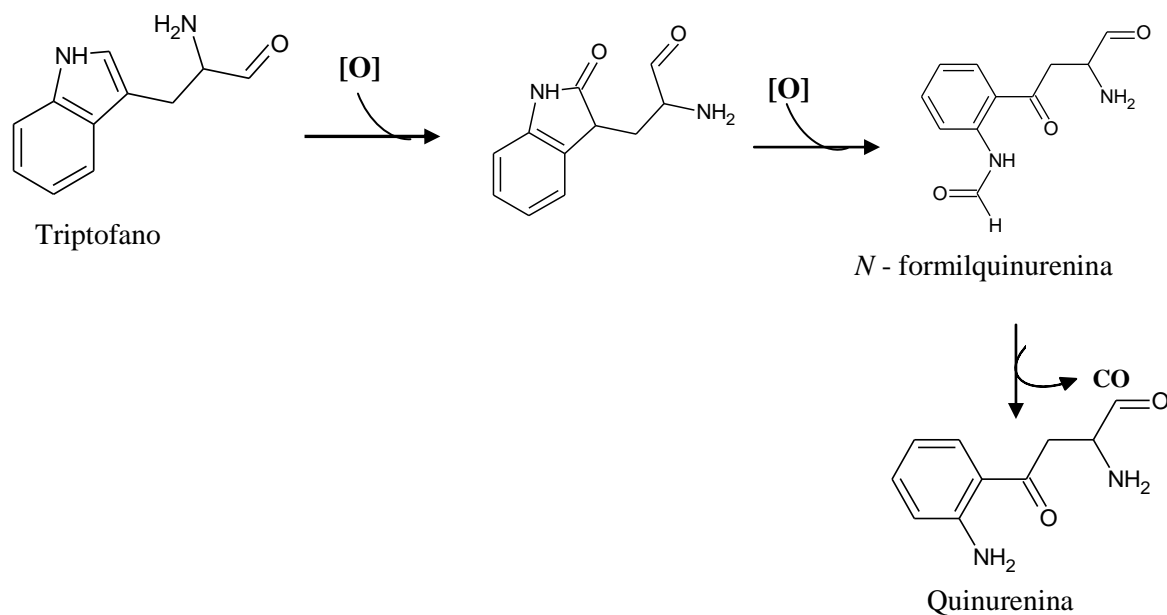


**Esquema 6:** Reacção de formação de aductos MDHDC – proteína. (adaptado de (Tuma, Kearley et al. 2001))

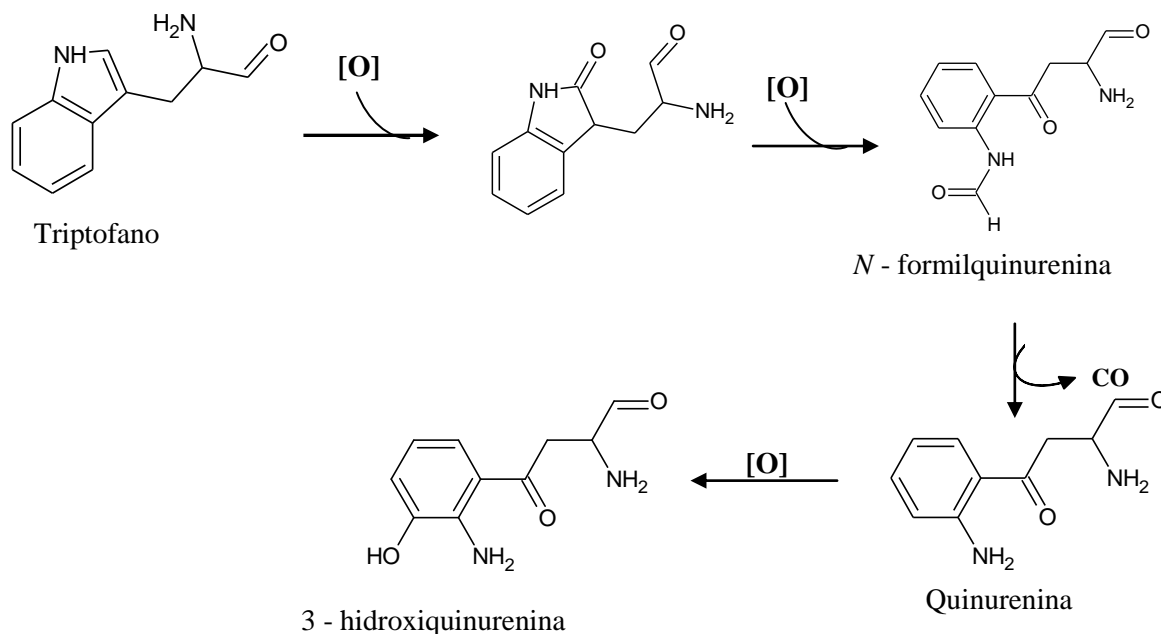
Segundo este mecanismo de reacção, o primeiro passo envolve a reacção de uma molécula de MDA e uma molécula de acetaldeído com um grupo amina de uma proteína para formar o aducto FAAB. O segundo passo envolve a reacção do MDA com outro grupo amina para formar uma base de Schiff (MDA - enamina). A reacção destes dois intermediários resulta na formação do aducto MDHDC. (Tuma, Kearley et al. 2001)

O Triptofano é um dos resíduos de aminoácidos mais susceptível de sofrer oxidação. Vários produtos de oxidação do Triptofano incluindo hidroxitriptofano, *N*-formilquinurenina, quinurenina e 3-hidroxiquinurenina têm vindo a ser identificados pela sua absorvância característica e pelo espectro de fluorescência. (Finley, Dillon et al. 1998) *Armstrong e Swallow* (Armstrong and Swallow 1969) foram os primeiros autores a propor um mecanismo para a formação dos produtos de oxidação do Triptofano. Mais tarde,

outros autores como *Winchester e Lynn* (Winchester and Lynn 1970), *Maskos et al.* (Maskos, Rush et al. 1992) e *Kikugawa et al.* (Kikugawa, Kato et al. 1994) também o confirmaram. O esquema 7 e 8 a seguir representados mostram a reacção de formação da quinurenina e da 3 – hidroxiquinurenina, respectivamente, resultantes da oxidação do triptofano.

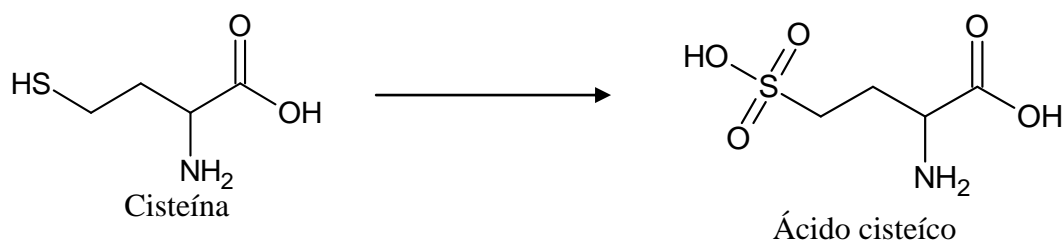


**Esquema 7:** Reacção de formação da Quinurenina a partir da oxidação do Triptofano. (adaptado de (Taylor, Fahy et al. 2003))



**Esquema 8:** Reacção de formação da 3 - hidroxiquinurenina a partir da oxidação do Tryptofano. (adaptado de (Stadtman and Levine 2003))

A oxidação da Cisteína foi descoberta por *Swallow* em 1960. (Swallow 1960) Em 1987, também *Garrison* (Garrison 1987) observou o mecanismo de oxidação da Cisteína. O esquema 9 a seguir representado mostra a oxidação da Cisteína a ácido cisteico.

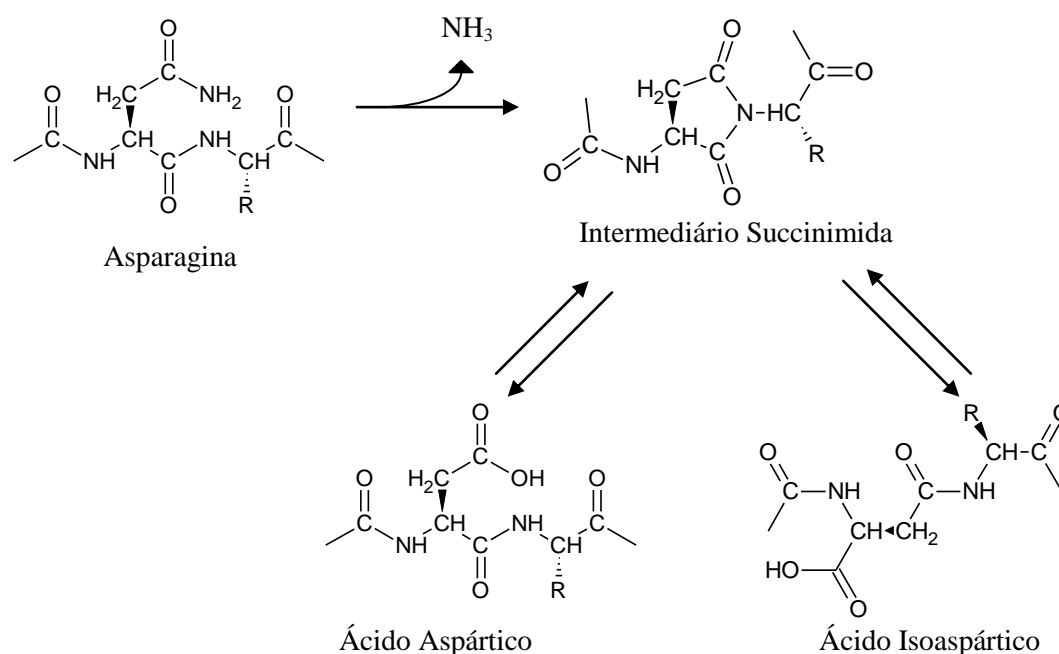


**Esquema 9:** Reacção de formação do ácido cisteico a partir da oxidação da Cisteína. (adaptado de (Barelli 2008))

A modificação pós-translacional de proteínas (ex: acetilação, fosforilação, metilação e glicosilação) pode afectar a carga e a hidrofobicidade de uma proteína ou de regiões distintas de uma proteína, causando alterações na estrutura ou na função da proteína. (Lindner and Helliger 2001)



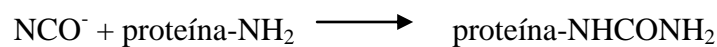
A deaminação dos resíduos de asparagina e de glutamina a aspartato e glutamato, respectivamente, é um processo espontâneo não enzimático que ocorre sob determinadas condições fisiológicas. Em 1991, *Tyler-Cross* e *Schirch* realizaram estudos relacionados com a deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina. (Tyler-Cross and Schirch 1991) A deaminação da asparagina, que ocorre mais frequentemente do que a deaminação da glutamina, é um mecanismo bastante complexo e ocorre tanto *in vitro* (ex: durante o isolamento e armazenamento de proteínas) como *in vivo* durante o desenvolvimento ou envelhecimento das células. A deaminação é uma reacção hidrolítica que resulta não só da introdução de cargas negativas mas também numa alteração da estrutura primária da proteína. Este mecanismo pode afectar a estrutura secundária e terciária das proteínas ou péptidos. A deaminação da glutamina e da asparagina depende de vários parâmetros, entre os quais a temperatura, valor do pH e organização da estrutura da proteína. A deaminação de proteínas pode ter algumas consequências biológicas. Por um lado, alterações na estrutura e na carga das proteínas pode afectar a sua actividade biológica. Por outro lado, a deaminação de proteínas é discutida como um temporizador molecular na determinação do tempo de vida das proteínas. (Robinson and Robinson 1991; Lindner and Helliger 2001) O esquema 10 a seguir representado mostra a reacção de deaminação da asparagina.



**Esquema 10:** Reacção de deaminação da asparagina. (adaptado de (Robinson 2004))

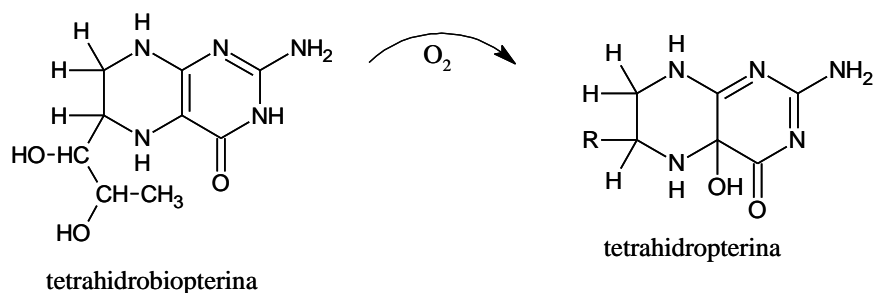
Os resíduos de asparagina sofrem deaminação via intermediário succinimida com libertação de  $\text{NH}_3$ . A clivagem hidrolítica deste intermediário origina ácido aspártico e ácido isoaspártico. Esta reacção de clivagem hidrolítica é reversível. (Lindner and Helliger 2001)

Em 1965, Stark (Stark 1965) estudou a reacção do isocianato com grupos amina das proteínas para formar produtos carbamilados, como se pode observar na reacção a seguir esquematizada.

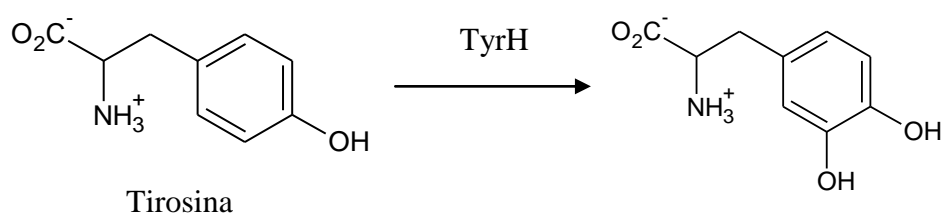


A reacção do isocianato com resíduos de lisina pode ser responsável pela elevada incidência de cataratas, uma doença comum que é acompanhada por níveis elevados de isocianato. (Qin, Smith et al. 1992)

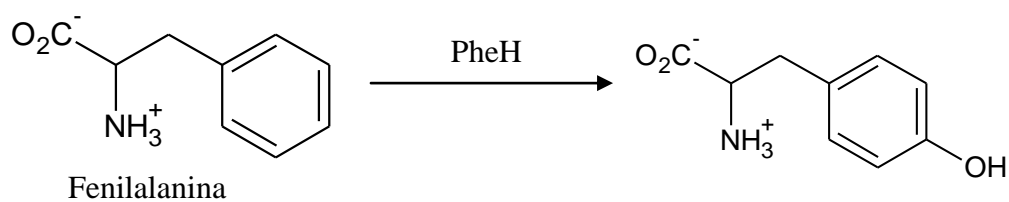
A fenilalanina hidrolase (PheH), a tirosina hidrolase (TyrH), e a triptofano hidrolase (TrpH) constituem a família das hidrolases dependentes das tetrahydropterinas de aminoácidos aromáticos. Os esquemas 11, 12, 13 e 14 ilustram a reacção geral que estas enzimas catalisam, a hidroxilação das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos utilizando a tetrahydropterina como fonte dos dois electrões que são necessários para reduzir o outro átomo de oxigénio. (Fitzpatrick 2003)



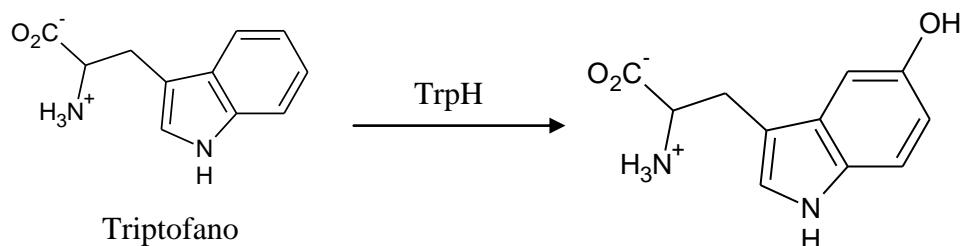
**Esquema 11:** Reacção de formação da tetrahydropterina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003))



**Esquema 12:** Reacção de hidroxilação da Tirosina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003))



**Esquema 13:** Reacção de hidroxilação da Fenilalanina. (adaptado de (Fitzpatrick 2003))

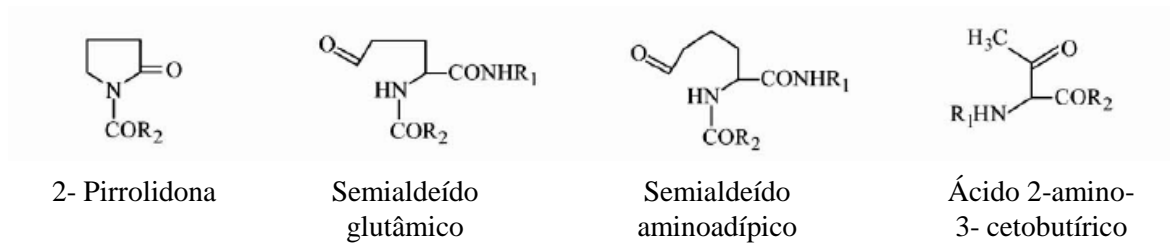


**Esquema 14:** Reacção de hidroxilação do Triptofano. (adaptado de (Fitzpatrick 2003))

A PheH é uma enzima do fígado que catalisa o excesso de fenilalanina. A TyrH é encontrada no sistema nervoso central, onde desempenha o papel de catalisar o primeiro passo da biossíntese das catecolaminas, a formação da dihidroxifenilalanina (DOPA) a partir da tirosina. TrpH está presente no cérebro onde catalisa o primeiro passo da biossíntese da serotonina e a hidroxilação do triptofano a 5-hidroxitriptofano. (Daubner, Hillas et al. 1997; Moran, Daubner et al. 1998)

#### 4 Grupos carbonilo em proteínas oxidadas

Os grupos carbonilo (CO) (aldeídos e cetonas) são produzidos nas cadeias laterais das proteínas quando estas sofrem oxidação, como pode ser observado na figura 2.



**Figura 2:** Derivados carbonilo produzidos por oxidação directa das cadeias laterais de aminoácidos (adaptado de (Isabella Dalle-Donne 2003)).

Os grupos carbonilo são quimicamente estáveis, o que é útil tanto para a sua detecção como para o seu armazenamento. Os derivados carbonilo das proteínas podem também ser formados por clivagem oxidativa das proteínas, tanto por  $\alpha$ -amidação ou por oxidação das cadeias laterais do ácido glutâmico, levando à formação de um péptido em que o N-terminal é bloqueado por um derivado  $\alpha$ -cetoacilo. (Stadtman 1997)

Vários métodos têm vindo a ser utilizados para identificar se os grupos carbonilo resultam da modificação directa ou indirecta das cadeias laterais dos aminoácidos. (Kim, Sabbagh et al. 1997) No entanto, o conteúdo em grupos carbonilo nas proteínas é, actualmente, o indicador mais comum usado como marcador da oxidação de proteínas. (Beal 2002) A acumulação de grupos carbonilo em proteínas tem vindo a ser observado em diversas doenças humanas incluindo a doença de Alzheimer, diabetes, doença inflamatória intestinal e artitre, entre outras. (Chevion, Berenshtein et al. 2000)

A maioria dos ensaios realizados na determinação de proteínas carboniladas tem a vantagem de não ser necessário a utilização de equipamentos especiais ou caros. (Isabella Dalle-Donne 2003) São vários os ensaios que se encontram disponíveis para a detecção de proteínas carboniladas. Os grupos carbonilo nas proteínas podem ser detectados por marcação destes com borohidreto de sódio tetrahidratado (Levine, Garland et al. 1990), quer em solução (Lenz, Costabel et al. 1989) ou antes da electroforese gel. (Yan and Sohal

1998) O hidrogénio radioactivo pode ser detectado por métodos padrão. Este método é altamente sensível e específico quando é aplicado a amostras de proteínas purificadas, mas possui ruídos de fundo elevados e uma pobre especificidade (o borohidreto de sódio tetra hidratado também reage com bases de Schiff) o que pode complicar a sua aplicação em tecidos não fraccionados. (Isabella Dalle-Donne 2003)

Ensaio altamente sensíveis para a detecção de grupos carbonilo nas proteínas envolvem a derivatização do grupo carbonilo com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que leva à formação de um produto estável, a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP). *Levine et al* (Levine, Garland et al. 1990) foram os pioneiros da medição das proteínas carboniladas seguindo a sua reacção covalente com DNPH. Este método tem sido o mais utilizado na medição de proteínas oxidadas em várias doenças humanas. O grupo DNP é estável e pode ser detectado de várias formas. Este grupo absorve luz ultravioleta de tal modo que o conteúdo total de carbonilos de uma proteína ou de uma mistura de proteínas pode ser quantificado por um ensaio espectrofotométrico (Levine, Garland et al. 1990), que pode ser acoplado ao fraccionamento da proteína por HPLC (cromatografia líquida de alta pressão) para dar uma melhor sensibilidade e especificidade do que a medição do conteúdo total de carbonilos numa mistura de proteínas. (Levine, Williams et al. 1994)

Mais trabalho tem de ser feito para identificar a natureza molecular dos grupos carbonilo, que é, que resíduos de aminoácidos têm sido danificados e em que proteínas nos tecidos humanos e fluidos corporais. Nos últimos anos, a identificação de proteínas carboniladas têm vindo a ser facilitada pela disponibilidade de anticorpos específicos anti-DNP que permitam a sua detecção por imunoblotting. (Keller, Halmes et al. 1993) Ensaio por imunoblotting que se baseiam no uso de anticorpos anti-DNP têm vindo a ser desenvolvidos numa tentativa de identificar proteínas danificadas oxidativamente em tecidos humanos e fluidos corporais. (Robinson, Keshavarzian et al. 1999) O conteúdo em grupos carbonilo em proteínas individuais é avaliado por electroforese gel (SDS) a 1D ou 2D seguido por *Western Blot*. Estes dois métodos têm maior sensibilidade e especificidade, mas são apenas semi-quantitativos. (Buss, Chan et al. 1997)

## 5 Danos oxidativos nas proteínas no envelhecimento e na doença

São vários os tipos de danos oxidativos que se acumulam durante o envelhecimento. As modificações oxidativas das proteínas desempenham um papel fundamental causando perdas associadas à senescência nas funções fisiológicas porque as proteínas oxidadas perdem muitas vezes a sua função catalítica e sofrem degradação selectiva. (Stadtman and Berlett 1997) Os danos oxidativos de uma determinada proteína, especialmente quando ocorrem no local activo, podem induzir a perda progressiva de uma função bioquímica particular. (Sohal 2002) Estudos pioneiros realizados por *Stadtman*, *Levine* e seus colaboradores, têm documentado a importância dos danos oxidativos das proteínas no processo de envelhecimento e no estudo das causas de determinadas condições patológicas. (Stadtman and Berlett 1997) Vários tipos de modificações das proteínas induzidas por ROS têm vindo a ser demonstradas (Stadtman and Levine 2000), incluindo a perda de grupos sulfidrilo (-SH), formação de carbonilos, ligações dissulfito, metionina sulfóxido, ligações ditirosina, nitrotirosina, e glicoxidação e aductos resultantes da peroxidação lipídica, entre outros.

A perda de grupos -SH das proteínas pode ser induzido por um vasto leque de ROS e é uma das respostas mais imediatas no aumento dos níveis de stress oxidativo. As consequências funcionais da perda de grupos -SH inclui inactivação catalítica, diminuição da capacidade antioxidante, e perda de certas funções específicas, como a ligação a metais pesados, entre outros. (Shacter 2000)

A formação de ligações ditirosina é outra das modificações oxidativas das proteínas que aparentemente surge da reacção entre dois radicais tirosil, formados por peroxidases e outro grupo heme da proteína. As ligações ditirosina das proteínas aumentam com a idade no músculo-esquelético e no coração de ratos, mas não no fígado ou no cérebro. A restrição calórica atenua estes aumentos. (Leeuwenburgh, Wagner et al. 1997)

A adição de aductos contendo grupos carbonilo nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, como a Lisina, Arginina, Prolina, e Treonina, é provavelmente a modificação pós-translacional da proteína que melhor caracteriza o envelhecimento proteico. (Stadtman 2006) A carbonilação pode ser causada por uma grande variedade de ROS; contudo, a oxidação catalisada por metais num local específico, envolvendo a formação de um radical

hidroxilo/ferril por reacção de Fenton com cisão do  $H_2O_2$ , parece ser o mecanismo *in vivo* mais plausível. (Stadtman and Oliver 1991) Uma série de estudos realizados por Stadtman e os seus colaboradores têm demonstrado que quantidades de proteínas carboniladas aumentam com a idade em diversos tecidos de mamíferos. (Shacter 2000; Stadtman 2006) A relação entre proteínas carboniladas e a taxa de envelhecimento ou a esperança de vida dos animais tem sido demonstrada numa série de órgãos e espécies. O nível de proteínas carboniladas em culturas de fibroblastos humanos aumenta exponencialmente com a idade do dador. (Sohal 2002)

As variações na taxa de proteínas modificadas oxidativamente *in vivo* correspondem a diferenças nas taxas de formação de oxidantes, defesas antioxidantes, reparação e capacidade degradativa, ou susceptibilidade a modificações oxidativas. (Yan and Sohal 1998) A diminuição na capacidade de degradar proteínas carboniladas está relacionada com o aumento na quantidade de proteínas carboniladas devido à idade, em alguns tecidos. (Stadtman and Levine 2000)

O aumento da concentração intracelular de proteínas oxidadas em função da idade tem vindo a ser observado em vários estudos. O aumento de proteínas carboniladas ocorre em hepatócitos de rato, *Drosophila*, cérebro e rim de ratinhos. (Beal 2002) No ser humano, as proteínas carboniladas aumentam com a idade no cérebro, músculo e olhos. (Smith, Carney et al. 1991) A acumulação de proteínas oxidadas também está relacionada com determinadas doenças como a doença de Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre outras. A doença de Alzheimer é a doença degenerativa mais comum. Clinicamente, leva à perda progressiva de memória e causa demência. Na doença de Alzheimer há diversas evidências relacionadas com danos oxidativos. Além disso, existem evidências que indicam que a progressão da doença pode ser atenuada pela administração de vitamina E. (Sano, Ernesto et al. 1997) Também existem evidências epidemiológicas de que pacientes que ingerem vitaminas antioxidantes e compostos anti-inflamatórios têm uma menor incidência da doença de Alzheimer. Diversos estudos bioquímicos mostraram o aumento da concentração de proteínas carboniladas em pacientes com a doença de Alzheimer. (Hensley, Hall et al. 1995) As proteínas carboniladas aumentam significativamente no hipocampo e no lóbulo parietal inferior permanecendo inalteradas no cerebelo. A doença de Parkinson é a segunda doença degenerativa mais comum causando perda progressiva do movimento. A presença de inclusões citoplásmicas eosinofílicas na massa cinzenta do

cérebro, conhecidas como corpos de Lewy, é uma marca histopatológica característica desta doença. Na doença de Parkinson, a concentração de proteínas carboniladas aumenta em quase todas as regiões do cérebro que já foram examinadas incluindo a massa cinzenta do cérebro, no córtex frontal e gânglios basais. (Alam, Daniel et al. 1997) Nos pacientes com demência, em que se encontram presentes corpos de Lewy, o conteúdo em proteínas carboniladas aumenta no córtex cerebral, e há um aumento dos danos oxidativos no ADN. (Lyras, Perry et al. 1998) A ALS (esclerose amiotrófica lateral) é uma doença neurodegenerativa progressiva rápida que causa fraqueza motora progressiva e morte. Neuropatologicamente há a perda de neurónios motores tanto no córtex motor como na medula espinhal. Observou-se um aumento de proteínas carboniladas no córtex frontal e no córtex motor. (Ferrante, Browne et al. 1997) Estudos realizados mostraram que proteínas carboniladas aumentam cerca de 119% no tecido da medula espinhal de doentes com ALS. (Shaw, Ince et al. 1995) Contudo, não se observaram alterações nos níveis de proteínas carboniladas no córtex motor de pacientes com ALS. (Lyras, Evans et al. 1996) A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa autosómica hereditária que causa demência e distúrbios no movimento. Neuropatologicamente, os danos predominam nos gânglios basais. Na doença de Huntington a evidência de danos oxidativos é muito mais limitada. Num estudo realizado não se observou o aumento de proteínas carboniladas ou danos oxidativos nos lípidos ou no ADN. (Alam, Halliwell et al. 2000) Contudo, em estudos realizados num modelo de ratos transgénicos observou-se o aumento de danos oxidativos no ADN e em tecidos pós-morte de pacientes com a doença de Huntington. (Bogdanov, Andreassen et al. 2001)

Há evidências que implicam danos oxidativos nas proteínas tanto no processo de envelhecimento normal como nas doenças neurodegenerativas. Os danos oxidativos são selectivos na inactivação de determinadas proteínas. Isto é verdade tanto para proteínas carboniladas como para proteínas nitrosiladas. (Beal 2002) Em conclusão, parece que a combinação de diversos factores determina o estado estacionário das quantidades dos produtos de oxidação de proteínas. Contudo, as taxas de formação de oxidantes podem ser o factor mais dominante, uma vez que as variações nas taxas de formação de ROS estão mais associadas com diferenças em danos oxidativos. (Barja and Herrero 2000)





### **III. Espectrometria de Massa**

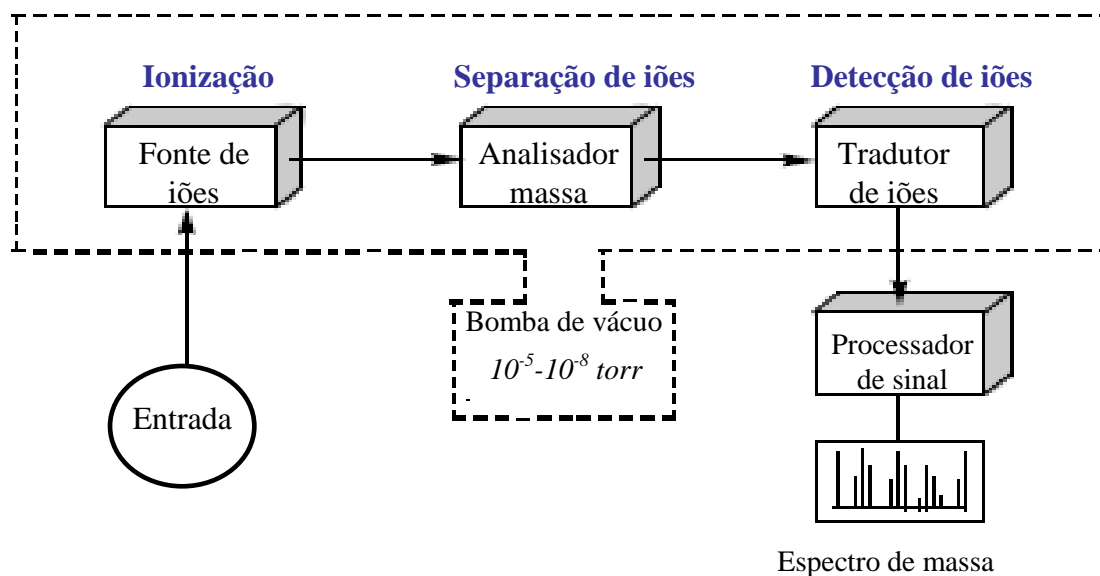


## 1 Introdução

Na década de noventa do século passado, a espectrometria de massa surgiu como uma técnica analítica importante a nível da investigação biológica e a nível molecular. (Jonsson 2001) A espectrometria de massa tem certamente acrescentado uma nova dimensão à precisão na determinação dos pesos moleculares, na identificação de novas biomoléculas, no esclarecimento de novas vias metabólicas, entre outras. (Christian Schöneich 2006)

O princípio da espectrometria de massa baseia-se na medição da razão massa-carga ( $m/z$ ) dos iões em fase gasosa. A espectrometria de massa é um método analítico destrutivo uma vez que a amostra é consumida. (Kleiner 2005) No início do século XX, *J.J. Thomson* desenvolveu a técnica quando obteve um espectro de massa de iões gasosos. (Thomson 1913) O seu trabalho foi revisto recentemente por *I. W. Griffiths*. (Griffiths 1997) A espectrometria de massa é uma técnica que desempenha funções chave em diversas áreas como a bioquímica, biotecnologia, farmacologia, microbiologia e proteómica/genómica funcional. (Pandey and Mann 2000) Este desenvolvimento é uma consequência directa da introdução de técnicas de ionização suaves como a ionização electrospray e o MALDI (matriz assistida por ionização/desorção laser). Estas técnicas de ionização tornaram possível a ionização de biomoléculas termicamente lábeis e a sua transferência para a fase gasosa sem dissociação. Inclusivamente, complexos não covalentes de biomoléculas com pesos moleculares da ordem dos megadaltons (MDa) podem ser analisados. (Robinson 1999) Desenvolvimentos nos métodos de ionização têm levado os produtores de MS a construir instrumentos com um alcance dinâmico elevado, resolução elevada e precisão de massa, de menores dimensões e de baixo custo. (Griffiths, Jonsson et al. 2001) Hoje em dia, o desenvolvimento de instrumentos é tal que se pode obter o registo de um espectro de MS e MS/MS sob o controlo de um software automatizado, e pelo menos na área da química dos péptidos, precursores de iões desconhecidos podem ser identificados por algoritmos computacionais. (Hoffmann 2007) Actualmente, o interesse da utilização da MS nas proteínas mudou para a identificação das modificações pós-translacionais (Tengumnuay, Morris et al. 1998) e também para a área das interacções não covalentes. (Pramanik, Bartner et al. 1998)

Os espectrômetros de massa são constituídos por três componentes básicos: fonte de íons, analisador de massa e detector de íons, como pode ser observado na figura 3.



**Figura 3:** Esquema representativo de um espectrômetro de massa (adaptado de (Lee 2005)).

Na fonte de íons, as moléculas são convertidas em íons na fase gasosa. Depois da conversão dos íons na fase gasosa, estes são separados no analisador de massa com base na sua razão massa-carga ( $m/z$ ), e posteriormente detectados no detector. (Yates 2004)

## 2 Técnicas de ionização

Na fonte de iões, as amostras são ionizadas antes de serem analisadas no espectrómetro de massa. Uma das considerações mais importantes a ter em conta é a energia interna que é transferida durante o processo de ionização e as propriedades físico-químicas do analito que pode ser ionizado. Algumas técnicas de ionização são muito energéticas e causam uma fragmentação extensa. (Hoffmann 2007)

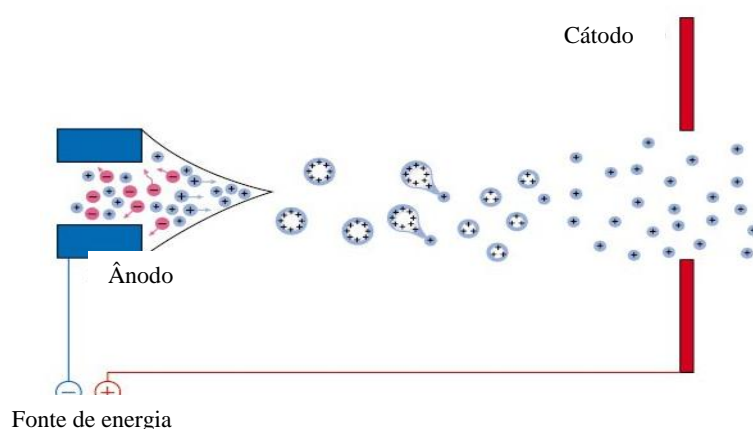
Desde cedo que técnicas como impacto electrónico (IE), onde os iões são produzidos por um feixe de electrões que atinge directamente as moléculas do analito, a baixa pressão de vapor (H. Deutsch 2000); e ionização química (IQ), em que as moléculas de gás do reagente são ionizadas por um feixe de electrões e depois os iões do gás reagente transferem carga para o analito (Munson 2000); foram reconhecidas como eficientes na ionização de pequenas moléculas de voláteis termicamente estáveis. Recentemente, técnicas de ionização suaves, como MALDI e electrospray, tornaram-se métodos revolucionários que têm feito da espectrometria de massa uma das ferramentas mais importantes na análise de biomoléculas grandes, como péptidos e proteínas. (Jonsson 2001)

### 2.1 Ionização electrospray (ESI)

O sucesso do ESI começou quando *Fenn et al.* (Fenn, Mann et al. 1989) mostrou que iões duplamente carregados eram obtidos a partir de proteínas, permitindo a determinação do seu peso molecular. No início, o ESI era considerado uma fonte de ionização dedicada à análise de proteínas. Mais tarde, o seu uso foi estendido não só a outros polímeros e biopolímeros mas também à análise de pequenas moléculas polares. (Mora, Van Berkel et al. 2000)

A ionização electrospray (ESI) é produzida pela aplicação de um campo eléctrico forte, à pressão atmosférica, fazendo passar um líquido por um tubo capilar com fluxo reduzido (normalmente 1 a 10  $\mu\text{l min}^{-1}$ ). O campo eléctrico é obtido através da aplicação de uma diferença de potencial de 1-6kV entre o capilar e o contra-eléctrodo, separados por 0,3-2 cm, produzindo campos eléctricos na ordem dos  $10^6 \text{ V m}^{-1}$ . Este campo induz uma acumulação de carga à superfície do líquido localizado no final do capilar, que irão quebrar

para formar gotas altamente carregadas. (Ekman 2009) Um gás é injectado coaxialmente com uma taxa de fluxo baixa permitindo a dispersão das gotas. As gotas passam depois através de uma nuvem de gás inerte, ou através de um capilar aquecido para remover as últimas moléculas de solvente. (Somogyi 2008; Ekman 2009) Durante a formação da gota na ponta do capilar à medida que se aumenta a voltagem, verifica-se que a baixas voltagens as gotas que se formam parecem esféricas, mas à medida que se aumenta a voltagem as gotas vão alongando sob a pressão das cargas acumuladas. Quando a tensão de superfície é quebrada, a forma das gotas altera-se para a forma de um cone de Taylor. (Jonsson 2001) A figura 4 ilustra este processo.



**Figura 4:** Representação esquemática do processo de ionização electrospray.

*Gomez e Tang* (Gomez 1994) foram capazes de obter fotografias das gotas formadas e a sua divisão na fonte de ionização electrospray. O solvente contido nas gotas evapora, o que faz com que estas diminuam de tamanho e a sua carga por unidade de volume aumente. Sobre a influência de um campo eléctrico forte, ocorre a deformação das gotas. Estas pequenas gotas altamente carregadas irão continuar até perder o solvente, e quando o campo eléctrico na sua superfície for grande o suficiente ocorre a desorção dos iões. (Chen 2008)

A preparação da amostra necessita apenas da dissolução da amostra numa mistura de água e solventes orgânicos, sendo o metanol, o isopropanol ou o acetonitrilo os mais comuns. Por vezes pode ser adicionado ácido fórmico ou ácido acético para ajudar na protonação das moléculas do analito no modo de ionização positivo. No modo de ionização

negativo, utiliza-se, frequentemente, uma solução de amónia ou aminas voláteis para ajudar na desprotonação das moléculas do analito. (Hoffmann 2007; Ekman 2009)

A ionização por electrospray é um método de ionização muito suave. Muito poucos iões fragmento são observados, sendo portanto adequado para a análise de biomoléculas. As vantagens da ionização por electrospray incluem: elevada reprodutibilidade, não estando envolvido nenhum processo de cristalização; elevada flexibilidade de acoplamento a diferentes tipos de espectrómetros de massa. (Chatman, Hollenbeck et al. 1999)

## **2.2 MALDI (ionização/desorção por matriz assistida por laser)**

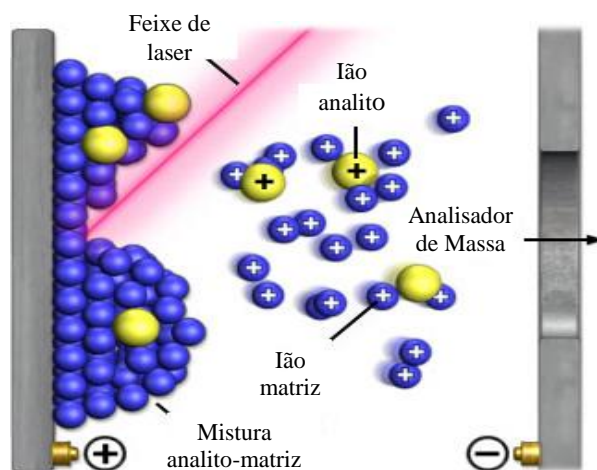
MALDI foi introduzido em 1988 principalmente por *Tanaka* (Tanaka 1988), *Karas* e *Hillenkamp*. (Karas and Hillenkamp 1988) Ela tornou-se uma fonte ampla e poderosa na produção de iões na fase gasosa a partir de compostos não voláteis e termicamente lábeis, tais como proteínas, oligonucleótidos, polímeros sintéticos e compostos inorgânicos. O uso de uma matriz em MALDI é um factor crucial para este método de ionização. O método é caracterizado pela fácil preparação da amostra e tem uma grande tolerância à contaminação por sais, tampões e detergentes. (Stump 2002)

MALDI ocorre em dois passos. No primeiro passo, o composto a ser analisado é dissolvido num solvente contendo em solução pequenas moléculas orgânicas, chamadas de matriz. Estas moléculas devem ter uma forte absorção ao comprimento de onda do laser. Esta mistura é seca antes da análise e qualquer solvente líquido usado na preparação da solução é removido. O resultado é o depósito de uma solução sólida. O segundo passo ocorre sob condições de vácuo no interior da fonte do espectrómetro de massa. (Knochenmuss 2002) A irradiação por laser induz o rápido aquecimento dos cristais pela acumulação de grandes quantidades de energia na fase condensada através da excitação das moléculas da matriz. (Dreisewerd 2003)

As reacções de ionização podem ocorrer sob condições de vácuo a qualquer momento durante este processo mas a origem dos iões produzidos por MALDI ainda não é plenamente entendido. (Knochenmuss and Zenobi 2003) O mecanismo de formação de iões mais aceite envolve a transferência de protões na fase gasosa após a desorção. Os iões na fase gasosa são então acelerados por um campo electrostático em direcção ao



analisador. A figura 5 a seguir representada mostra o processo de ionização MALDI. (Knochenmuss 2003)



**Figura 5:** Esquema representativo do processo de ionização MALDI. (adaptado de [www.magnet.fsu.edu](http://www.magnet.fsu.edu))

A técnica de ionização MALDI é mais sensível do que as outras técnicas de ionização por laser. O número de moléculas da matriz excede largamente as do analito, separando assim as moléculas do analito e prevenindo a formação de clusters que possam inibir o aparecimento de íons moleculares. A matriz também minimiza danos na amostra a partir do feixe de laser por absorção de energia incidente e aumenta a energia de transferência a partir do feixe de laser para o analito. (Spengler and Cotter 1990) A escolha da matriz e a otimização do protocolo de preparação da amostra são os passos mais importantes na análise porque a qualidade dos resultados depende da boa preparação da amostra. A escolha da matriz para MALDI é baseada no comprimento de onda do laser usado. As matrizes para MALDI devem satisfazer uma série de requisitos em simultâneo. Devem possuir uma forte absorvância ao comprimento de onda do laser, estabilidade em vácuo, capacidade de promover a ionização do analito, solubilidade em solventes compatíveis com o analito e falta de reatividade química. A matriz mais usada para a análise de péptidos mais pequenos é o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Para proteínas e péptidos maiores a matriz mais usada é o ácido sinapínico. (Talrose, Person et al. 1999)

A técnica de ionização por MALDI é relativamente menos sensível à contaminação por sais, tampões e detergentes em comparação com outras técnicas de ionização. O analito

deve ser incorporado na matriz. Este processo pode geralmente servir para separar, em fase sólida, o analito de possíveis contaminantes. Contudo, concentrações elevadas de tampões e de outros contaminantes encontrados nas soluções do analito podem interferir com o processo de ionização e desorção da amostra. A purificação da amostra para remover contaminantes permite melhoramentos na qualidade dos espectros de massa. (Vorm and Roepstorff 1994)

### **3 Analisadores de massa**

Os iões produzidos em fase gasosa são separados de acordo com as suas massas. As propriedades físicas dos iões que são medidas por um analisador de massa são a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). (Jonsson 2001)

Assim como há uma grande variedade de fontes de ionização, vários tipos de analisadores de massa têm vindo a ser desenvolvidos. A separação dos iões de acordo com a sua razão massa/carga é baseada em diferentes princípios. Todos os analisadores de massa utilizam campos eléctricos estáticos ou dinâmicos e magnéticos que podem ser utilizados sozinhos ou podem ser combinados. A maior parte das diferenças básicas entre os diferentes tipos de analisadores de massa reside na forma como esses campos são utilizados para alcançar a separação. (Hoffmann 2007)

Existem vários tipos de analisadores de massa incluindo os analisadores quadrupolares (Q), analisadores trapa de iões (IT), analisadores Orbitrap, analisadores tempo-de-vôo (TOF), analisadores magnéticos e electromagnéticos e analisadores de Ressonância de Iões Ciclotrão com Transformada de Fourier.

O analisador Orbitrap funciona com base no princípio em que uma trapa de iões em orbita em torno de um eléctrodo central axial por acção de um campo puramente electrostático. O analisador Orbitrap é constituído por um eléctrodo central axial e por um eléctrodo exterior coaxial. (Makarov 2000) Entre o eléctrodo exterior e interior, a voltagem DC é aplicada originando um potencial logarítmico. Os iões são injectados perpendicularmente ao eléctrodo central e têm uma velocidade adequada o que faz com que os iões circulem em órbita em redor do eléctrodo central (Hu, Noll et al. 2005). Nos analisadores magnéticos e electromagnéticos os iões deixam a fonte e são acelerados a grande velocidade. O sector magnético actua como uma lente onde os iões com a mesma

razão  $m/z$  mas com velocidades significativamente diferentes não são focados no mesmo ponto. Por isso, a resolução é limitada pela velocidade inicial dos iões. Para obter uma melhor resolução é necessário que o sector eléctrico foque os iões de acordo com a sua energia cinética. O sector eléctrico aplica uma força perpendicular à direcção do feixe de iões. (Ekman 2009)

Nos analisadores de Ressonância de Iões Ciclotrão com Transformada de Fourier os iões podem ser capturados numa célula semelhante a uma trapa de iões. Os iões são sujeitos a um campo magnético e iniciam o seu movimento ciclotrão. Isto aumenta a eficiência da trapa e também arrefece os iões forçando-os a movimentarem-se para o centro da célula. (Marshall 2000) Para detectar os iões armadilhados na célula ICR, aplica-se uma voltagem de frequência de ressonância aos dois eléctrodos de excitação. Os iões com a mesma frequência de ressonância são excitados para um maior raio orbital. Quando a excitação é elevada o suficiente para que os iões passem perto das placas de detecção, uma pequena corrente é induzida na placa cada vez que um ião passa. Desde que os iões tenham frequências de ressonância ciclotrão de iões diferentes dependendo da sua razão  $m/z$ , cada um origina uma frequência que vai corresponder a uma certa razão  $m/z$ . (Ekman 2009)

O analisador quadrupolar (Q) é um dispositivo que utiliza trajectórias estáveis em campos eléctricos oscilantes para separar os iões de acordo com a sua razão  $m/z$ . (Jonsson 2001) Os analisadores quadrupolares (Q) são constituídos por quatro barras paralelas organizadas numa estrutura quadrupolar. As barras opostas têm a mesma voltagem que é diferente (em sinal) do outro par de barras. As voltagens usadas, que filtram selectivamente os iões de interesse de acordo com a sua razão  $m/z$ , apenas os iões seleccionados podem passar através do analisador e chegar ao detector, enquanto os outros colidem com as barras e perdem-se pelo caminho. (Ann Westman-Brinkmalm 2008) Os analisadores quadrupolares são normalmente usados com fontes ESI, por causa do fluxo contínuo. Estes analisadores têm uma boa reprodutibilidade mas uma baixa resolução e exactidão da massa. (Somogyi 2008)

A principal característica dos analisadores Trapa de Iões (IT) é a sua capacidade para capturar os iões num campo eléctrico tridimensional. (Lim and Elenitoba-Johnson 2004) Nos analisadores Trapa de Iões, os iões são primeiro capturados por um certo período de tempo e são depois sujeitos a análise por espectrometria de massa. As trapas de iões são

robustas, sensíveis e relativamente baratas. Uma desvantagem das trapas de iões é a sua baixa precisão de massa devido em parte ao número limitado de iões que podem ficar acumulados no centro da trapa. (Aebersold and Mann 2003)

O conceito de analisadores de massa tempo – de – vô foi descrito por *Stephens* em 1946. (Stephens 1946) Os analisadores Tempo – de – vô separam os iões através da aplicação de um campo eléctrico que acelera os iões, com uma energia cinética específica. Os iões que saem da fonte são acelerados em direcção ao tubo de vô através de uma diferença de potencial entre o eléctrodo e a grelha de extracção. Como todos os iões adquirem a mesma energia cinética, os iões caracterizados pela distribuição das suas massas apresentam também uma distribuição das suas velocidades. (Ekman 2009) Quando os iões abandonam a região de aceleração, entram numa região livre de campo onde os iões são separados de acordo com as suas velocidades, antes de chegar ao detector posicionando-se na outra extremidade do tubo de vô. A razão  $m/z$  é determinada pela medição do tempo que os iões demoram a mover-se através da região livre de campo entre a fonte e o detector. (Jonsson 2001) Os analisadores TOF são geralmente acoplados a fontes de ionização MALDI, mas também podem ser acoplados com fontes de ionização ESI. A resolução do analisador de massa TOF é limitada pela velocidade inicial (energia cinética) e pela propagação espacial dos iões. A propagação espacial pode ser compensada por uma técnica de extracção (time-lag focusing) e a velocidade de propagação é reduzida através da utilização de um reflectrão. (Somogyi 2008) O modo reflectrão consiste num campo electrostático em que os iões devem penetrar e mudar a sua trajectória. No modo reflectrão, os iões com a mesma massa mas com velocidades diferentes têm de viajar distâncias diferentes para que os iões possam chegar ao detector ao mesmo tempo. Isto melhora significativamente a resolução e a precisão da massa do analisador TOF, o que de outra maneira seria impossível. Os analisadores TOF possuem uma boa resolução, uma excelente sensibilidade e uma gama de massa elevada. (Ekman 2009)

#### 4 Instrumentos Híbridos

Alguns espectrómetros de massa combinam vários tipos de analisadores. Os mais comuns incluem dois ou mais dos seguintes analisadores: quadrupolos (Q), trapas de iões (IT), tempo – de – voo (TOF), ou orbitrap. Estes são chamados de instrumentos híbridos. (Hoffmann 2007) O objectivo de um instrumento híbrido é combinar os pontos fortes de um analisador, evitando a combinação dos seus pontos fracos.

O primeiro instrumento híbrido resultou da combinação de um analisador electromagnético com um quadrupolo. (Glish 1986) Geralmente este tipo de instrumentos inclui entre os dois analisadores uma célula de colisão quadrupolar apenas com frequência de ressonância e corresponde a uma configuração do tipo BEqQ ou EBqQ. Os iões podem ser analisados com uma resolução elevada pelo instrumento magnético e depois com baixa resolução pelo analisador quadrupolar. Estão disponíveis duas opções para os dois analisadores, que respeitam os requisitos de cada tipo de analisador relativamente à energia cinética. A energia cinética encontra-se na gama dos kilovolts para o instrumento electromagnético e 10 V (volts) para os quadrupólos. A primeira opção consiste na desaceleração dos iões que saem do analisador electromagnético, o que é fácil pois nesta fase todos os iões têm a mesma energia cinética. Os iões com baixa energia são fragmentados através de colisões no primeiro quadrupolo, q e são depois analisados no segundo quadrupolo, Q. A segunda opção consiste em colisões consecutivas de elevada energia localizadas na parte final do analisador magnético, antes de entrar para o primeiro quadrupolo. (Loo and Muenster 1999) Já foram descritos instrumentos híbridos semelhantes em que o analisador de massa quadrupolar é substituído por uma trapa de iões. Tem de se aplicar correcções ao nível da energia cinética semelhantes às correcções referidas anteriormente. Primeiro, pode realizar um espectro de massa com os iões precursores seleccionados com uma resolução elevada. Segundo, os iões precursores podem ser acumulados na trapa de iões por um longo período de tempo, permitindo alcançar uma elevada sensibilidade. (Hoffmann 2007)

Um outro tipo de instrumento híbrido é o analisador trapa de iões acoplado com analisadores TOF. Neste tipo de instrumentos híbridos, a Trapa de iões é usada para acumular os iões e para executar a selecção de iões e activação em experiências MS/MS

antes da análise no analisador de Tempo – de – vôo. Todos os iões acumulados na trapa são depois ejetados no analisador Tempo – de – vôo. Portanto, o analisador Tempo – de – vôo é usado para a análise de massa em vez de métodos de ejeção de iões clássicos que eram usados nas Trapas de iões, nomeadamente ejeção ressonante ou ejeção selectiva de iões a um determinado limite de estabilidade. Em comparação com os instrumentos Tempo – de – vôo, elevada sensibilidade é alcançado através da acumulação de iões na Trapa de iões. (Hoffmann 2007)

Instrumentos híbridos incluindo tempo-de-vôo com aceleração ortogonal também têm vindo a ser desenvolvidos. O primeiro analisador de massa foi acoplado a um analisador Tempo – de – vôo de tal forma que a aceleração de iões ocorre perpendicularmente à trajectória inicial dos iões. (Hoffmann 2007) O analisador Tempo – de – vôo pode ser vantajoso como segunda fase do instrumento porque a sua capacidade de transmitir simultaneamente todos os iões leva a um aumento útil da sensibilidade. Na verdade, o analisador Tempo – de – vôo têm a vantagem de detectar todos os iões simultaneamente com boa precisão, enquanto os analisadores de varrimento detectam os iões sucessivamente ao longo do tempo. Consequentemente, esta combinação tem claras vantagens ao nível da velocidade e da sensibilidade, mesmo quando uma ampla gama de massa é analisada. (Feng, Liu et al. 2008; Ekman 2009) Como já foi mencionado anteriormente, quando os iões fragmentam durante o seu vôo na região livre de campo, com ou sem activação da colisão, o ião precursor e os fragmentos têm a mesma velocidade e chegam ao detector simultaneamente. Se, contudo, os iões são acelerados perpendicularmente à sua trajectória e são empurrados para o analisador de massa Tempo – de – vôo, então os iões com massas diferentes chegam a diferentes tempos e são detectados separadamente de acordo com a sua razão  $m/z$ . (Guilhaus, Selby et al. 2000)

O primeiro instrumento híbrido que tira vantagem da injeção ortogonal combina analisadores electromagnéticos com um instrumento Tempo – de – vôo. Contudo, o tipo de instrumento híbrido mais bem sucedido em que o analisador Tempo – de – vôo têm vindo a ser integrado combina um analisador quadrupolar com um instrumento Tempo – de – vôo numa configuração QTOF. Estes instrumentos são poderosos e robustos com performances únicas. Possuem uma elevada sensibilidade na gama dos attomoles, uma resolução de 20 000 FWHM, uma gama alargada de 20 000  $m/z$ , e uma justa precisão de massa de cerca de 5 a 10ppm. O rápido sucesso deste tipo de instrumentos híbridos é devido à combinação

atractiva da simplicidade do quadrupolo e a elevada performance do analisador Tempo – de – vôo. (Chernushevich, Loboda et al. 2001) Em comparação com o instrumento híbrido TOF/TOF, o intervalo de massa do ião precursor escolhido é reduzido pelas limitações do analisador de massa quadrupolar em cerca de 4000 m/z, embora os iões centrados e a transmissão são muito mais fáceis. Por outro lado, quando comparado com um triplo quadrupolo, o analisador Tempo – de – vôo oferece uma melhor resolução e uma melhor precisão da massa. A sensibilidade do analisador Tempo – de – vôo aumenta se o espectro é medido sobre uma ampla gama de massa devido à capacidade deste analisador de analisar quase todos os iões em conjunto. (Shevchenko, Chernushevich et al. 1997)

## 5 Espectrometria de Massa Tandem

A Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS) permite a caracterização de iões não fragmentados inicialmente, o que não pode ser alcançado apenas por espectrometria de massa. (Feng, Liu et al. 2008) A Espectrometria de Massa Tandem é um método que geralmente envolve pelo menos duas fases na análise da massa, quer seja em conjunto com um processo de dissociação quer seja através de uma reacção química que causa alterações na massa ou na carga do ião. (Hoffmann 2007)

Nas experiências de Espectrometria de Massa Tandem mais comuns, o primeiro analisador é usado para isolar o ião precursor, que sofre então fragmentação espontânea ou por activação (na célula de colisão). Os iões formados são então analisados pelo segundo analisador. A colisão induzida por fragmentação (CID) é o método clássico para a fragmentação. Este tipo de fragmentação é produzida por colisão com um gás neutro (hélio ou argon) e tem a tendência a quebrar as ligações mais fracas. (Hoffmann 2007) O processo de fragmentação pode ser realizado tanto no *espaço* como no *tempo*. No processo de fragmentação no *espaço*, os iões são analisados sequencialmente à medida que viajam através do instrumento. No processo de fragmentação no *tempo*, o ião seleccionado permanece no analisador. Ocorre fragmentação e os iões são ejectados para detecção. O processo de MS/MS realiza-se na mesma região empregando uma sequência temporal. Este tipo de fragmentação permite consecutivamente vários passos de selecção, fragmentação e análise dos iões, tornando-se uma ferramenta valiosa. (Somogyi 2008) Os instrumentos tandem no *espaço* são construídos a partir de vários sectores do mesmo tipo de espectrómetros de massa (ex: triplos-quadrupolos, e TOF/TOF) ou são de design híbrido, em que são acoplados dois tipos diferentes de conceitos de espectrómetros de massa (ex: sector magnético-quadruplo, sector magnético-TOF, quadrupolo-TOF, quadrupolo-LIT, e quadrupolo-FT-ICR). (Ann Westman-Brinkmalm 2008) O princípio *tandem no tempo* é aplicável a dispositivos de trapa de iões como os espectrómetros de massa QIT, LIT e FT-ICR. (Hoffmann 2007)

O espectrómetro de massa TOF/TOF têm sido o tipo de analisador mais eficaz em proteómica. (Yates 2004) O princípio básico destes dois instrumentos é o uso de um pequeno TOF linear como primeiro analisador de massa e um segundo analisador, TOF



reflectrão. Estes dois analisadores TOF são separados por um portão de deflexão de iões e uma célula de colisão. Estes dois espectrómetros também têm em comum o recurso à reaceleração do ião precursor e dos seus fragmentos após a saída da célula de colisão. (Hoffmann 2007) O primeiro analisador de massa TOF é utilizado no processo de selecção de iões e os iões seleccionados são então transferidos para o interior da célula de colisão. A análise dos produtos dos iões ocorre no segundo espectrómetro de massa TOF. Os fragmentos criados possuem uma energia cinética moderada (abaixo de 10 keV). Posteriormente, quando os fragmentos entram no segundo analisador TOF possuem uma maior aceleração (a, pelo menos, 16 keV). (Ekman 2009)

## **IV. Proteómica**

---



## 1 Introdução

O termo proteoma foi usado pela primeira vez em 1995 para descrever o conjunto de proteínas que estão presentes numa célula (Wasinger, Cordwell et al. 1995); imperceptivelmente, o proteoma foi transfigurado numa nova disciplina, proteómica. (Weir 1999) A palavra proteómica tem sido tradicionalmente associada a um grande número de proteínas a partir de um determinado organismo ou linhagem celular. (Pandey and Mann 2000)

A Proteómica remonta ao final dos anos 70, quando investigadores começaram a construir bases de dados de proteínas utilizando a técnica recém-desenvolvida electroforese bidimensional. (O'Farrell 1975) Isto resultou numa ampla catalogação das manchas dos géis bidimensionais para criar bases de dados de todas as proteínas expressas. Contudo, mesmo quando esses géis eram executados com reprodutibilidade entre laboratórios, a determinação da identidade das proteínas foi dificultada devido à falta de sensibilidade e de métodos analíticos rápidos para a caracterização de proteínas. (Anderson and Anderson 1996)

A Proteómica é uma área em grande expansão, que têm como objectivo o estudo sistemático da estrutura das proteínas, função e interacções dinâmicas. (Jensen 2006) O ritmo do desenvolvimento é impelido pela integração de novas técnicas computacionais, métodos analíticos ainda mais sensíveis e avançados, e abordagens genéticas e bioquímicas optimizadas para estudar sistemas biológicos. Como a tecnologia proteómica têm vindo a melhorar e as questões biológicas tornam-se mais complexas, métodos quantitativos e qualitativos avançados para a análise de proteínas, tem vindo a ser desenvolvidos. (Yates, Gilchrist et al. 2005)

Nos anos 90, a espectrometria de massa biológica emergiu como um método analítico poderoso capaz de remover a maioria das limitações associadas à análise de proteínas. Este desenvolvimento, juntamente com a disponibilidade de toda a codificação da sequência humana em bases de dados públicas, marca o início de uma nova era. (Pandey and Mann 2000) A espectrometria de massa é uma ferramenta versátil e indispensável na química da proteína e na Proteómica. (Aebersold and Mann 2003) A espectrometria de massa tandem (MS/MS) permite que os péptidos possam ser

sequenciados e que as modificações pós-translacionais possam ser identificadas e caracterizadas. (Jensen 2006)

Hoje em dia, o termo Proteômica cobre grande parte da análise funcional dos genes ou 'genômica funcional', incluindo estudos de identificação ou localização, em larga escala, de proteínas. (Burley, Almo et al. 1999)

## **2 Princípios e ferramentas para Proteômica**

Desde a conclusão do genoma humano em 2002 e o reconhecimento de que este pode não fornecer todas as respostas para a origem da doença, a atenção voltou-se para a avaliação das alterações que ocorrem em proteínas expressas por um determinado genoma. (Sarah Aldred 2004) Como consequência, a proteômica tem vindo a crescer rapidamente na área da investigação que pode examinar não só a presença ou a ausência de determinadas proteínas mas também as alterações pós-sintéticas. (Anderson and Anderson 1996) Contudo, a avaliação do proteoma de qualquer amostra biológica exige tecnologia e conhecimentos especializados. O método mais comum para avaliar uma amostra pertencente a um determinado proteoma, combina electroforese em gel de poliacrilamida 2-D (2-DE) e espectrometria de massa (MS), embora sejam possíveis análises semelhantes usando cromatografia-MS ou tandem MS (MS/MS). (Person, Monks et al. 2003)

A electroforese em gel de poliacrilamida 2-D (2-DE) compreende focagem isoeléctrica na electroforese a 1 dimensão (1D), onde as proteínas são separadas com base na carga e na electroforese em gel de poliacrilamida (Karpe and Hamsten 1994) na segunda dimensão onde as proteínas são separadas de acordo com a razão tamanho/massa. A combinação destas técnicas resulta no aparecimento das proteínas separadas no gel quando são coradas com prata, ou com Comassie blue. (McDonough, Neverova et al. 2002) 2-DE não é uma técnica nova, e na verdade um grande número de estudos têm usado esta técnica para separar proteínas de interesse. (Emes, Latner et al. 1975)

Devido principalmente ao custo, muitos laboratórios centraram os seus estudos no campo da proteômica através da investigação por 2-DE e MALDI-MS; contudo, a tecnologia proteômica envolve muitas outras técnicas. Um grande número de estudos têm investigado as alterações nas proteínas por MS/MS ou através de marcação isotópica estável. (Zhu, Pan et al. 2002; Sickmann, Reinders et al. 2003)

A maioria das amostras para análise proteómica são obtidas quer a partir de tecidos celulares ou fluidos corporais. Para amostras de células, tanto métodos suaves como agressivos têm vindo a ser usados para a ruptura das células, com o objectivo de obter amostras para estudos proteómicos. Protocolos utilizados para a ruptura de células incluem lise osmótica (Bohring and Krause 1999), lise congelar-descongelar, lise com detergente e lise enzimática. (Salazar and Asenjo 2007) Em geral, os métodos suaves são aplicados a células onde a lise ocorre facilmente como acontece nos glóbulos vermelhos. Os métodos mais duros incluem sonicação, pressão mecânica, trituração e homogeneização. (Nandakumar and Marten 2002) Existem vários kits comerciais de extracção de proteínas para diferentes tipos de células. Em Proteómica, amostras a partir de fluidos corporais podem ser recolhidas a partir de sangue (soro ou plasma), urina, saliva, suor, suco gástrico, etc. São necessários diferentes procedimentos para a obter amostras para análise proteómica a partir de diferentes fluidos corporais. (Chen 2008)

O avanço mais importante em Proteómica tem sido a identificação das proteínas separadas por electroforese gel por espectrometria de massa. Baseia-se na digestão das proteínas separadas por electroforese gel por uma protease como a tripsina, que possui uma sequência específica. A razão para a análise de péptidos resultantes da separação de proteínas por electroforese gel é que as proteínas são mais difíceis de analisar por espectrometria de massa, e o peso molecular das proteínas geralmente não é suficiente para a sua identificação numa base de dados. (Pandey and Mann 2000) Pelo contrário, os péptidos são mais fáceis de eluir a partir do gel e até mesmo um pequeno conjunto de péptidos provenientes de uma proteína fornecem informação suficiente para a identificação. (Henzel, Billeci et al. 1993)

Existem duas abordagens principais para a identificação de proteínas por espectrometria de massa. Na abordagem de ‘peptide-mass mapping’, inicialmente sugerido por *Henzel* (Henzel, Billeci et al. 1993) e os seus colaboradores, é adquirido um espectro de massa de uma mistura de péptidos, que resulta em ‘peptide-mass fingerprint’ da proteína em estudo. Este espectro de massa é obtido por MALDI-MS, que resulta numa distribuição dos tempos de voo de cada péptido que constitui a mistura. Vários desenvolvimentos têm sido realizados no processo de identificação por MALDI, em que centenas de spots de proteínas têm sido digeridas enzimaticamente, obtendo-se o seu espectro de massa e realizado pesquisa automática nas bases de dados. (Jensen, Mortensen

et al. 1997; Berndt, Hobohm et al. 1999) O segundo método para a identificação de proteínas baseia-se na fragmentação de péptidos numa mistura para obter informação sobre a sua sequência. Neste método, os péptidos são ionizados por ionização electrospray (ESI). Os íões péptidos são conduzidos para um espectrómetro de massa tandem que tem a capacidade de isolar cada uma das espécies que constituem a mistura. A espectrometria de massa tandem é tecnicamente mais complexa do que MALDI fingerprinting. A sua principal vantagem é que as informações obtidas a partir da sequência de vários péptidos é muito mais específico para a identificação de uma proteína do que uma lista de massas de péptidos. (Pandey and Mann 2000)

Um dos desafios mais importantes na análise de proteínas por 2-DE é como as proteínas são separadas e como estas se tornam visíveis. Por exemplo, no plasma, as proteínas com baixa abundância, como as citocinas, são frequentemente mascaradas por proteínas de abundância elevada como a albumina. (Sarah Aldred 2004) *Garfin* demonstrou bem este aspecto numa visão geral sobre electroforese 2-DE. (Garfin 2003) Este artigo de revisão descreve uma grande variedade de métodos que aumentam as quantidades relativas de uma proteína de baixa abundância numa amostra, incluindo métodos como pré-fraccionamento e cromatográficos. Existem várias formas de favorecer a separação e visualização de proteínas sem que seja necessária uma manipulação extensiva da amostra ou fraccionamento. (Garfin 2003) A utilização de géis de grande formato (30 x 30cm) permite uma melhor resolução das proteínas. Contudo, a dificuldade em manusear géis deste tamanho torna a sua rotina impraticável. Os géis de formatos mais pequenos (15 x 10cm) são mais práticos de usar mas em alguns casos pode resultar na sobrelotação de proteínas em algumas regiões do gel. (Gorg, Obermaier et al. 2000)

A maioria das experiências em Proteómica invoca a análise simultânea de vários milhares de espécies de proteínas a partir de amostras de complexos biológicos. A separação de péptidos e proteínas é um elemento chave na análise proteómica fornecendo um método para simplificar misturas de moléculas complexas. A maioria dos métodos de separação existentes (incluindo electroforese gel e métodos baseados em cromatografia líquida) está actualmente em uso. (Yates 2004)

Existem duas abordagens para o estudo da proteómica. Na abordagem bottom-up, misturas de proteínas complexas são digeridas enzimaticamente em misturas de péptidos muito complexas que são depois fraccionadas por cromatografia multidimensional antes de

serem submetidos à análise por espectrometria de massa tandem. Espectros MS/MS são registados para o maior número de péptidos possível. Os resultados são utilizados na pesquisa em bases de dados para identificar as proteínas presentes na mistura original. Este tipo de abordagem é mais favorável para automatização. (Link 2002) Estes procedimentos tipicamente identificam um número de péptidos por proteína muito limitado, mas é suficiente para identificar o gene a partir do qual a proteína foi transcrita. (Kleiner 2005) Na abordagem top-down, proteínas intactas são exibidas e diferentes isoformas podem ser isoladas antes da caracterização e identificação por espectrometria de massa. Isto é especialmente útil para desvendar padrões complexos de variações de splice ou modificações pós-transducionais. (Reid and McLuckey 2002)

## **2.1 Modificações pós-translacionais**

A análise das modificações pós-translacionais representa um dos aspectos mais desafiadores da investigação proteómica. A fosforilação é necessária para a activação e/ou funcionalidade das proteínas (Mann, Ong et al. 2002) e é catalisada por proteínas cinases. Os locais mais comuns de fosforilação em proteínas são a tirosina, serina e treonina e potencialmente, existem dezenas de milhares de locais de fosforilação, dos quais menos de 2000 são conhecidos. (Zhang, Zha et al. 2002)

O oxigénio reactivo ou o azoto podem causar um número diversificado de modificações químicas nas proteínas, algumas das quais são irreversíveis. A nitração e/ou oxidação de proteínas podem modificar a sua função ou acção e os métodos proteómicos têm vindo a ser usados para identificar proteínas que tenham sido modificadas deste modo. (Ghezzi and Bonetto 2003)

O princípio geral para a identificação de uma proteína ou de modificações pós-translacionais de uma proteína por espectrometria de massa consiste na comparação do espectro de massa obtido experimentalmente com um espectro de massa de uma base de dados de uma proteína conhecida. (Govorun and Archakov 2002) A utilização da espectrometria de massa para identificação de proteínas separadas por electroforese 2D e consequente proteólise enzimática é usado em estudos proteómicos. Usualmente a identificação era realizada recorrendo à análise do peso molecular de péptidos resultantes da digestão proteolítica da proteína que estava a ser analisada (peptide fingerprint).



Todavia, mais recentemente, o uso de espectrometria de massa tandem (MS/MS) aumentou significativamente a eficácia da espectrometria de massa. Os péptidos ionizados escolhidos pelo primeiro espectrómetro de massa são objecto de fragmentação durante a colisão com gás (na célula de colisões) e os fragmentos resultantes são analisados no segundo espectrómetro de massa. A análise do espectro de MS/MS permite a determinação da sequência de aminoácidos do péptido. (Veaser, Dunn et al. 2001)

Em regra, os programas para a identificação de proteínas através dos seus espectros de massa usam bases de dados que estão disponíveis gratuitamente contendo sequências de aminoácidos das proteínas e sequências de nucleótidos de genes. As bases de dados mais conhecidas são: SWISS-PROT, TrEMBL, PIR-International (Protein Identification Resource, National Biomedical Research Foundation, Washington, USA), NCBIInr (National Center of Biotechnological Information) e ESTdb (Expressed Sequence Tags database, NCBI, NIH). A SWISS-PROT é uma base de dados que possui sequências de proteínas, o seu domínio estrutural, modificações pós-translacionais, etc.; a TrEMBL é um complemento para a SWISS-PROT, que contém todas as sequências das proteínas; a PIR-International é também uma base de dados de sequências de proteínas; NCBIInr é uma base de dados que contém sequências traduzidas a partir de sequências de ADN de um banco de Genes (GeneBank) e também contém sequências das bases de dados de PDB, SWISS-PROT, e PIR. (Veaser, Dunn et al. 2001) Todas estas bases de dados são constantemente actualizadas e são caracterizadas pelo seu formato padronizado dos dados. Os algoritmos existentes e os programas correspondentes podem ser subdivididos em três grupos principais: os programas que usam o “peptide fingerprint” de péptidos proteolíticos para a identificação de proteínas (PeptIdent, MultiIdent, ProFound), programas adicionais que funcionam com espectros de massa de MS/MS (PepSea, MASCOT, MS-Fit, MOWSE) ou apenas com espectrometria de massa tandem (MS/MS), e programas que funcionam apenas com espectrometria de massa tandem (MS/MS) (SEQUEST, PepFrag, MS-Tag, Sherpa). Os algoritmos mais simples para a pesquisa de proteínas nas bases de dados corresponde aos espectros de massa obtidos experimentalmente e teoricamente e bases de dados de proteínas de acordo com o número de péptidos correspondentes. Algoritmos mais perfeitos utilizam informação adicional como o ponto isoeléctrico da proteína, o seu peso molecular, a composição em aminoácidos, etc. (PeptIdent, MultiIdent). (Wilkins, Gasteiger et al. 1998)

O algoritmo MOWSE é mais seletivo e sensível do que os outros algoritmos calculando apenas o número de péptidos correspondentes. Este tipo de algoritmo tem em consideração tanto o excesso de péptidos com a mesma massa molecular na base de dados como o tamanho da proteína. (Pappin, Hojrup et al. 1993) O programa MASCOT baseia-se no algoritmo de MOWSE. Este programa, MASCOT, também avalia a possibilidade de uma correspondência aleatória das massas de péptidos experimentais e teóricas. O uso de consultas sequenciais MASCOT pode otimizar tais parâmetros. Com este programa é possível identificar proteínas em misturas relativamente simples. (Perkins, Pappin et al. 1999) O programa SEQUEST é usado na identificação de proteínas com base no espectro de massa dos iões fragmento. Calcula o coeficiente de correlação entre o espectro de massa obtido experimentalmente e aqueles que foram calculados a partir de sequências existentes nas bases de dados. Além de espectros de iões fragmento, esta abordagem não necessita de outro tipo de informação, mas a pesquisa é demorada. (Taylor, Walsh et al. 1996)

A metodologia dos estudos proteómicos é simultaneamente desenvolvida em várias direcções e influencia significativamente as nossas noções nas capacidades das ciências biológicas. O uso de bases de dados em sequências de nucleótidos completas dos genomas, métodos para a sequenciação de proteínas *de novo* por espectrometria de massa e métodos altamente eficazes para a separação de proteínas por meio de electroforese 2D e cromatografia aumentam significativamente as capacidades de certas experiências biológicas e dá um rápido algoritmo para a decodificação de mecanismos moleculares particulares e novas características de funcionamento da matéria viva. (Govorun and Archakov 2002)



## **V. Oxidação da $\alpha$ -amilase**

---



## 1 Introdução

A  $\alpha$ -amilase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohidrolase EC 3.2.1.1) catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas do amido. (Fitter 2005)  $\alpha$ -amilases fúngicas e bacterianas, e em particular as enzimas provenientes a partir de espécies de *Bacillus*, tem um interesse especial nos processos biotecnológicos em larga escala devido à sua notável termoestabilidade e por causa de sistemas de expressão eficientes (tecnologia de ADN recombinante) que estão disponíveis para estas enzimas. As enzimas que possuem actividade de  $\alpha$ -amilase são encontradas em duas famílias de hidrolases glicosídicas estruturalmente diferentes (família 13 e 57, para mais detalhes ver também (Nielsen and Borchert 2000)). (MacGregor, Janecek et al. 2001) As  $\alpha$ -amilases têm vindo a ser isoladas a partir de vários organismos (mesófilos, termófilos, hipertermófilos) e mostram uma ampla gama de temperaturas de fusão (40-110°C). Ao longo das últimas duas décadas, esta proteína monomérica (50-70 kDa) tornou-se um sistema modelo importante na investigação da adaptação térmica de pequenas e médias enzimas. (Linden and Wilmanns 2004)

A maioria das estruturas das  $\alpha$ -amilases conhecidas é constituída por um monómero com três domínios. O domínio A constitui a unidade estrutural central. O domínio B, juntamente com o domínio A, constituem um substrato e o domínio C estão localizados em locais opostos em relação ao domínio central. Em contraste com a parte central da estrutura, os domínios B e C variam no tamanho e na estrutura entre as  $\alpha$ -amilases. Quase todas as  $\alpha$ -amilases conhecidas têm pelo menos um local de ligação ao cálcio conservado. A maioria das  $\alpha$ -amilases conhecidas tem mais do que um local de ligação ao cálcio, o que contribui substancialmente para a sua estabilidade estrutural. (Tanaka and Hoshino 2002)

## 2 $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*

A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* ( $\alpha$ -1,4-D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas em oligossacarídeos e polissacarídeos. (Brzozowski, Lawson et al. 2000) A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* pertence à família 13 das hidrolases glicosídicas. A estrutura tridimensional para vários membros pertencentes a esta família tem vindo a ser determinada, incluindo para as  $\alpha$ -amilases de *Aspergillus oryzae* (Swift, Brady et al. 1991), *Aspergillus niger* (Boel, Brady et al. 1990), porcine pancreas (Qian, Haser et al. 1994), human saliva (Rydberg, Sidhu et al. 1999), *Bacillus licheniformis* (Machius, Wiegand et al. 1995), *Bacillus stearothermophilus* (Dauter, Dauter et al. 1999) e *Alteromonas haloplanctis* (Aghajari, Feller et al. 1998).

A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* é constituída por 483 aminoácidos. A sua estrutura consiste em três domínios: domínio A, constituindo o núcleo catalítico ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>; domínio B, que se encontra localizado entre a cadeia 3- $\beta$  e a hélice 3- $\alpha$ ; e domínio C, que consiste em 8 cadeias em folha- $\beta$ . (Brzozowski, Lawson et al. 2000) A  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui três iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e um ião sódio ( $\text{Na}^+$ ) presentes na sua estrutura. (informações retiradas de UniProtKB/Swiss-Prot – [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) A figura a seguir representada mostra a estrutura da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*.



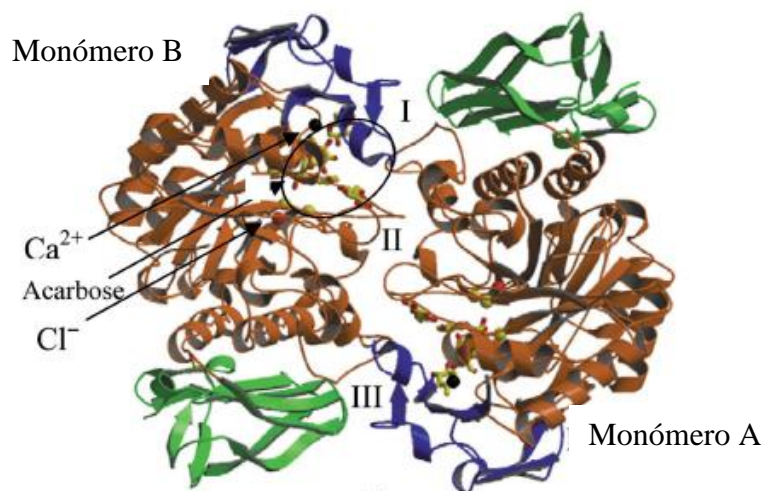
**Figura 6:** Estrutura da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. (adaptado de [www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov))

### 3 $\alpha$ -amilase salivar humana

A  $\alpha$ -amilase humana é uma proteína secretora que é produzida tanto nas glândulas pancreáticas como salivares. (Fisher, Govindasamy et al. 2006) A  $\alpha$ -amilase salivar humana ( $\alpha$ -1,4-D-glucano glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) constitui uma porção significativa da saliva e desempenha um papel importante na digestão inicial do amido, glicogénio e outros polissacarídeos. Actua como um monómero e catalisa a hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glucosídicas, produzindo um oligossacarídeo na configuração  $\alpha$ -anomérica. (MacGregor, Janecek et al. 2001) A  $\alpha$ -amilase salivar humana pertence à família 13 das hidrolases glicosídicas que catalisam reacções como hidrólise, transglicosilação, ciclização e condensação. Embora esta família de enzimas seja a mais diversificada de todas as famílias de hidrolases glicosídicas, os membros partilham domínios catalíticos semelhantes. (Pujadas and Palau 2001)

A  $\alpha$ -amilase salivar humana é constituída por 496 aminoácidos e está presente na saliva sob duas formas: uma forma glicosilada (aparentemente de peso molecular 62kDa) e uma forma não-glicosilada de 56kDa. (Ramasubbu, Ragunath et al. 2003) A sua estrutura consiste em três domínios (A, B e C): domínio A (resíduos 1-99 e 169-404) contém o motivo  $(\beta/\alpha)_8$  da amilase comum e contém três resíduos catalíticos, Asp197, Glu333 e Asp300; domínio B (resíduos 100-168) consiste num loop aberto que contém diversas hélices e cadeias  $-\beta$ , sendo estruturalmente o domínio menos ordenado. Contém um local de ligação ao cálcio. O domínio C (resíduos 405-496) é constituído por dez cadeias  $-\beta$  em que oito formam o motivo chave-Greek. (Ramasubbu, Ragunath et al. 2003; Fisher, Govindasamy et al. 2006) A  $\alpha$ -amilase salivar possui um ião cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) que está ligado perto do local activo no domínio A e é coordenado pelas cadeias laterais da Arg195, Asn298 e Arg337. O ião cálcio é coordenado pela His201 a partir do domínio A e por Asn100, Arg158 e Asp167 a partir do domínio B. A função exacta do domínio C permanece incerta, mas parece desempenhar um papel importante na estabilização do domínio A. (Fisher, Govindasamy et al. 2006) A estrutura da  $\alpha$ -amilase salivar humana está representada na figura 7.





**Figura 7:** Estrutura da  $\alpha$ -amilase salivar humana. (adaptado de (Fisher, Govindasamy et al. 2006))

O domínio A está representado a laranja, o domínio B a azul e o domínio C a verde, para cada monómero. Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) estão representados como esferas vermelhas e pretas, respectivamente, nos resíduos do local activo (Asp197, Glu233 e Asp300). Os resíduos do local activo estão representados por esferas amarelas. A acarbose é um inibidor e é representado por uma esfera que rodeia o local activo de cada dímero. (Qian, Haser et al. 1994)

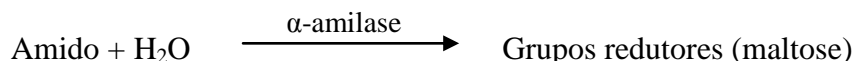
## **VI. Materiais e métodos**

---



## 1 Determinação da actividade enzimática da $\alpha$ -amilase

A determinação da actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase baseia-se no seguinte princípio:



Foi determinada a actividade enzimática para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma Prod. No. A6380) e para a  $\alpha$ -amilase salivar humana (Sigma Prod. No. A0521). Para a determinação da actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase, a uma alíquota de 100 $\mu$ l de uma solução de amido 1,0% (w/v) adicionou-se 100 $\mu$ l de  $\alpha$ -amilase. As amostras foram misturadas por inversão e colocaram-se a incubar a 20°C durante 3min. Após o período de incubação, adicionou-se 100 $\mu$ l de uma solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico 96mM (Sigma Prod. No. D-0550) e Tartarato de sódio potássio (Sigma Prod. No. S-2377) a cada uma das amostras. A adição desta solução é utilizada para parar a reacção. Cada uma das amostras foi então colocada num banho fervente durante 15min. Posteriormente, colocaram-se em gelo e depois adicionou-se 900 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milli-Q. A leitura da absorvância realizou-se num espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo, USA) a 540nm. Prepararam-se 5 diluições de uma solução padrão de maltose (Sigma Prod. No. M-5885) desde 0,4mg/ml a 2,0mg/ml, para a construção de uma curva padrão. Uma unidade (1U) de enzima liberta 1mg de maltose.

## 2 Oxidação da $\alpha$ -amilase

A oxidação da  $\alpha$ -amilase realizou-se seguindo a reacção de *Fenton*. (Fenton 1893; Stadtman 1998) De acordo com *Baron et al.* (Baron, Refsgaard et al. 2006), o FeCl<sub>2</sub>, EDTA e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionados numa mistura oxidativa, usando razão 1:1 de FeCl<sub>2</sub>:EDTA. Todas as reacções de oxidação foram realizadas por incubação das amostras num banho a 37°C. Foram três as condições oxidativas usadas. No caso da **condição Ox\_10**, as concentrações do oxidante de Fenton foram 5mM de FeCl<sub>2</sub>:EDTA, 1mM de  $\alpha$ -amilase e 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para a **condição Ox\_1**, as concentrações do oxidante de Fenton foram 0,5mM de FeCl<sub>2</sub>:EDTA, 1mM de  $\alpha$ -amilase e 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na **condição Ox\_0,1**, as

concentrações do oxidante de Fenton foram 0,05mM de FeCl<sub>2</sub>:EDTA, 1mM de  $\alpha$ -amilase e 0,1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todas estas reacções foram realizadas em 20mM de tampão fosfato (pH 6.9). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Para controlar as reacções de oxidação colocou-se a oxidar em simultâneo com a oxidação da  $\alpha$ -amilase, duas reacções controlo. **Controlo\_1** possuía todos os agentes que conduziam à oxidação da  $\alpha$ -amilase, excepto a enzima. O **Controlo\_2** foi utilizado para controlar a oxidação da enzima, não possuindo os agentes que conduziam à sua oxidação. Após vários períodos de incubação (0,5-4h), a reacção de oxidação foi interrompida com uma solução de HCl 2,5M e posteriormente neutralizada com uma solução de 2,5M de NaOH (hidróxido de sódio). As amostras foram armazenadas a -80°C para análise posterior.

### 3 Determinação de grupos carbonilo

O conteúdo em grupos carbonilo nas proteínas foi determinado usando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), como foi descrito por *Levine et al.* (Amici, Levine et al. 1989), usando ligeiros ajustamentos. (ver também (Isabella Dalle-Donne 2003))

Antes do ensaio, as amostras foram colocadas a oxidar num banho a 37°C. No final de cada período de incubação (0,5-4h) retiravam-se alíquotas de 1mL para realizar o ensaio. As amostras (100 $\mu$ g) foram incubadas no escuro (à temperatura ambiente) durante 1h com 400 $\mu$ L de 10mM DNPH preparada em 2,5M HCl. A cada 15min as amostras eram agitadas. Os controlos foram preparados por incubação no escuro apenas com 400 $\mu$ L de 2,5M HCl. Após 1h de incubação no escuro, adicionava-se tanto às amostras como aos controlos 250 $\mu$ L de TCA 50%. As amostras e os controlos eram colocados no gelo durante 30min e posteriormente eram colocados a centrifugar durante 30min, a 14000rpm e a 4°C (Sigma Laboratory Centrifuges 2K15, B. Braun Biotech International). Posteriormente, o sobrenadante era descartado e adicionava-se 1mL de TCA 10%. Novamente, as amostras eram colocadas no gelo durante 30min e depois eram colocadas a centrifugar durante 30min a 14000rpm e a 4°C (Sigma Laboratory Centrifuges 2K15, B. Braun Biotech International). Depois de se retirar o sobrenadante, os precipitados eram lavados pelo menos três vezes com 1mL de etanol: acetato de etilo (1:1, v/v) para remover a DNPH que não reagiu. Retirava-se o sobrenadante e as amostras eram colocadas a secar na Speed Vac (Speed Vac Plus SC 210 A, Thermo Savant, USA). Finalmente, o precipitado era

dissolvido numa solução de 80 $\mu$ L de 6M de Guanidina e 420 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milli-Q. As amostras e os controlos eram colocados a incubar a 37°C durante 10min. O conteúdo em grupos carbonilo era calculado com um coeficiente de absorptividade de 22000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> ( $\lambda$  = 370nm).

## 4 Caracterização e identificação das modificações oxidativas da $\alpha$ -amilase por Espectrometria de Massa

### 4.1 Digestão em solução com Tripsina

A Tripsina é uma protease serínica que cliva especificamente as ligações peptídicas no terminal carboxílico da arginina e da lisina. No entanto, quando uma prolina se encontra no lado carboxílico de uma arginina ou de uma lisina, normalmente a tripsina não consegue clivar a ligação. A tripsina não modificada é alvo de proteólise, gerando fragmentos que podem interferir com a análise de proteínas ou transformando-se em pseudotripsina, exibindo especificidade tipo quimiotripsina. ((Rice, Means et al. 1977); (Wilkinson 1986))

Para realizar a digestão em solução, colou-se a oxidar cada uma das amostras de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e  $\alpha$ -amilase salivar humana) por incubação num banho a 37°C. Utilizaram-se duas condições oxidativas, **condição Ox\_10** e a **condição Ox\_1**, para cada uma das  $\alpha$ -amilases. As condições oxidativas referidas já foram descritas no ponto 2. Todos os ensaios foram realizados em triplicado. Após vários períodos de incubação (0,5-24h), retiraram-se alíquotas de 200 $\mu$ l (20 $\mu$ g) e adicionou-se 10 $\mu$ l de uma solução HCl 2,5M para parar a reacção. A reacção foi neutralizada com 10 $\mu$ l de uma solução de NaOH 2,5M. A cada uma das amostras adicionou-se 8 $\mu$ l de Tripsina (Promega, Madison, WI, USA) numa razão 1:20. As amostras foram colocadas a incubar a 37°C overnight. As amostras foram armazenadas a -80°C para análise posterior.

## 4.2 Análise das amostras digeridas por nano-HPLC

A separação por nano-HPLC foi executada no módulo de separação Ultimate 3000 (LC Packings) utilizando uma coluna capilar (C18 Zorbax SB 300; 0,75cm de diâmetro interno; 15cm de comprimento). As amostras a serem analisadas foram injectadas todas com a mesma concentração ( $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). A separação dos péptidos foi executada utilizando um gradiente linear de 95% de solvente A (constituído por 95% de  $\text{H}_2\text{O}$ , 5% acetonitrilo (ACN) e 0,05% TFA (ácido trifluoracético)); e 5% do solvente B (constituído por 20%  $\text{H}_2\text{O}$ , 80% ACN e 0,04% TFA) até 45% do solvente A e 55% do solvente B com um caudal de 300nl/min. Os péptidos depois de eluírem da coluna capilar nanolítica foram aplicados directamente numa placa de MALDI em fracções de 20 segundos, utilizando um colector automático de fracções Probot (LC Packings) com adição de 270nl de matriz constituída por 12mg de matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycínamico, 70% de ACN, 30%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,3% TFA e adição de padrão interno (péptido Glu-fib) para posterior identificação e caracterização.

## 4.3 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF-TOF)

Em cada ponto da placa de MALDI aplicou-se  $0,5\mu\text{l}$  de amostra e  $0,5\mu\text{l}$  de matriz  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycínamico (5mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycínamico, 50% de  $\text{H}_2\text{O}$ , 50% ACN e 0,3% de TFA). Após a aplicação na placa, esta deixou-se a secar para ser analisada posteriormente. Os espectros foram obtidos num espectrómetro de massa MALDI-TOF-TOF (4800 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems) com reflectão em modo positivo de iões e obtidos espectros no intervalo de massas desde os 800-4000 Da, com 1500 tiros laser.

#### 4.4 Pesquisa nas bases de dados

Os espectros foram processados e analisados pela “Global Protein Server Workstation”, da Applied Biosystems, utilizando o software Mascot (Matrix Science Ltd, UK) para a pesquisa dos “peptide mass fingerprints” e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da SwissProt e da NCBI (National Center for Biotechnology Information). Para uma maior confiança nos resultados das identificações foram utilizados nas pesquisas tanto os espectros de MS como os de MS/MS. Os desvios introduzidos na pesquisa para a identificação das modificações sofridas pela proteína para dados de MS e de MS/MS foram de 30ppm e de 0,3 Da, respectivamente. A identificação das modificações sofridas pela proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 90%.



## **VII. Resultados e Discussão**

---



O objectivo principal da realização deste trabalho é a identificação e caracterização das modificações oxidativas induzidas na  $\alpha$ -amilase. Para tal, o estudo centrou-se em duas  $\alpha$ -amilases diferentes: a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Neste estudo, usaram-se três condições oxidativas, Ox\_10, Ox\_1 e Ox\_0,1, correspondendo, respectivamente, a concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM, 1mM e 0,1mM. As amostras foram analisadas a diferentes períodos de incubação (0-4h). Posteriormente, procedeu-se à determinação da actividade enzimática e dos grupos carbonilo. A determinação dos grupos carbonilo é um importante marcador da oxidação de proteínas. (Berlett and Stadtman 1997; Creasy and Cottrell 2004) Para a determinação dos grupos carbonilos as amostras foram analisadas para os diferentes períodos de incubação (0-4h). Após a determinação dos grupos carbonilo, cada uma das amostras de  $\alpha$ -amilase foram digeridas em solução com tripsina e analisadas posteriormente por nano-HPLC e por MALDI-TOF/TOF. A análise por MALDI-TOF/TOF permite identificar as modificações sofridas ao longo dos vários períodos de incubação por cada uma das  $\alpha$ -amilases.

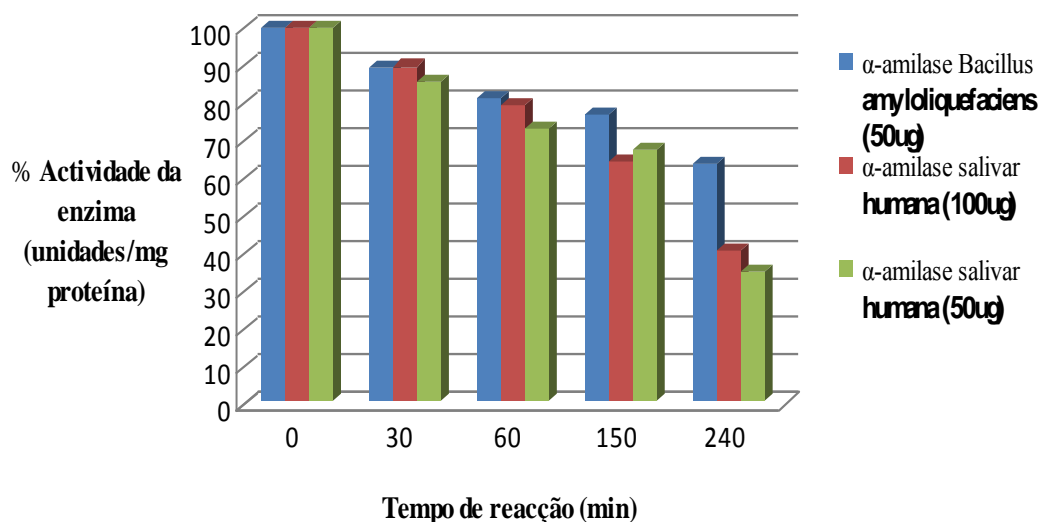
## **1 Oxidação da $\alpha$ -amilase e determinação da sua actividade enzimática**

A tabela a seguir representada (Tabela 1) apresenta os resultados obtidos na oxidação tanto da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* como da  $\alpha$ -amilase salivar humana para cada uma das concentrações do reagente de Fenton em estudo e os vários períodos de incubação. No ensaio de oxidação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* utilizaram-se 50 $\mu$ g de enzima, enquanto o ensaio oxidativo da  $\alpha$ -amilase salivar humana foi realizado com 50 $\mu$ g e 100 $\mu$ g de enzima, mantendo-se a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para cada uma das amostras, o ensaio de oxidação foi realizado em triplicado. A cada um dos resultados obtidos foi subtraído o respectivo valor do controlo\_2. Posteriormente, calculou-se a média dos resultados em triplicado para cada período de incubação (0-4h) e o respectivo desvio padrão. Os resultados apresentados na tabela encontram-se em percentagem (%). Para o tempo de reacção 0 min considerou-se 100% de actividade sendo que os restantes valores correspondentes a cada período de incubação foram obtidos tendo em consideração a actividade a tempo 0.

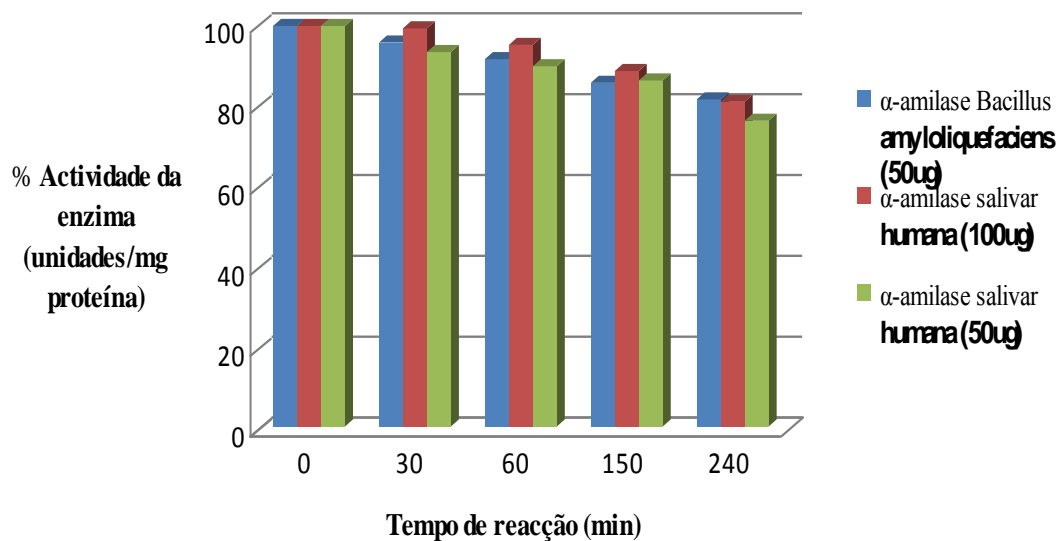
**Tabela1:** Resultados obtidos para as diferentes concentrações do reagente de Fenton utilizadas para a  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* e  $\alpha$ -amilase salivar humana.

Concentração enzima	$\alpha$ -amilase <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			$\alpha$ -amilase salivar humana					
	50ug/ml			100ug/ml			50ug/ml		
Tempo de reacção (min)	10mM	1mM	0,1mM	10mM	1mM	0,1mM	10mM	1mM	0,1mM
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
30	89,3	95,6	97,5	89,4	99,1	99,1	85,1	93,4	94,9
60	81,0	91,6	95,5	79,1	95,1	98,4	73,1	89,7	91,0
150	76,5	85,4	92,3	64,1	88,5	92,1	67,1	86,1	87,9
240	63,6	81,8	89,7	40,3	80,9	83,5	34,7	76,1	82,2
<b>Desvio Padrão</b>	13,7	7,4	4,1	23,3	7,9	6,9	24,4	8,9	6,8

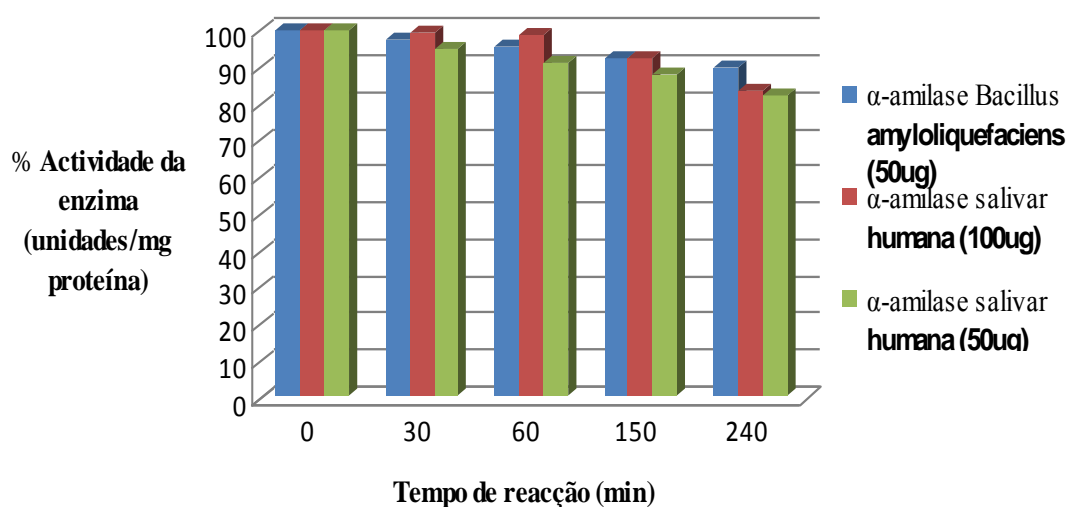
As figuras a seguir apresentadas (figuras 8,9 e 10) correspondem à representação gráfica dos resultados da oxidação de cada uma das  $\alpha$ -amilases obtidos para os diferentes períodos de incubação (0-240min). Em cada uma das figuras, a azul encontram-se representados os resultados da oxidação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (50 $\mu$ g); a vermelho, os resultados da oxidação da  $\alpha$ -amilase salivar humana (100 $\mu$ g); e a verde, os resultados da oxidação da  $\alpha$ -amilase salivar humana (50 $\mu$ g). A figura 8 apresenta os resultados da oxidação de cada uma das  $\alpha$ -amilases para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM. Relativamente às figuras 9 e 10, também apresentam os resultados da oxidação de cada uma das  $\alpha$ -amilases mas para uma concentração do reagente de Fenton de 1mM e 0,1mM, respectivamente. Para cada um dos gráficos representados nas figuras 8, 9 e 10 podemos observar não só o comportamento de cada uma das  $\alpha$ -amilases relativamente à sua actividade enzimática mas também podemos observar o seu comportamento relativamente à oxidação face às diferentes concentrações de Fenton utilizadas.



**Figura 8:** Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* e da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 9:** Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* e da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.



**Figura 10:** Representação gráfica dos resultados obtidos após a oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* e da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,1mM.

Pela análise dos resultados apresentados na figura 8 e na tabela 1, pode-se observar que, com o decorrer da reacção, a actividade das  $\alpha$ -amilases diminui. Quando o ensaio oxidativo é realizado com uma quantidade de 50 $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -amilase, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* mantém uma maior % de actividade enzimática do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Com o decorrer do tempo de reacção a oxidação pode-se observar que para cada uma das  $\alpha$ -amilases a actividade enzimática diminui consideravelmente. Estes resultados permitem concluir que a oxidação da  $\alpha$ -amilase salivar humana é mais acentuada do que a oxidação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Quando comparamos o processo de oxidação da  $\alpha$ -amilase salivar humana, utilizando uma quantidade de 50 $\mu\text{g}$  e 100 $\mu\text{g}$  de proteína, podemos observar que a  $\alpha$ -amilase salivar humana, utilizando uma quantidade de 50 $\mu\text{g}$  apresenta uma maior diminuição da actividade enzimática do que para 100 $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -amilase salivar humana, para a mesma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Da análise da figura 9 e 10, podemos observar que para a mesma relação concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :enzima, a  $\alpha$ -amilase salivar humana continua a ser mais sensível à oxidação mostrando uma menor % de actividade enzimática. Quando a proporção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é menor, parece existir um maior atraso no processo oxidativo

(manutenção da actividade catalítica) o que está de acordo com a natureza radicalar do processo oxidativo e da existência de um passo de propagação.

De uma maneira geral, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM a oxidação de cada uma das  $\alpha$ -amilases é mais rápida e mais acentuada do que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM e 0,1mM. De igual forma, quando a proporção enzima: $H_2O_2$  é menor, também a diminuição da actividade enzimática é menor.

## 2 Determinação de grupos carbonilo

A determinação dos grupos carbonilo é importante uma vez que são usados como marcadores da oxidação de proteínas. (Berlett and Stadtman 1997) Os grupos carbonilo (CO) (aldeídos e cetonas) são produzidos nas cadeias laterais das proteínas quando estas sofrem oxidação. (Isabella Dalle-Donne 2003)

As tabelas 2 e 3 mostram os resultados obtidos na determinação de grupos carbonilo para cada uma das concentrações de  $H_2O_2$  utilizadas para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e para a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Para cada uma das amostras, os ensaios e respectivos controlos foram realizados em triplicado para cada período de incubação. A cada um do valor das réplicas de cada uma das amostras foi subtraído o valor do respectivo controlo. O valor médio apresentado na tabela para cada tempo de reacção resulta da média de três réplicas para cada uma das concentrações do reagente de Fenton utilizadas. Para cada valor médio correspondente ao respectivo período de incubação calculou-se o respectivo desvio padrão.

**Tabela 2:** Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para cada uma das concentrações de reagente de Fenton em estudo, para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. ( $\sigma$  - desvio padrão)

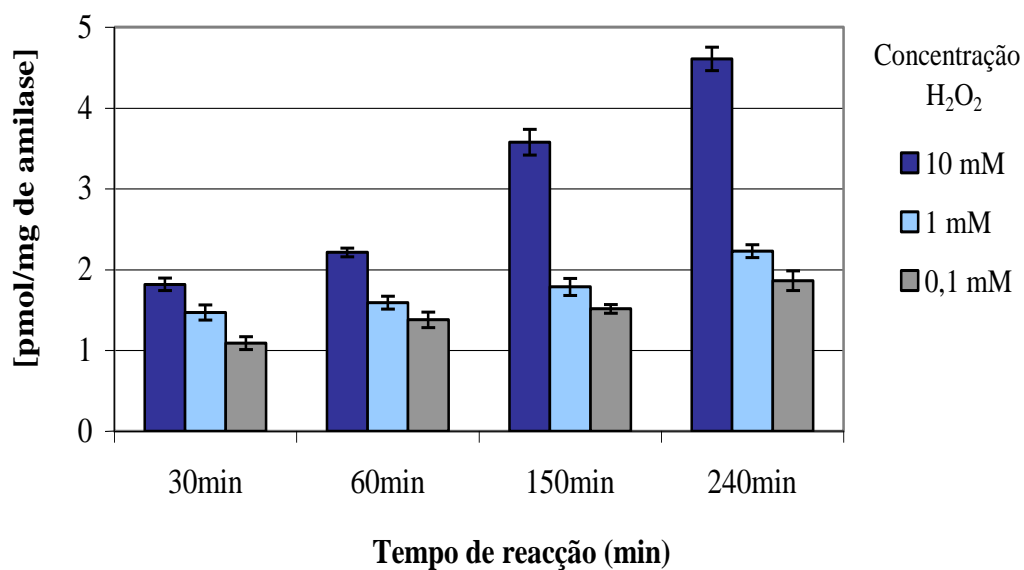
Tempo reacção (min)	[carbonilos] (pmol/mg de amilase)					
	10 mM		1 mM		0,1 mM	
	Média	$\sigma$	Média	$\sigma$	Média	$\sigma$
30	1,8	0,079	1,5	0,095	1,2	0,079
60	2,2	0,052	1,6	0,079	1,4	0,095
150	3,6	0,159	1,8	0,105	1,5	0,052
240	4,6	0,146	2,2	0,079	1,9	0,120

**Tabela 3:** Valores médios e respectivos desvios padrão obtidos para cada uma das concentrações de reagente de Fenton em estudo, para a  $\alpha$ -amilase salivar humana (50 $\mu$ g). ( $\sigma$  – desvio padrão)

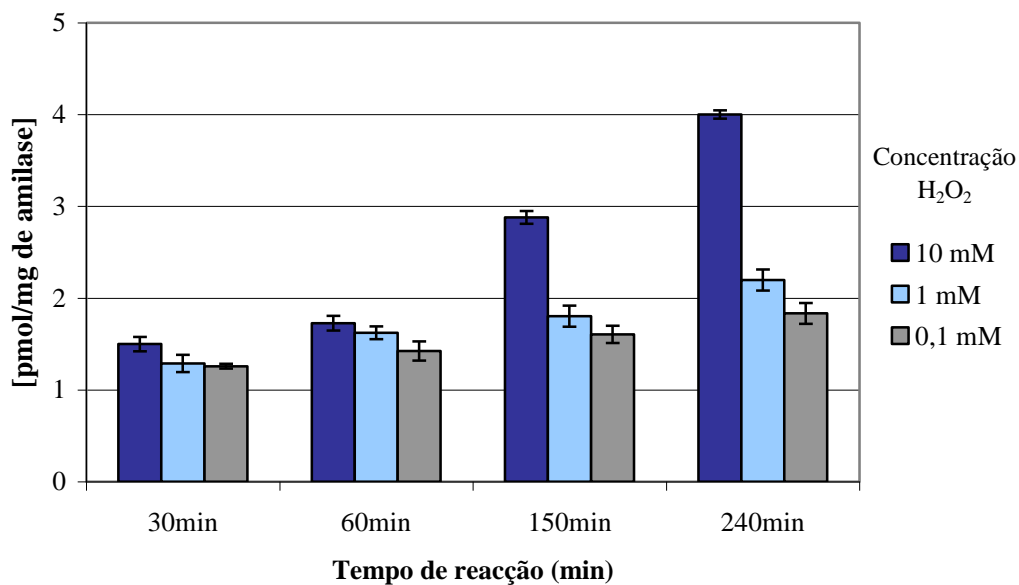
Tempo reacção (min)	[carbonilos] (pmol/mg de amilase)					
	10 mM		1 mM		0,1 mM	
	Média	$\sigma$	Média	$\sigma$	Média	$\sigma$
30	1,5	0,079	1,3	0,095	1,3	0,026
60	1,7	0,079	1,6	0,069	1,4	0,105
150	2,9	0,069	1,8	0,114	1,6	0,095
240	4,0	0,045	2,2	0,114	1,8	0,114

As figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos na determinação de grupos carbonilo para cada uma das concentrações do reagente de Fenton utilizadas. Estes resultados correspondem aos obtidos para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e para a  $\alpha$ -amilase salivar humana, respectivamente. Em cada uma das figuras pode-se observar que a concentração de grupos carbonilo, para cada uma das concentrações do reagente de Fenton utilizadas, está representada em função dos diferentes períodos de incubação em estudo. Os resultados são apresentados através da concentração de grupos carbonilo (pmol/mg de amilase) em função do tempo de reacção.





**Figura 11:** Conteúdo em grupos carbonilo na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* após a incubação com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  a 37°C em tampão fosfato (20mM, pH 6.9).

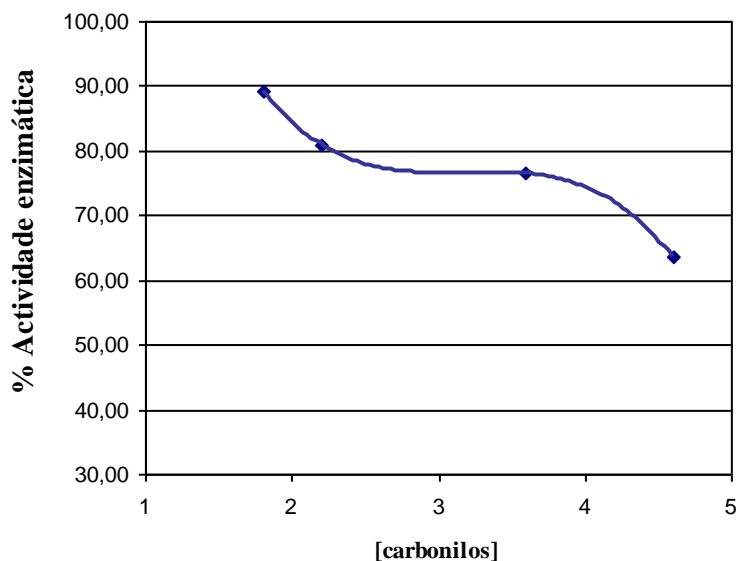


**Figura 12:** Conteúdo em grupos carbonilo na  $\alpha$ -amilase salivar humana (50 $\mu$ g) após a incubação com diferentes concentrações  $H_2O_2$  a 37°C em tampão fosfato (20mM, pH 6.9).

Pela análise dos resultados representados em cada uma das figuras (11 e 12) pode-se observar que tanto a oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* como a  $\alpha$ -amilase salivar humana levam a um aumento significativo dos grupos carbonilo. Na figura 11 pode observar-se que há uma maior produção de grupos carbonilo para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM. Observa-se também que o conteúdo em grupos carbonilo aumenta com o decorrer da reacção. No caso da oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* produz 4,6 $\mu$ mol de ligações carboniladas por mg de proteína. Também para a  $\alpha$ -amilase salivar humana há uma maior produção de grupos carbonilo (4,0 $\mu$ mol por mg de proteínas) para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM, como se pode observar na figura 12. Para as outras concentrações do reagente de Fenton utilizadas, 1mM e 0,1mM, há um aumento do conteúdo em carbonilos com o decorrer dos vários períodos de incubação sendo que esse aumento não é tão significativo como o que se pode observar para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM. As maiores diferenças são vistas à medida que o período da reacção de oxidação decorre, isto é, para concentrações de peróxido de hidrogénio elevadas há um aumento na formação de grupos carbonilo.

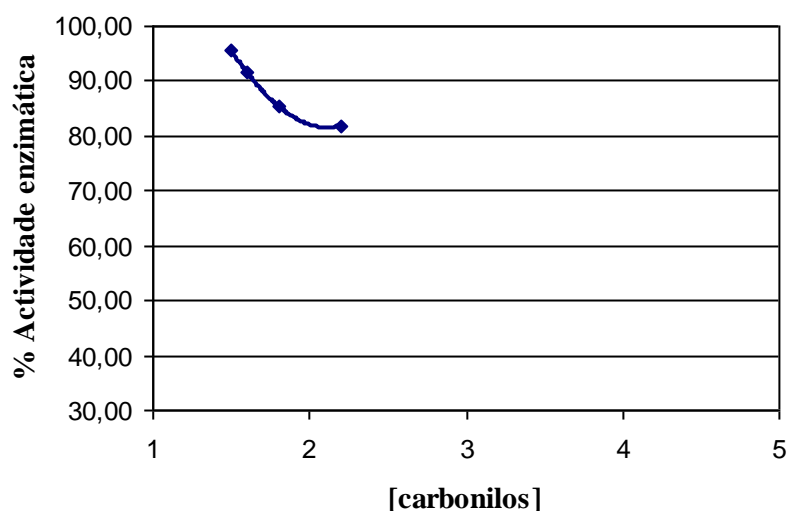
Quando comparamos o conteúdo em grupos carbonilo para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e para a  $\alpha$ -amilase salivar humana, podemos observar que para as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM e 0,1mM o conteúdo em grupos carbonilo é semelhante. No entanto, o conteúdo em grupos carbonilo para a  $\alpha$ -amilase salivar humana, para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM, é menor o que não está de acordo com a respectiva diminuição da actividade.

As figuras (13, 14, 15, 16, 17, 18) a seguir representadas relacionam o conteúdo em carbonilos com a actividade enzimática. A figura 13 relaciona o conteúdo em grupos carbonilo com a actividade enzimática para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM. As figuras 14 e 15 também relacionam o conteúdo em grupos carbonilo com a actividade enzimática mas quando se utilizou uma concentração do reagente de Fenton de 1mM e 0,1mM, respectivamente.

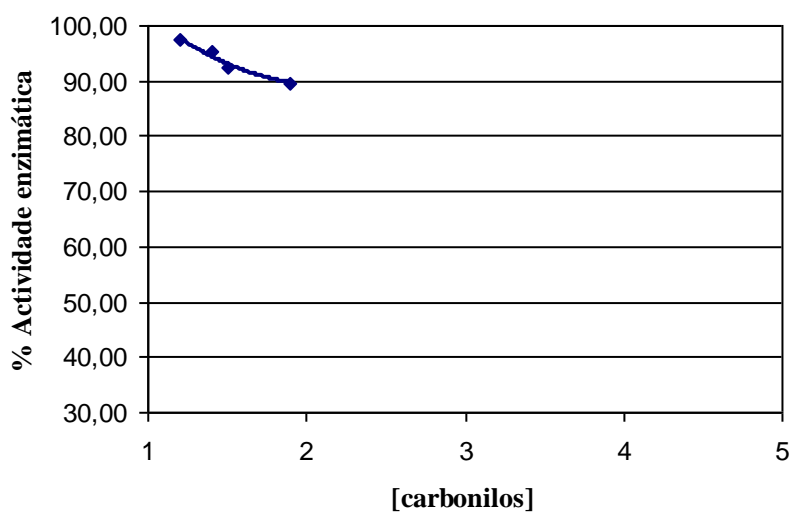


**Figura 13:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.

Pela análise da figura 13 podemos observar que, conforme se esperava, a actividade enzimática é maior quanto menor for o conteúdo em grupos carbonilo. Inicialmente, o conteúdo em grupos carbonilo aumenta até cerca de 2,5pmol de carbonilos sendo que a actividade enzimática diminui de 90% para cerca de 76%. A zona correspondente a 2,5pmol a 3,5pmol de carbonilos mantém-se com um valor de actividade enzimática de cerca de 75%, o que parece sugerir que a oxidação neste período, apesar de continuar a ocorrer, não influencia significativamente a actividade enzimática.



**Figura 14:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

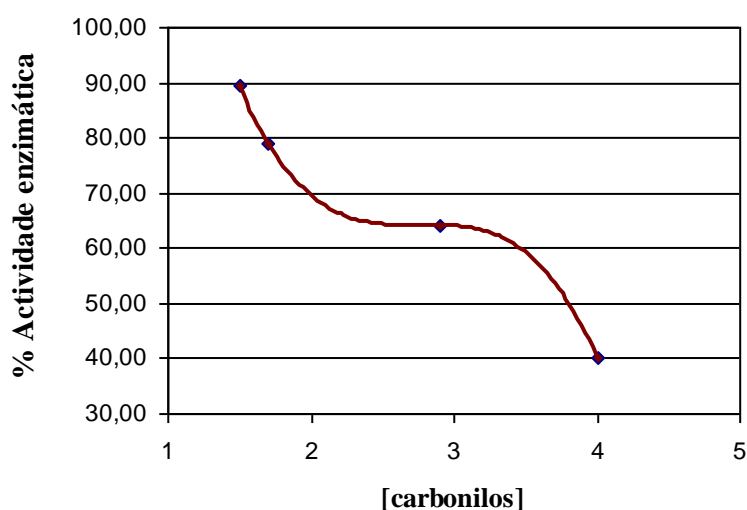


**Figura 15:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 0,1mM.

Como se pode observar nas figuras 14 e 15, o aumento em grupos carbonilo não é tão acentuado como o que se observa para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM. Para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM observa-se que o aumento dos grupos carbonilo ocorre até cerca de 2,2pmol. Neste caso, o aumento do conteúdo em grupos carbonilo ocorre

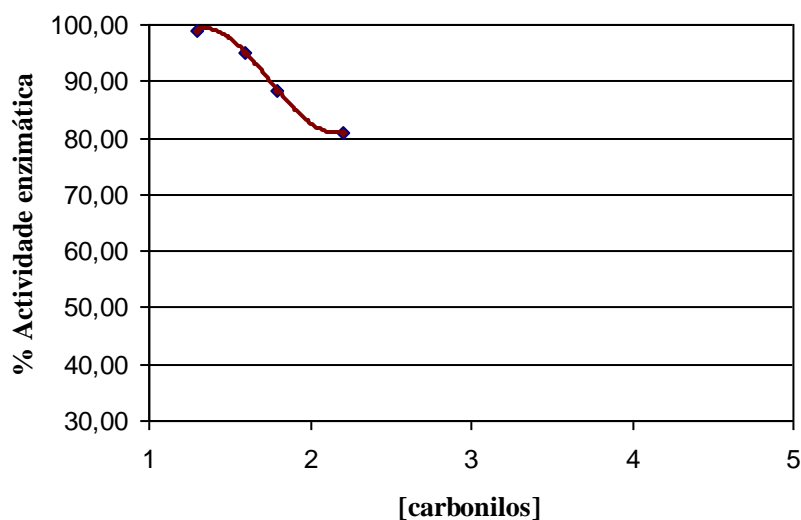
enquanto a actividade enzimática diminui de 95% para 81%. Quando se analisa a figura 15 podemos observar que o aumento em grupos carbonilo ocorre para uma diminuição da actividade enzimática correspondente a 99%-90%. Estes resultados estão de acordo com o observado na figura 13, mostrando que quando se utilizam menores concentrações de  $H_2O_2$ , a reacção de oxidação decorre de forma semelhante, apenas não sendo tão extensa. De facto, pode-se observar que, independentemente da concentração de  $H_2O_2$  utilizada, a presença de concentrações semelhantes de grupos carbonilos levam à mesma redução da actividade enzimática.

As figuras a seguir representadas correspondem à influência do conteúdo em grupos carbonilo na actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana. As figuras 16, 17 e 18 mostram os resultados obtidos quando se utilizaram concentrações de  $H_2O_2$  de 10mM, 1mM e 0,1mM, respectivamente.

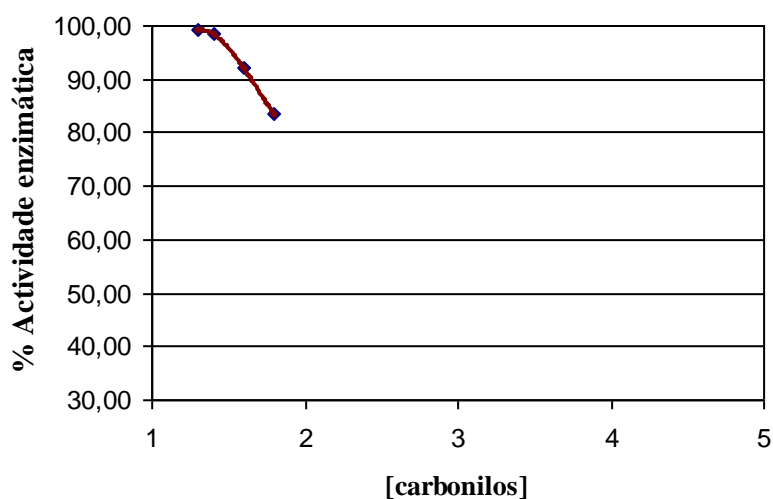


**Figura 16:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.

Da análise da figura 16 podemos observar que com o aumento do conteúdo em grupos carbonilo há uma diminuição da actividade enzimática de 90% para 40%. Quando comparamos estes resultados com os apresentados na figura 13 podemos observar que, neste caso, a diminuição da actividade enzimática é mais acentuada do que a diminuição da actividade enzimática observada para concentrações equivalentes de grupos carbonilo na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*.



**Figura 17:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.



**Figura 18:** Relação entre a actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana e o conteúdo em grupos carbonilo para uma concentração de  $H_2O_2$  de 0,1mM.

Da análise das figuras 17 e 18 podemos observar que o conteúdo em grupos carbonilo aumenta até cerca de 2,3pmol e 1,9pmol, respectivamente. Como se esperava, para valores da concentração do reagente de Fenton de 1mM e 0,1mM a diminuição da actividade enzimática não é tão acentuada como para uma concentração de  $H_2O_2$  de

10mM. Todavia, para o mesmo conteúdo em grupos carbonilo, a redução da actividade enzimática é semelhante.

### **3 Identificação e caracterização das modificações oxidativas da $\alpha$ -amilase**

O passo seguinte da realização deste trabalho consistiu na pesquisa das alterações sofridas por cada uma das  $\alpha$ -amilases usando a espectrometria de massa. Considerou-se apenas duas condições de oxidação, utilizando 50ug de proteína e 10 e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada uma das condições foi analisada para diferentes períodos de incubação (30, 60, 150 e 240 minutos). Posteriormente, cada as amostras foi digerida com tripsina e os digestos trípticos foram separados recorrendo-se à cromatografia líquida (LC). As fracções resultantes foram separadas por cromatografia líquida nano (nano HPLC) e aplicadas numa placa de MALDI recorrendo a um colector de fracções (Probot). Os péptidos foram então analisados usando um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF e sequenciados por espectrometria de massa tandem. A pesquisa das modificações oxidativas foi efectuada recorrendo a uma base de dados interna e utilizando a interface informática MASCOT. As modificações pesquisadas encontram-se definidas no site da UNIMOD ([www.unimod.org](http://www.unimod.org)). As modificações apresentadas na tabela 4 foram pesquisadas independentemente e até 4 modificações por péptido. A identificação das modificações sofridas por cada uma das  $\alpha$ -amilases foi aceite com um grau de confiança de 90%.

**Tabela 4:** Lista das modificações oxidativas. (Fonte: www.unimod.org)

PSI-MS Name	Modificação	Descrição	$\Delta m$ (monoisotopic mass)
Arg->GluSA	Argglutamicsealde	Arginine oxidation to glutamic semialdehyde	-43.053.433
Pro->Pyrrolidinone	Pyrrolidinone	Proline oxidation to pyrrolidinone	-30.010.565
His->Asn	His2Asn	histidine oxidation to asparagine	-23.015.984
His->Asp	His2Asp	histidine oxidation to aspartic acid	-22.031.969
Lys->Allylsine	Lysaminoadipicsealde	Lysine oxidation to aminoadipic semialdehyde	-1.031.634
Trp->Kynurenin	kynurenin	tryptophan oxidation to kynurenin	3.994.915
Pro->pyro-Glu	Pyroglutamic	proline oxidation to pyroglutamic acid	13.979.265
Trp->Oxolactone	oxolactone	Tryptophan oxidation to oxolactone	13.979.265
Amino	aminotyrosine	Tyrosine oxidation to 2-aminotyrosine	15.010.899
Oxidation	Hydroxylation	Oxidation or Hydroxylation (Lys, Arg, Cys, Met, Tyr, His, Pro, Trp, Phe, Asp, Asn)	15.994.915
Trp->Hydroxykynurenin	hydroxykynurenin	tryptophan oxidation to hydroxykynurenin	19.989.829
Dioxidation	dihydroxy	dihydroxy	31.989.829
	Label:13C(1)2H(3)+Oxidation	Oxidised methionine 13C(1)2H(3) SILAC label	35.040.575
Nitro	Nitro	Oxidation to nitro	44.985.078
Trioxidation	Cysteic_acid	cysteine oxidation to cysteic acid	47.984.744
Delta:H(2)C(3)O(1)	MDA54	MDA adduct +54	54.010.565
	Carboxymethyl:13C(2)	Iodoacetic acid derivative w/ 13C label	60.012.189
Cys-> Oxoalanine	Oxoalanine	cysteine oxidation to oxoalanine	-17.992.806
Quinone	Quinone (Tyr)		29.974.179
Diamidated	Deamidation	Deamidation (Arg, Asn, Gln)	0,984016
Carbamyl	Carbamylation (Lys, Arg, Cys, Met)	Isocyanate reaction with amino groups	43.005.814
Pro-> Pyrrolidone	Pyrrolidone	Proline oxidation to pyrrolidone	-27.994.915
Lys-> Aminoadipic	aminoadipic	Lysine oxidation to $\alpha$ - aminoadipic acid	14.963.280



As modificações encontradas em todas as amostras oxidadas pesquisadas utilizando a base de dados da MASCOT para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* encontram-se representadas na tabela 1 em anexo.

Na figura 19 encontra-se a sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* onde se encontram assinaladas as diferentes modificações encontradas nesta proteína, utilizando as diferentes condições de stress oxidativo. Como se pode observar, a modificação mais frequente é a oxidação (n = 30) seguida da hidroxilação (n = 13), dioxidação (n = 11), formilquinurenina (n = 9), Aminotirosina (n = 6), Trp→Oxolactona (n = 5), Lys→Alisina (n = 3), Pro→Pirrolidona (n = 3), Pro→pyro-Glu (n = 3). As modificações menos frequentes são a hidroxiquinurenina (n = 2) e nitro (n = 1).

Na sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, assinalou-se as modificações sofridas para os diferentes períodos de incubação (0-4h) para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM e 1mM, como se pode observar na figura 20 e 21, respectivamente.

Pela análise da figura 20 podemos observar que ao fim de 30min de oxidação foram encontrados um maior número de resíduos oxidados para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM do que para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM. Na figura 21 podemos observar que o resíduo que se encontra na posição 39 da sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, aos 30min já está oxidado, enquanto para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM (figura 20) o primeiro resíduo oxidado encontra-se na posição 70 para o mesmo período de incubação. Na figura 21 observa-se que da posição 420 à 501 há um maior número de resíduos oxidados do que para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM para a mesma posição. Enquanto na figura 21, da posição 188 à 190 existem três resíduos oxidados para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM, na figura 20 para as mesmas posições não possui nenhum resíduo oxidado. Podemos observar ainda para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM possui um maior número de resíduos modificados do que para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM.

O número de resíduos oxidados está relacionado com a actividade enzimática. A tabela 5 a seguir apresentada possui os valores da % de actividade para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM e de 1mM bem como os respectivos resíduos oxidados ao longo dos diferentes períodos de incubação.

## Modificações

<span style="color: blue;">■</span> Aminotirosina	<span style="color: green;">■</span> Hidroxiquinurenina	<span style="color: teal;">■</span> Lys→Ácido aminoadípico	<span style="color: orange;">■</span> Pro→pyro-Glu
<span style="color: darkgreen;">■</span> Dioxidação	<span style="color: red;">■</span> Hidroxilação	<span style="color: magenta;">■</span> Oxidação	<span style="color: purple;">■</span> Pro→Pirrolidona
<span style="color: purple;">■</span> Formilquinurenina	<span style="color: cyan;">■</span> Lys→Alisina	<span style="color: brown;">■</span> Nitro	<span style="color: grey;">■</span> Quinona
			<span style="color: yellow;">■</span> Trp→Oxolactona

10 20 30 40 50 60  
 MIQKRKRTVS FRLVLMCTLL FVSLPITKTS AVNGTLMQYF EWYTPNDGQH WKRLQNDAEH  
 VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWK  
 VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWK

70 80 90 100 110 120  
 LSDIGITAVWIPPAYKGLSQ SDNGYGPYDL YDLGEFQQKG TVRTKYGTKS ELQDAIGSLH  
 LSDIGITAVWIPPAYK

130 140 150 160 170 180  
 SRNVQVYGDV VLNHKAGADA TEDVTAVEVN PANRNQETSE EYQIKAWTDF RFPGRGNTYS  
 AWTDFR  
 AGADATEDVTAVEVNPANR

190 200 210 220 230 240  
 DFKWHWYHFD GADWDES RKI SRIFKFRGEG KAWDWEVSSE NGNYDYLYMYA DVDYDHPDVV  
 WHWYHFDGADWDES RK  
 WHWYHFDGADWDES RK

250 260 270 280 290 300  
 AETKKGWGIWY ANELSLDGFR IDAAKHIFFS FLRDWVQAVR QATGKEMFTV AEYWQNNAGK  
 WGIWYANELSLDGFR DWVQAVR  
 WGIWYANELSDGFR DWVQAVR  
 WGIWYANELSDGFR FSFLRDWVQAVR  
 KWGIWYANELSDGFR

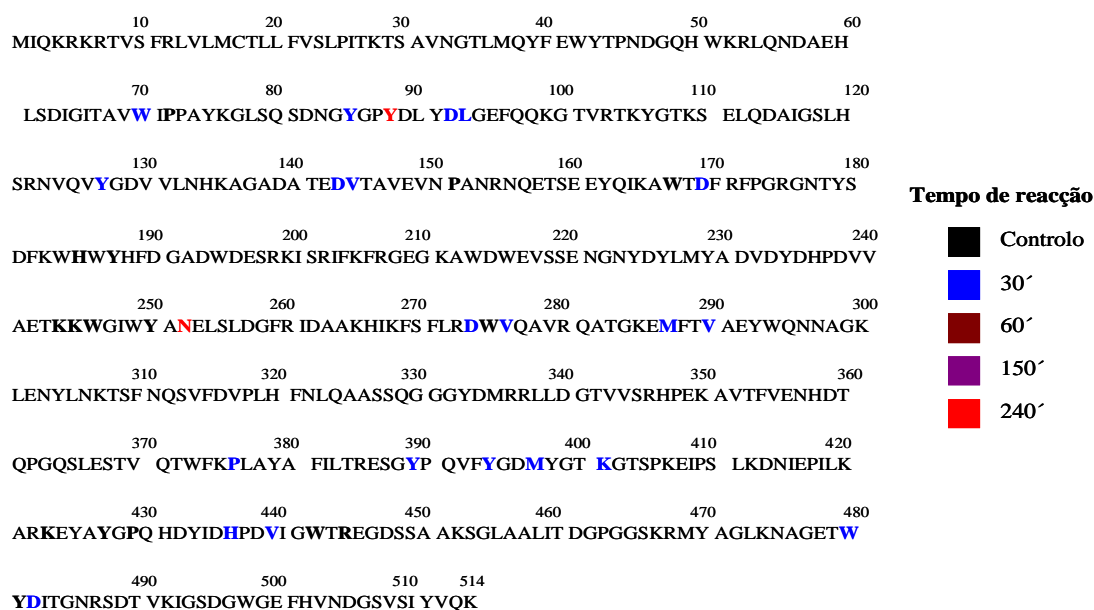
310 320 330 340 350 360  
 LENYLNKTSF NQSVFDVPLH FNLQAASSQG GGYDMRRLLD GTVVS RHPEK AVTFVENHDT

370 380 390 400 410 420  
 QPGQSLESTV QTWFKFLAYA FILTRESGYP QVFYGDMYGT KGTSPKEIPS LKDNIEPILK  
 PLAYAFILTR ESGYPQV FYGDMYGTK  
 ESGYPQV FYGDMYGTK

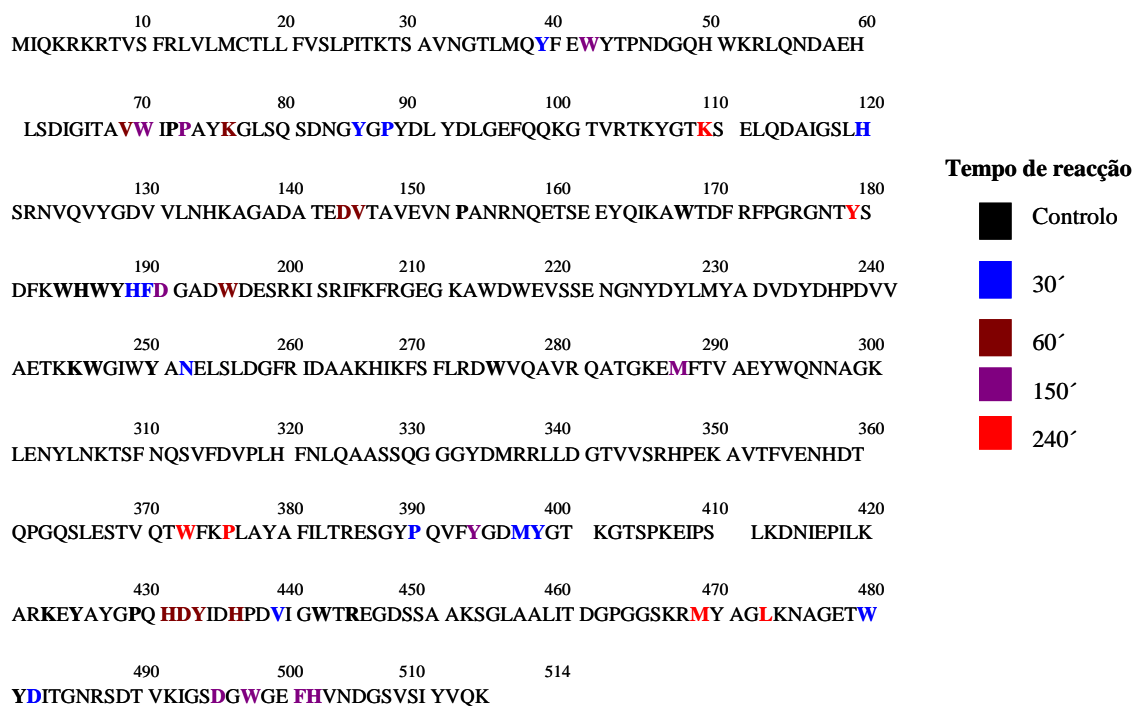
430 440 450 460 470 480  
 ARKEYAYGPQ HDYIDHPDVI GWTREGDSSA AKSGLAALIT DPGGSKRMY AGLKNAGETW  
 EYAYGPQHDYIDHPDVIGWTR NAGETW  
 KEYAYGPQHDYIDHPDVIGWTR NAGETW  
 NAGETW

490 500 510 514  
 YDITGNRS DT VKIGSDGWGE FHVNDGSVSI YVQK  
 YDIGNR  
 YDIGNR

**Figura 19:** Sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* com as modificações sofridas para os diferentes períodos de incubação (0-4h).



**Figura 20:** Resíduos modificados identificados na sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para os vários períodos de incubação em estudo (0-4h) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.

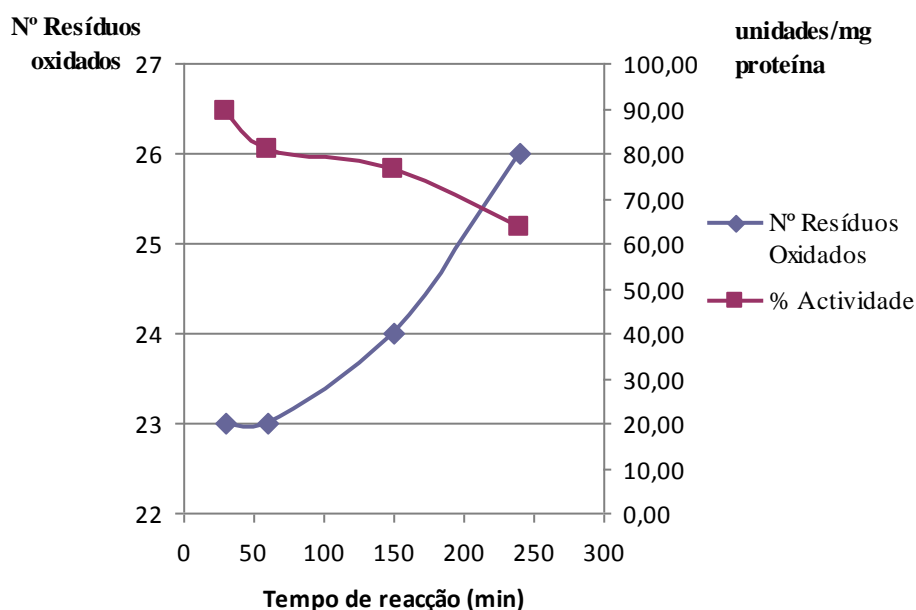


**Figura 21:** Resíduos modificados identificados na sequência da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para os vários períodos de incubação em estudo (0-4h) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

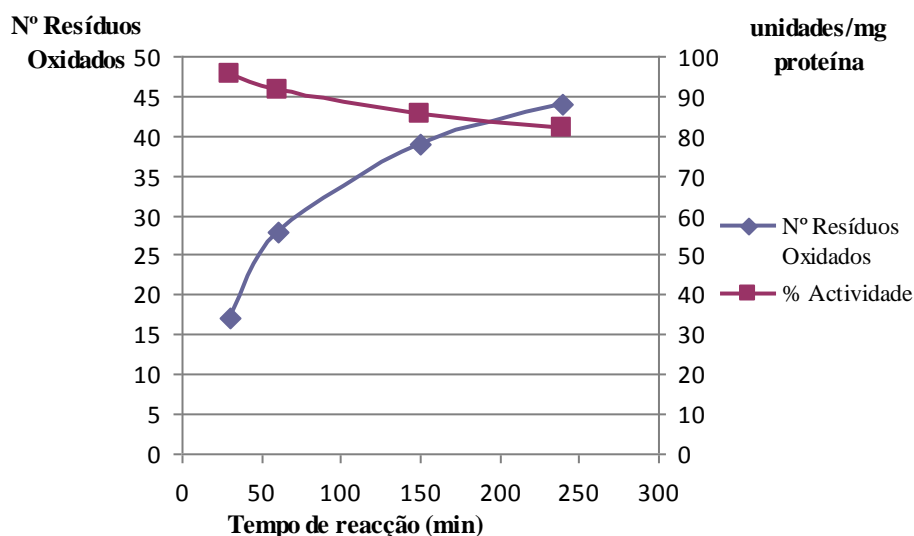
**Tabela 5:** Resumo do processo de oxidação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para os diferentes períodos de incubação e percentagem de actividade correspondente, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM.

Tempo de reacção (min)	10mM		1mM	
	Nº Resíduos Oxidados	% Actividade	Nº Resíduos Oxidados	% Actividade
30	23	89,3	17	95,6
60	23	81,0	28	91,6
150	24	76,5	39	85,4
240	26	63,6	44	81,8

As figuras 22 e 23 relacionam o número de resíduos oxidados com a % de actividade enzimática para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM, respectivamente.



**Figura 22:** Relação entre o número de resíduos oxidados e a % actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 23:** Relação entre o número de resíduos oxidados e a % actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

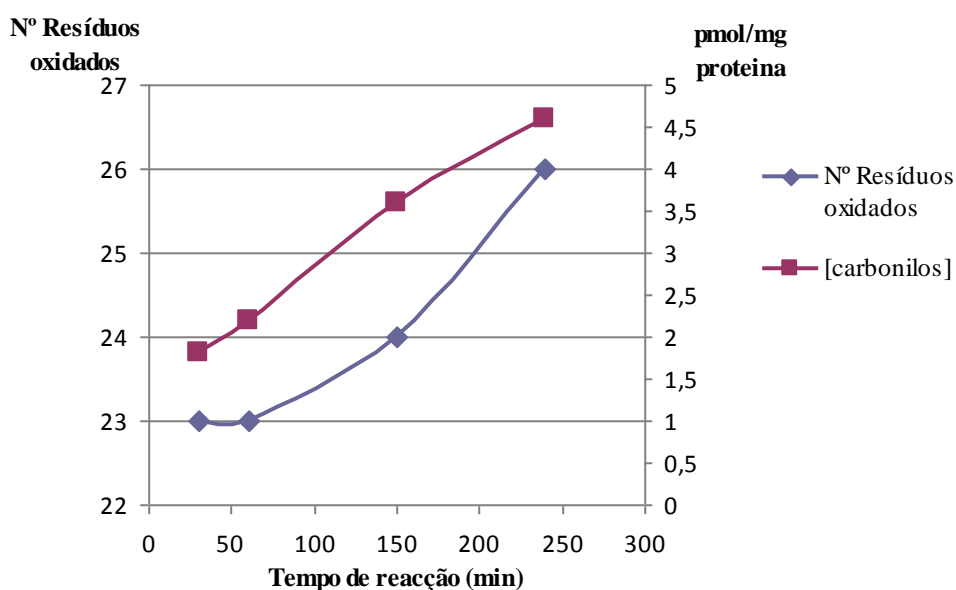
Da análise das figuras 22 e 23, podemos observar que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM há um aumento do número de resíduos oxidados de 17 para 44 enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM há um aumento do número de resíduos oxidados de 23 para 26. Como o aumento do número de resíduos oxidados é maior para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, a actividade enzimática diminui de 95,6% para 82%, enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM a actividade enzimática diminui de 89% para 64%. O aumento do número de resíduos oxidados está correlacionado com a diminuição da actividade enzimática. Quando se utilizou uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM pode observar-se um maior número de resíduos oxidados do que quando se utilizou uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM. Este facto vem reforçar a ideia de que a oxidação extensiva da proteína leva á sua precipitação inviabilizando a identificação dos resíduos oxidados.

O número de resíduos oxidados também pode ser relacionado com o conteúdo em grupos carbonilo. A tabela 6 a seguir representada possui os valores do conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados para os diferentes períodos de incubação, tanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM como para uma de 1mM.

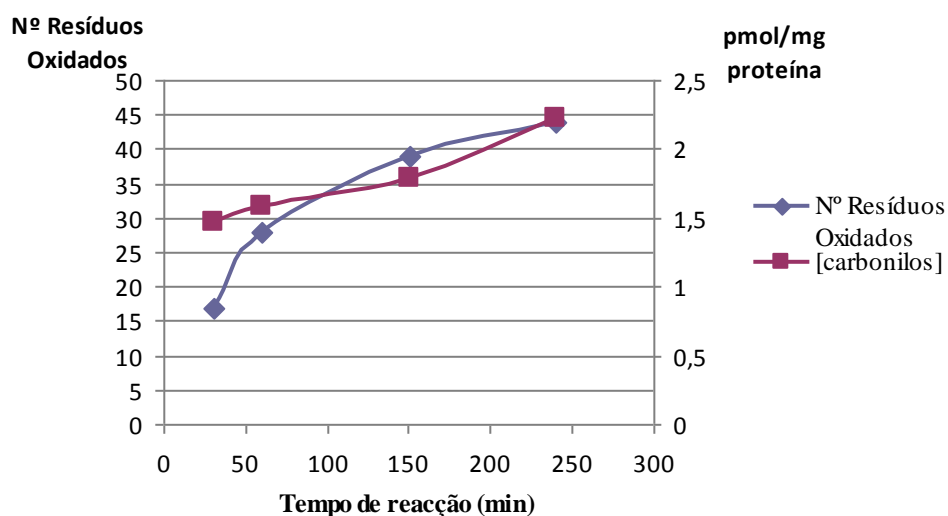
**Tabela 6:** Número de resíduos oxidados e respectiva concentração de grupos carbonilo para os diferentes períodos de incubação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM.

Tempo de reacção (min)	10 mM		1 mM	
	Nº Resíduos Oxidados	[carbonilos] (pmol/mg proteína)	Nº Resíduos Oxidados	[carbonilos] (pmol/mg proteína)
30	23	1,8	17	1,5
60	23	2,2	28	1,6
150	24	3,6	39	1,8
240	26	4,6	44	2,2

O gráfico representado na figura 24 e 25 relaciona o conteúdo em grupos carbonilo com o número de resíduos oxidados em função do tempo de reacção (min) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM, respectivamente.



**Figura 24:** Relação entre o número de resíduos oxidados e conteúdo em grupos carbonilo da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, em função dos diferentes períodos de incubação.



**Figura 25:** Relação entre o número de resíduos oxidados e conteúdo em grupos carbonilo da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, em função dos diferentes períodos de incubação.

Analisando as figuras 24 e 25 podemos observar que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM o conteúdo em grupos carbonilo é de 2,2pmol de ligações carboniladas por mg de proteína, enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM o conteúdo em grupos carbonilo é superior (4,6pmol de ligações carboniladas por mg de proteína). Apesar do conteúdo em grupos carbonilo ser superior para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, o número de resíduos oxidados encontrados é menor quando comparado com os existentes para uma concentração de 1mM.

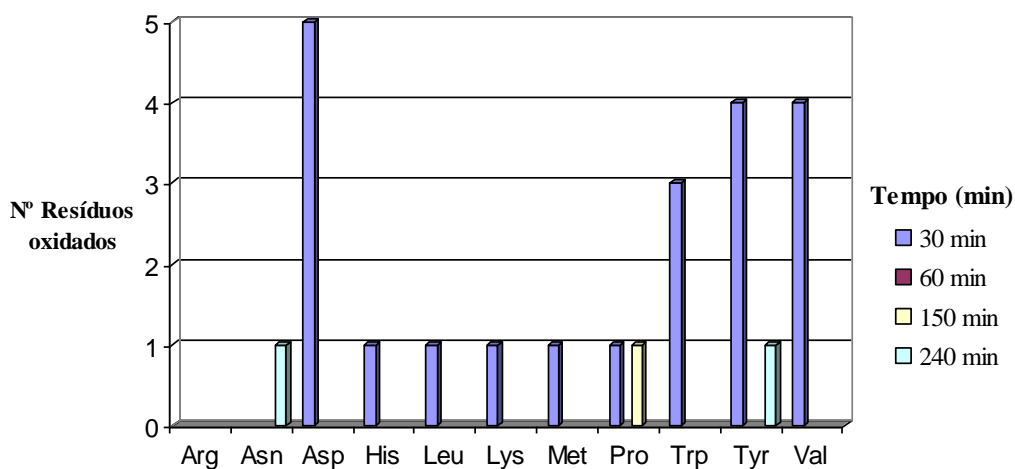
Outro factor a ter em conta na análise das modificações sofridas pela  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* é quais os resíduos oxidados para os diferentes períodos de incubação em estudo. A tabela a seguir representada possui os vários resíduos oxidados para cada período de incubação (0-4h) para as duas concentrações de  $H_2O_2$  em estudo (10mM e 1mM).

**Tabela 7:** Resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM e 1mM.

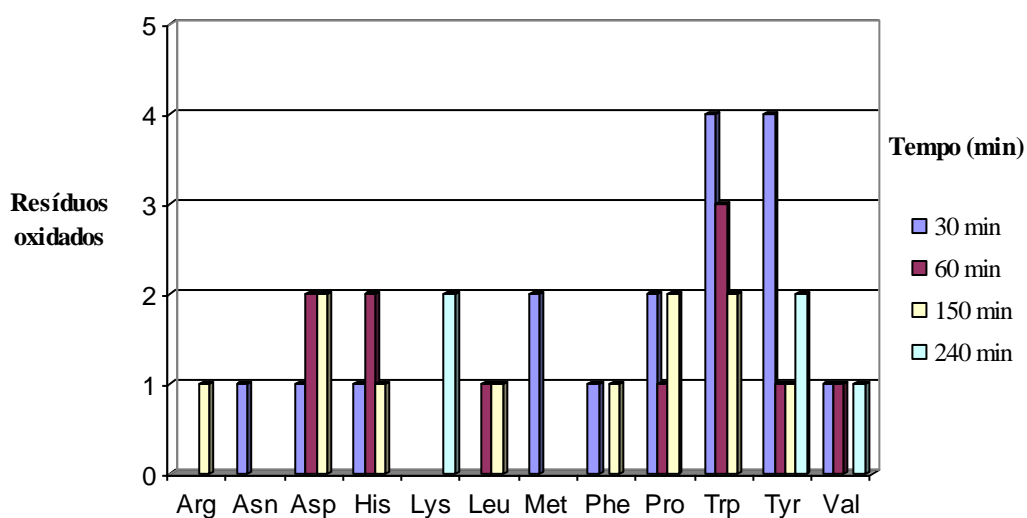
Tempo de reacção (min)	10 mM	1 mM
30 min	5 Asp 1 His 1 Leu 1 Lys 1 Met  1 Pro, 3 Trp 4 Tyr, 4 Val	1 Asp, 1 Asn, 1 His  2 Met 1 Phe 2 Pro, 4 Trp 4 Tyr, 1 Val
60 min		2 Asp 2 His 1 Leu 1 Pro, 3 Trp, 1 Tyr, 1 Val
150 min	1 Pro	1 Arg, 2 Asp 1 His 1 Leu 1 Phe 2 Pro, 2 Trp, 1 Tyr
240 min	1 Asn  1 Tyr	2 Lys 2 Tyr 1 Val



As figuras a seguir representadas mostram quais os resíduos modificados para cada período de incubação e para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM.



**Figura 26:** Resíduos oxidados para cada período de incubação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 27:** Resíduos oxidados para cada período de incubação da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

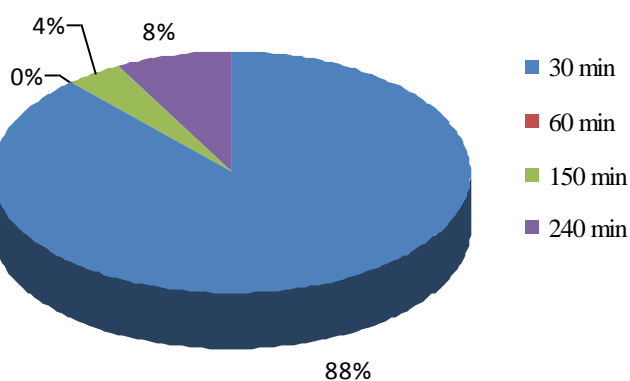
Analisando os dados representados nas figuras 26 e 27 podemos observar que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM os resíduos que se apresentam mais vezes oxidados são o Triptofano e a Tirosina para os diferentes períodos de incubação. Para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM os resíduos que se apresentam mais vezes oxidados são o Ácido Aspártico, a Tirosina, a Valina e o Triptofano, que surgem nos primeiros 30 minutos

de oxidação. De um modo geral, para uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1mM observa-se um maior número de resíduos oxidados ao longo dos diferentes períodos de incubação.

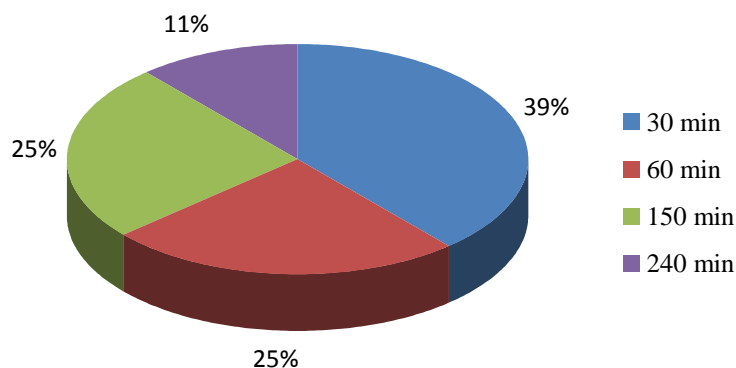
**Tabela 8:** Número de resíduos modificados correspondente a cada período de incubação para uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 10mM e 1mM para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Tempo de reacção (min)	Nº Resíduos Oxidados (10mM)	Nº Resíduos Oxidados (1mM)
30	23	17
60	0	11
150	1	11
240	2	5

As figuras a seguir representadas mostram a percentagem de resíduos oxidados com o decorrer do tempo da reacção para cada uma das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em estudo.



**Figura 28:** Percentagem de resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 10mM.



**Figura 29:** Percentagem de resíduos modificados para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

Pela análise da figura 27 podemos observar que aos 30 minutos há um maior número de resíduos oxidados (88%). Este valor de resíduos oxidados indica que a  $\alpha$ -amilase praticamente se oxidou totalmente ao fim de 30 minutos. No entanto, como estamos perante uma concentração do reagente de Fenton de 10mM seria de esperar que a proteína fosse sendo progressivamente oxidada, aumentando o número de resíduos oxidados ao longo do tempo sendo que no final de 4h de oxidação teríamos um maior número de resíduos oxidados. A não observação de resíduos oxidados adicionais após 30 minutos de oxidação pode ser indício de que quando a proteína tem muitos resíduos oxidados, fica insolúvel em solução aquosa e precipita. Desta forma, torna-se impossível a observação de oxidações adicionais com a metodologia utilizada.

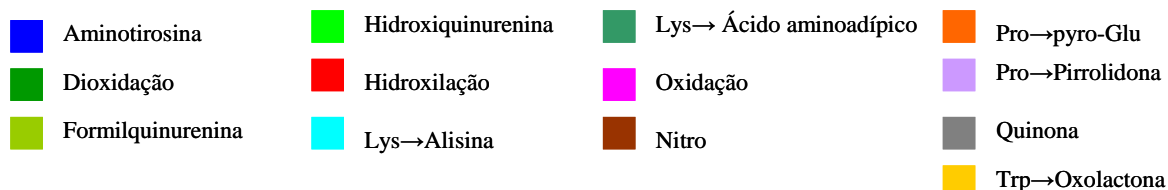
Analisando o gráfico representado na figura 29 (oxidação de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* com 1mM de  $H_2O_2$ ) podemos observar que ao fim de 30 minutos de oxidação há, comparativamente às condições de 10mM, uma menor percentagem de resíduos oxidados (39%). No período compreendido entre os 30 e 60 minutos e os 60 e 150 minutos, a percentagem de resíduos oxidados é igual (25%). Isto sugere uma diminuição da velocidade de oxidação que se confirma na análise de período de tempo seguinte em observação. De facto, após 4h de oxidação o número de resíduos oxidados é inferior (11%) ao número de resíduos oxidados quando comparado com os restantes períodos de incubação. No entanto, quando comparamos estes resultados com os resultados obtidos para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM, ao fim de 30 minutos 88% do

total dos resíduos já se encontravam oxidados. Duas situações podem ter ocorrido: a  $\alpha$ -amilase pode ter precipitado após um período de oxidação muito rápido (30 minutos) e daí não se conseguir observar modificações significativas para os restantes períodos de incubação; ou o processo oxidativo pode não ter evoluído da mesma forma do que quando se utilizou 1 mM de  $H_2O_2$ . Isto é, quando se utiliza uma concentração elevada de agente oxidante, vários locais são simultaneamente oxidados o que induz alterações conformacionais diferentes do que quando o processo de oxidação decorre mais lentamente. Para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui um maior número de modificações oxidativas ao fim de 30 minutos de incubação, o que sugere que a proteína oxida toda ao fim de 30 minutos de incubação.

Seguidamente apresentaremos os resultados obtidos da oxidação da  $\alpha$ -amilase salivar humana. As modificações encontradas em todas as amostras oxidadas, pesquisadas utilizando a base de dados da MASCOT para a  $\alpha$ -amilase salivar humana encontram-se na tabela 2 em anexo.

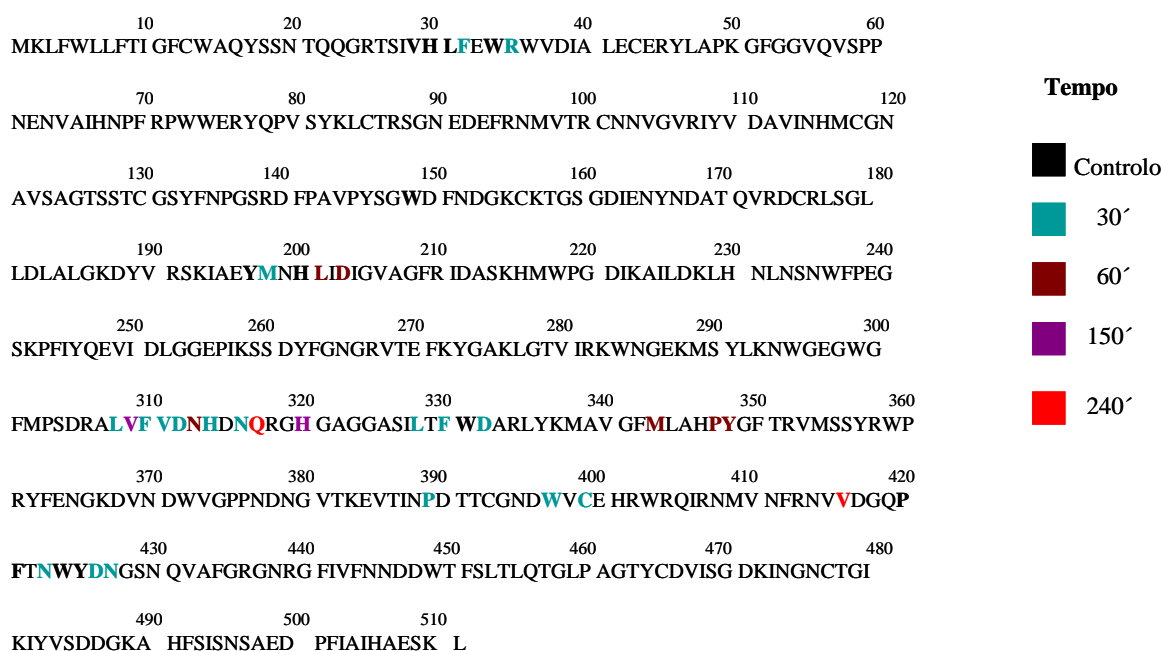
Na sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana representada na figura 30 encontram-se assinaladas as diferentes modificações sofridas por esta proteína ao longo da reacção de oxidação. Como se pode observar, à semelhança do que se observou para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, a modificação mais frequentemente observada é a oxidação (n = 29), seguida da hidroxilação (n = 13), dioxidação (n = 10), Trp→Oxolactona (n = 2).

### Modificações

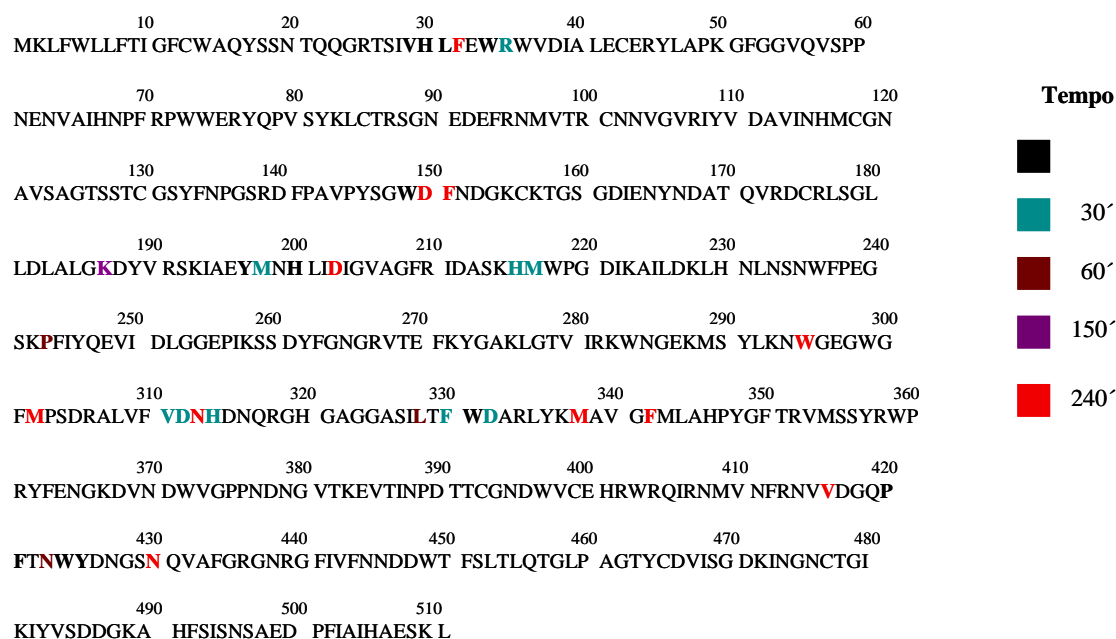


**Figura 30:** Sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana com as modificações sofridas com o decorrer dos diferentes períodos de incubação (0-4h).

Na sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana, assinalaram-se as modificações sofridas para os diferentes períodos de incubação (0-4h) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM, como se pode observar na figura 31 e 32, respectivamente.



**Figura 31:** Resíduos modificados identificados para os diferentes períodos de incubação (0-4h) da  $\alpha$ -amilase salivar humana, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 32:** Resíduos modificados identificados para os diferentes períodos de incubação (0-4h) da  $\alpha$ -amilase salivar humana, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

Analisando a sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana representada na figura 31 podemos observar que possui um maior número de resíduos modificados ao fim de 30 min de oxidação (19 resíduos modificados) enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM possui apenas 9 resíduos modificados ao fim de 30 min de oxidação, como se pode observar na figura 32. Tanto na figura 31 como na figura 32 pode-se observar que o processo de oxidação ocorre com maior intensidade na região perto do resíduo 310 e 330. Na sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana pode-se observar que tanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM como para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, da posição 60 à 120 não sofrem qualquer tipo de modificação oxidativa com o decorrer dos diferentes períodos de incubação. Outra das regiões na sequência da  $\alpha$ -amilase salivar humana que não sofre qualquer tipo de modificação quer para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM são os resíduos que se encontram na posição 431 até à 510. Enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, ao fim de 60min de oxidação, 6 resíduos encontram-se modificados, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, ao fim de 60min possui apenas 2 resíduos modificados nas posições 243 e 423. Tal como se observou no caso da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, ao fim de 4h de oxidação, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM existe um maior número de resíduos modificados quando comparados com o número de resíduos modificados para o mesmo período de incubação mas para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.

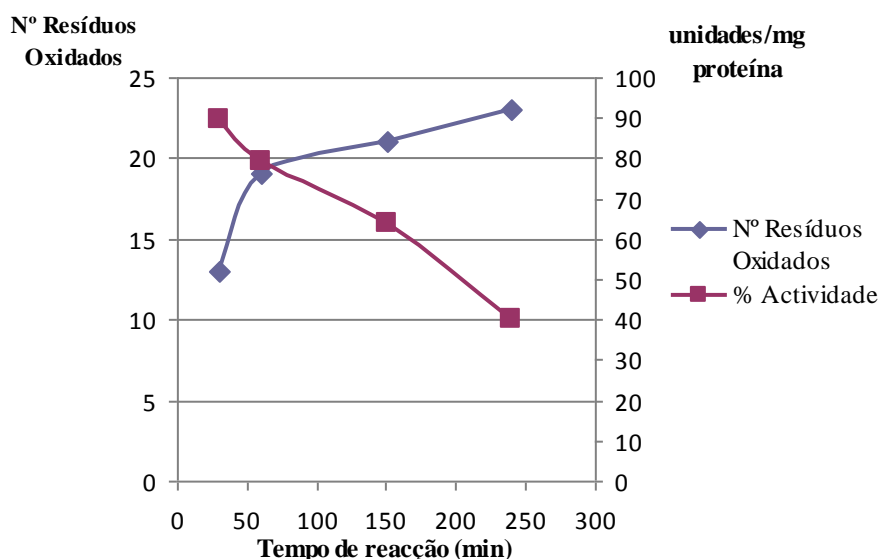
O número de resíduos oxidados ao longo dos diferentes períodos de incubação (0-4h) encontra-se relacionado com a actividade enzimática. A tabela 9 mostra os valores em percentagem da actividade enzimática e o respectivo número de resíduos oxidados para os diferentes períodos de incubação utilizando diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (10mM e 1mM).

**Tabela 9:** Resumo do processo de oxidação para os diferentes períodos de incubação e percentagem de actividade da  $\alpha$ -amilase salivar humana correspondente a uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.

Tempo de reacção (min)	10 mM		1 mM	
	Nº Resíduos Oxidados	% Actividade	Nº Resíduos Oxidados	% Actividade
30	13	89,4	11	99,1
60	19	79,1	13	95,1
150	21	64,1	14	88,5
240	23	40,3	26	80,9

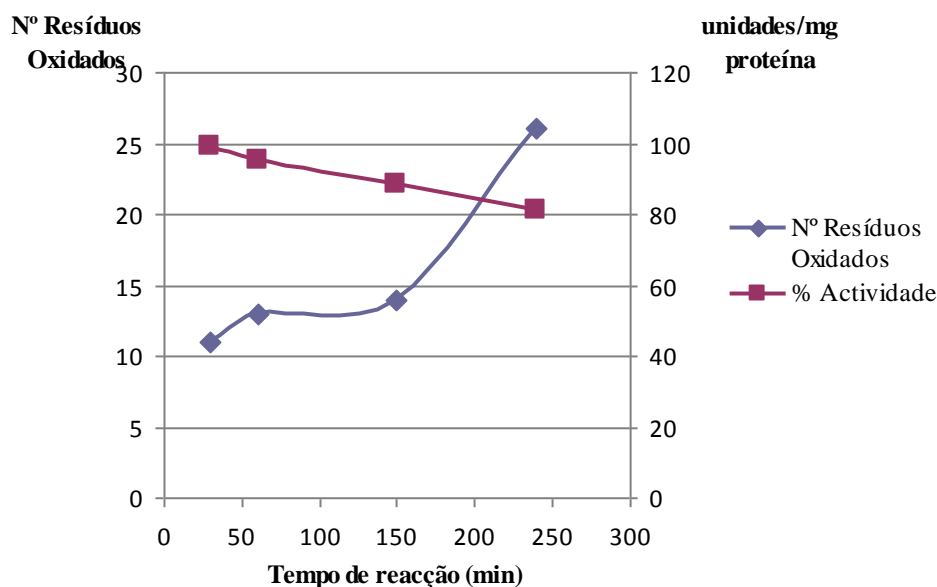
O número de resíduos modificados apresentados na tabela corresponde à soma dos resíduos modificados para cada período de incubação. Na tabela 9 também se encontram apresentados os valores de actividade enzimática para cada uma das concentrações de  $H_2O_2$  utilizadas, 10mM e 1mM.

As figuras 33 e 34 a seguir representadas relacionam o número de resíduos oxidados com a % de actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM, respectivamente.



**Figura 33:** Relação entre o número de resíduos oxidados e a % de actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.





**Figura 34:** Relação entre o número de resíduos oxidados e a % de actividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar humana em função dos diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

Pela análise da figura 34 podemos observar que inicialmente o número de resíduos oxidados aumenta rapidamente até aos 60min sendo que posteriormente o número de resíduos oxidados continua a aumentar mas já não de forma tão acentuada como ocorre inicialmente. Podemos observar, também que à medida que o número de resíduos oxidados aumenta com o decorrer da reacção a actividade enzimática diminui significativamente, atingindo um valor de 40% ao fim de 4h de incubação. Podemos observar na figura 33 que o número de resíduos oxidados aumenta de 13, aos 30min, para 23, ao fim de 4h de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM; enquanto na figura 34 pode-se observar que o número de resíduos oxidados apesar de ao fim de 30 min ser de apenas 11 aumenta mais no final de 4h de incubação (26 resíduos oxidados) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM. Enquanto para uma concentração de  $H_2O_2$  a percentagem de actividade enzimática diminui para 40% ao fim de 4h de incubação, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, a percentagem de actividade enzimática diminui muito menos (para 80%).

Quando comparamos os resultados obtidos da percentagem de actividade e do número de resíduos oxidados da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* com os resultados obtidos da  $\alpha$ -amilase salivar humana para a mesma concentração de  $H_2O_2$

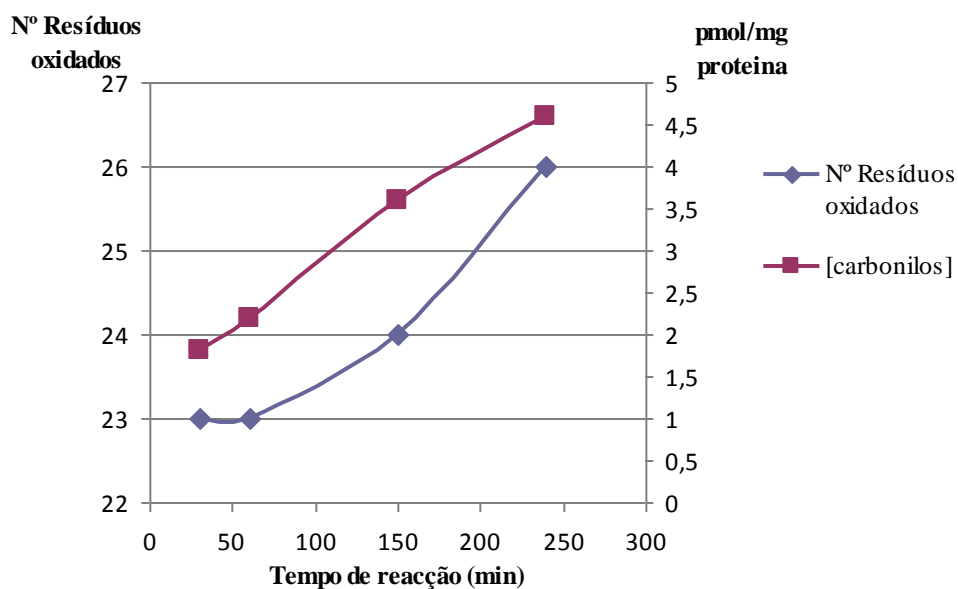
(10mM), podemos verificar que a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui um maior número de resíduos oxidados (26 resíduos oxidados ao fim de 4h de incubação) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (23 resíduos oxidados ao fim de 4h de incubação). A percentagem de actividade enzimática, para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, diminui para 63% ao fim de 4h de incubação enquanto a percentagem de actividade enzimática para a  $\alpha$ -amilase salivar humana apresenta uma maior diminuição (para 40% ao fim de 4h de incubação). Para a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui maior número de resíduos oxidados (44) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (26 resíduos modificados). A percentagem de diminuição da actividade enzimática para cada uma das  $\alpha$ -amilases é muito semelhante sendo que para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* a percentagem de actividade enzimática diminui de 96% para 82% enquanto para a  $\alpha$ -amilase salivar humana a percentagem de actividade enzimática diminui de 99% para 91%.

O número de resíduos oxidados também pode ser relacionado com o conteúdo em grupos carbonilo. A tabela 10 mostra os valores do conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados para os diferentes períodos de incubação, tanto para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM como para uma de 1mM.

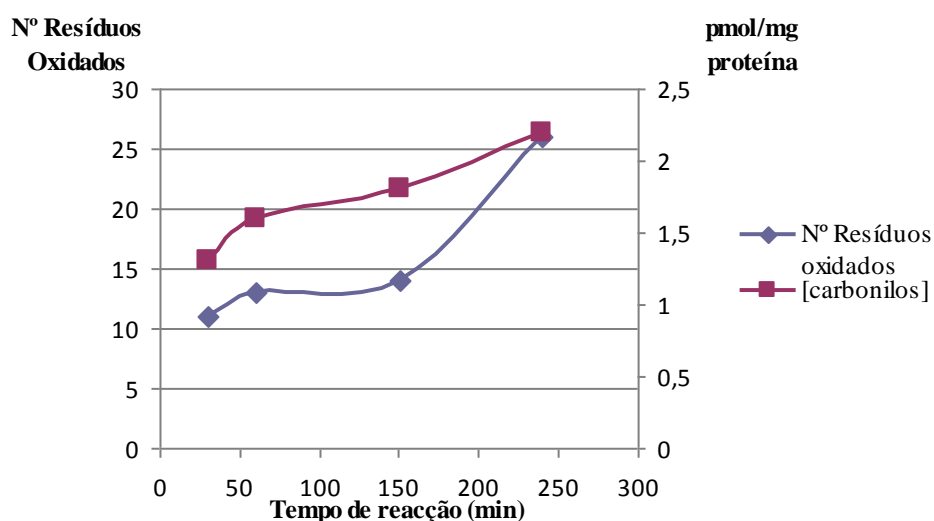
**Tabela 10:** Número de resíduos oxidados e respectiva concentração de grupos carbonilo da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação, para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM e 1mM.

Tempo de reacção (min)	10 mM		1 mM	
	Nº Resíduos Oxidados	[carbonilos] (pmol/mg proteína)	Nº Resíduos Oxidados	[carbonilo] (pmol/mg proteína)
30	13	1,5	11	1,3
60	19	1,7	13	1,6
150	21	2,9	14	1,8
240	23	4,0	26	2,2

O gráfico representado na figura 35 e 36 relaciona o conteúdo em grupos carbonilo com o número de resíduos oxidados em função do tempo de reacção (min) para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM, respectivamente.



**Figura 35:** Relação entre o conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados com o decorrer dos diferentes períodos de incubação da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 36:** Relação entre o conteúdo em grupos carbonilo e o número de resíduos oxidados com o decorrer dos diferentes períodos de incubação da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

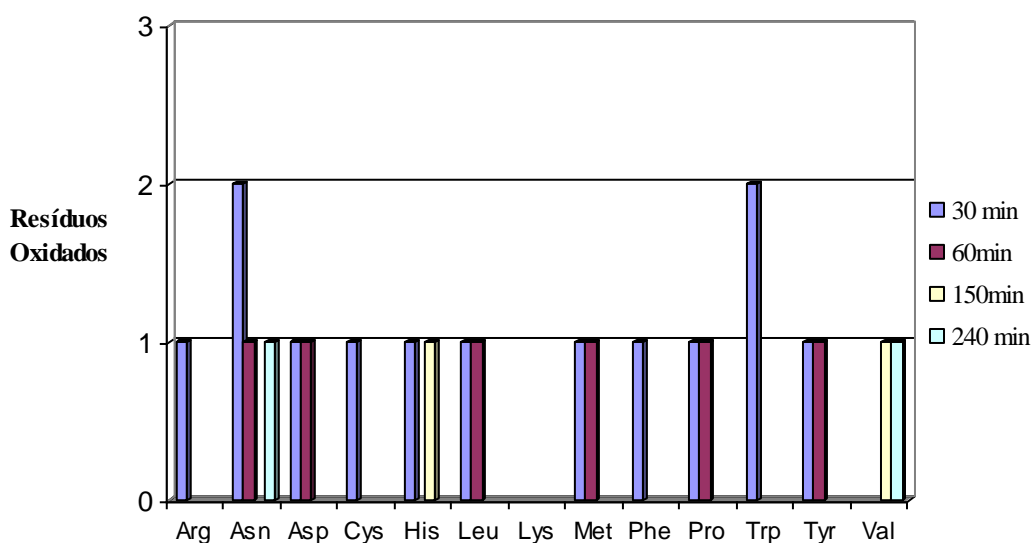
Analisando as figuras 35 e 36 podemos observar que para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM o conteúdo em grupos carbonilo é de 2,2pmol de ligações carboniladas por mg de proteína, enquanto para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM o conteúdo em grupos carbonilo é superior (4,0pmol de ligações carboniladas por mg de proteína). Apesar do conteúdo em grupos carbonilo ser superior para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM, o número de resíduos oxidados é baixo (23 resíduos oxidados ao fim de 4h de incubação) quando comparado com os existentes para uma concentração de 1mM (26 resíduos oxidados ao fim de 4h de incubação).

Relembrando os resultados obtidos para uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, do conteúdo em grupos carbonilo e comparando com o número de resíduos oxidados verificamos que para a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui menor número de resíduos oxidados sendo que o conteúdo em grupos carbonilo também é menor do que o conteúdo em grupos carbonilo para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ao fim de 4h de incubação, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui 4,6pmol de ligações carboniladas por mg de proteína enquanto para o mesmo período de incubação, a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui apenas 4,0pmol de ligações carboniladas por mg de proteína. Quando comparamos os resultados do conteúdo em grupos carbonilo com o número de resíduos oxidados para a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1mM, verificamos que apesar de a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possuir um maior número de resíduos oxidados (46) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (26), o conteúdo em grupos carbonilo é muito semelhante.

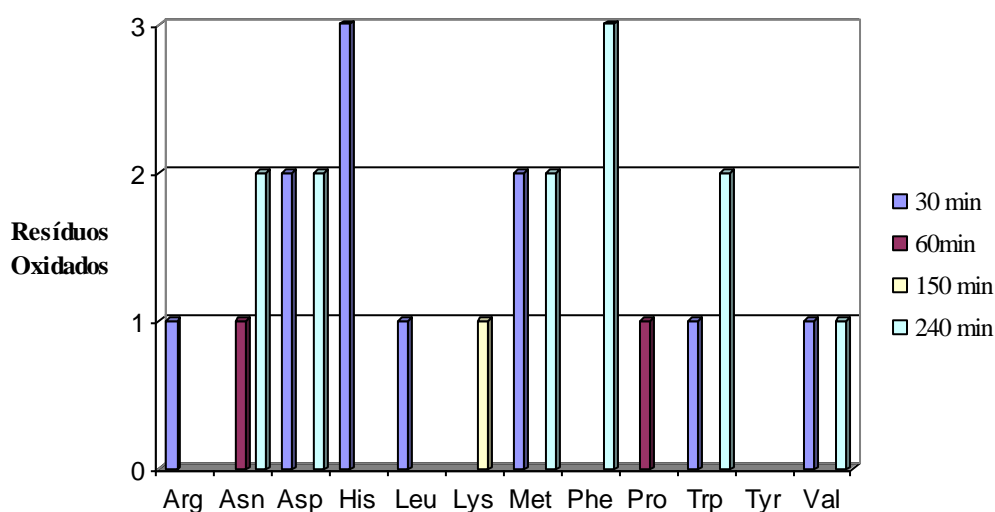
Outro dos factores a ter em conta na análise das modificações sofridas pela  $\alpha$ -amilase salivar humana é identificar quais os resíduos oxidados para os diferentes períodos de incubação em estudo. A tabela (Tabela 11) a seguir representada possui os vários resíduos oxidados para cada período de incubação (0-4h) para as duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em estudo (10mM e 1mM).

**Tabela 11:** Resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM.

<b>Tempo de reacção (min)</b>	<b>10 mM</b>	<b>1 mM</b>
30 min	1 Arg, 2 Asn, 1 His, 1 Leu 1 Met, 1 Phe, 1 Pro, 2 Trp 1 Tyr 1 Cys 1 Asp	1 Arg, 2 Asp, 3 His, 1 Leu, 2 Met, 1 Trp,  1 Val
60 min	1 Asn, 1 Asp, 1 Leu, 1 Met, 1 Pro, 1 Tyr,	1 Asn,   1 Pro
150 min	1 His,  1 Val	1 Lys
240 min	1 Asn,    1 Val	2 Asn 2 Asp 2 Met 3 Phe 2 Trp 1 Val



**Figura 37:** Resíduos oxidados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para cada período de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM.



**Figura 38:** Resíduos oxidados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para cada período de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM.

Analisando as figuras 37 e 38 podemos observar que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM possui 2 resíduos de Triptofano e 2 resíduos de Asparagina modificados ao fim de 30min de incubação enquanto para o mesmo período de incubação mas para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, possui 3 resíduos de Histidina, e 2 resíduos de Metionina. Para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, para um período de incubação de 30min a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui 1 resíduo de Cisteína e 1 resíduo de Histidina modificados

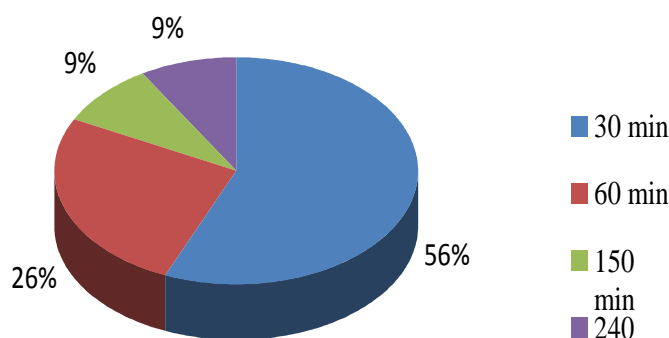
enquanto para o mesmo período de incubação mas para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM não possui nenhum resíduo de Cisteína modificado mas possui 3 resíduos de Histidina modificados. Ao fim de 60min de incubação, para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM possui menor número de resíduos modificados do que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM. Como se pode verificar, à semelhança dos resultados apresentados no caso da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, os resíduos mais facilmente oxidáveis são o Trp, a Phe e a Asp. De acordo com *Stadtman* (Stadtman 1997), os resíduos mais susceptíveis de sofrerem oxidação são os resíduos de aminoácidos que contém grupos sulfureto, como a cisteína e a metionina. Os resíduos constituídos por aminoácidos aromáticos são os alvos preferenciais do ataque oxidativo por ROS. Os resíduos constituídos por aminoácidos aromáticos mais susceptíveis de sofrer oxidação são o Triptofano e a Fenilalanina. Apesar de não se ter observado oxidação de resíduos de cisteína, os resultados observados, estão, de uma forma geral, de acordo com a susceptibilidade de oxidação descrita para os resíduos de aminoácidos.

A tabela (Tabela 12) apresenta o número de resíduos oxidados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM para os diferentes períodos de incubação.

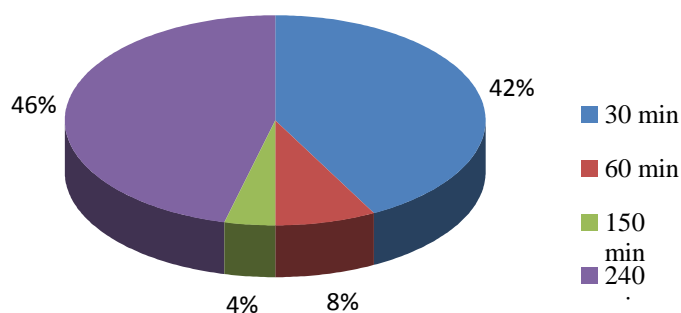
**Tabela 12:** Número de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana correspondente a cada período de incubação para uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM e 1mM.

Tempo de reacção (min)	Nº Resíduos Oxidados (10mM)	Nº Resíduos Oxidados (1mM)
30	13	11
60	6	2
150	2	1
240	2	12

As figuras 39 e 40 mostram a percentagem de resíduos oxidados, relativamente ao total de resíduos oxidados, com o decorrer do tempo da reacção para cada uma das concentrações de  $H_2O_2$  em estudo.



**Figura 39:** Percentagem de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM.



**Figura 40:** Percentagem de resíduos modificados da  $\alpha$ -amilase salivar humana para os diferentes períodos de incubação (30min-4h) para uma concentração do reagente de Fenton de 1mM.

Pela análise da figura 39 podemos observar que, quando se utiliza uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM, ao fim de 30 minutos de oxidação 56% dos resíduos já estão oxidados. Isto é, ao fim de 30 minutos há um maior número de resíduos oxidados quando comparado com os restantes períodos de incubação. No período correspondente entre 30 minutos e uma hora, 26% dos resíduos são oxidados. Para os restantes tempos de reacção a percentagem de resíduos oxidados é igual (9%). Analisando a figura 40 podemos observar que para uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, 42% do total resíduos oxidados, já sofreram modificações oxidativas ao fim de 30min. Ao fim de 60min apenas mais 8% dos resíduos são oxidados. Todavia, no período compreendido entre os 150 minutos e as 4h de oxidação 46% de



resíduos são oxidados. Confirma-se assim a existência de um período de tempo em que, após a oxidação inicial, a evolução do processo oxidativo é limitado.

Quando comparamos a oxidação das amilases em estudo utilizando 10 mM de  $H_2O_2$  podemos observar que ao fim de 30 minutos, no caso da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (figura 28) 88% (23) dos resíduos que são observados oxidados já se encontram modificados enquanto na  $\alpha$ -amilase salivar humana apenas 56 % (13) se encontram modificados. Isto significa que o processo oxidativo decorre mais rapidamente no caso da  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Quando se utiliza uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui uma maior percentagem de resíduos oxidados (42% - 11 resíduos) ao fim de 30 minutos quando comparado com a percentagem dos resíduos oxidados observados para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (39% - 17 resíduos). No entanto, ao fim de 60 minutos de oxidação a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui uma maior percentagem de resíduos oxidados (64% - 28 resíduos) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (50% - 13 resíduos). Esta observação sugere que o processo de oxidação na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* progride mais rapidamente do que na  $\alpha$ -amilase humana. Isto apesar de a actividade do *Bacillus amyloliquefaciens* se manter, em termos relativos, mais elevada.

Como já foi referido anteriormente, os resíduos mais susceptíveis de sofrerem oxidação são a Asparagina, a Cisteína, a Metionina, a Fenilalanina e o Triptofano. Quando comparamos a composição destes resíduos na estrutura de cada uma das  $\alpha$ -amilases, verificamos que a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui menos 5 resíduos de Asparagina do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana, que na totalidade possui 7 resíduos de Asparagina. Quanto ao número de resíduos de Triptofano, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui na sua composição um maior número de resíduos (12) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (5). Relativamente aos restantes resíduos de aminoácidos presentes, a Fenilalanina, a Histidina e a Metionina, a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui um maior número de resíduos de Fenilalanina, Histidina e Metionina do que a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Enquanto a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui 4 resíduos de Fenilalanina e 6 resíduos de Metionina, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui apenas 2 resíduos de Fenilalanina e 3 resíduos de Metionina. Quanto ao número de resíduos de Histidina a diferença entre as duas  $\alpha$ -amilases não é significativa, sendo que tanto a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* como a  $\alpha$ -amilase salivar humana possuem o mesmo número de resíduos de Histidina (5). A diferença mais significativa entre as duas

$\alpha$ -amilases reside no número de resíduos de Cisteína. A  $\alpha$ -amilase salivar humana possui um maior número de resíduos de Cisteína (11, 2,2%) do que a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, que possui apenas 1 (0,2%) resíduo de Cisteína. O número de resíduos oxidados nas duas  $\alpha$ -amilases quando se utiliza uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 10mM não é muito diferente (26 *Bacillus amyloliquefaciens*: 23 salivar humana). Convém recordar que as concentrações observadas de grupos carbonilos para ambas as  $\alpha$ -amilases é semelhante. Todavia quando se utiliza uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM o número de resíduos oxidados nas duas  $\alpha$ -amilases é significativamente diferente (44 *Bacillus amyloliquefaciens*: 26 salivar humana). Além do número de resíduos de cisteína, que é significativamente superior na  $\alpha$ -amilase salivar humana, não existem outras diferenças significativas que permitam justificar a diferença de resíduos oxidados observados. A única cisteína que é observada oxidada (30 minutos) encontra-se na posição 399. Esta oxidação pode justificar a perda mais rápida da actividade enzimática, observada no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. Todavia às 4 horas é observada a oxidação de um resíduo de ácido aspártico e de fenilalanina perto da cisteína presente na posição 156. Este facto poderá influenciar a estabilidade da proteína provocando a sua precipitação. Outra justificação possível para o número diferente de resíduos observados reside no facto de o processo oxidativo ser mais lento no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. Este facto pode ser justificado pela presença de inúmeras pontes dissulfureto nesta proteína, o que a torna mais compacta e portanto o acesso ao radical hidroxilo ao resíduo mais difícil. Assim, pode-se concluir que a  $\alpha$ -amilase salivar humana é mais susceptível à perda de actividade enzimática porque possui um maior número de pontes dissulfureto que ao oxidarem vão alterar a conformação da proteína. Como não existem estudos sobre a oxidação de  $\alpha$ -amilase, os resultados obtidos são discutidos tendo por base a oxidação de proteínas em geral.



## **VIII. Conclusão**

---



O objectivo da realização deste trabalho consistiu na identificação e caracterização das modificações oxidativas sofridas pela  $\alpha$ -amilase.

Relativamente à actividade enzimática, após sujeito a processo oxidativo, a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* sofre menor perda de actividade enzimática do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Quando se utiliza uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM observa-se uma maior diminuição da actividade enzimática para cada uma das  $\alpha$ -amilases quando comparado com uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM e 0,1mM.

Quanto ao conteúdo em grupos carbonilo, pode-se observar que tanto a oxidação da  $\alpha$ -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* como a oxidação  $\alpha$ -amilase salivar humana levam a um aumento significativo e semelhante dos grupos carbonilo. Tanto na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* como na  $\alpha$ -amilase salivar humana, existe uma maior produção de grupos carbonilo para uma concentração do reagente de Fenton de 10mM.

Quando comparamos os resultados das modificações sofridas por cada uma das  $\alpha$ -amilases verificamos que a  $\alpha$ -amilase salivar humana, quando sujeita a uma concentração de  $H_2O_2$  de 10mM possui um menor número de resíduos modificados (23) quando comparada com a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (26). Para uma concentração de reagente de  $H_2O_2$  de 1mM, a  $\alpha$ -amilase salivar humana apresenta também um menor número de resíduos oxidados (26) ao fim de 4 horas quando comparado o número dos resíduos oxidados observados para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (44). Todavia, em termos de percentagens de resíduos oxidados, relativamente ao número total de resíduos oxidados observados, a realidade é distinta. De facto, verifica-se que quando se sujeita as amostras a uma concentração superior de  $H_2O_2$ , a percentagem de resíduos oxidados aos 30 minutos de incubação é muito superior. Verifica-se ainda que utilizando uma concentração de 10mM de  $H_2O_2$ , a percentagem de resíduos oxidados de  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* é superior à observada para a  $\alpha$ -amilase salivar humana. Todavia, quando se utiliza uma concentração de  $H_2O_2$  de 1mM, a  $\alpha$ -amilase salivar humana possui uma maior percentagem de resíduos oxidados (42%) ao fim de 30 minutos quando comparado com a percentagem dos resíduos oxidados observados para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*, (39%). No entanto, ao fim de 60 minutos de oxidação a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* possui uma maior percentagem de resíduos oxidados (64%) do que a  $\alpha$ -amilase salivar humana (50%). Esta observação sugere que o

processo de oxidação na  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* progride mais rapidamente do que na  $\alpha$ -amilase humana. Isto apesar de a actividade do *Bacillus amyloliquefaciens* se manter, em termos relativos, mais elevada.

O número de resíduos de cisteína é significativamente superior na  $\alpha$ -amilase salivar humana, não existindo outras diferenças significativas que permitam justificar a diferença de resíduos oxidados observados. A observação da oxidação da cisteína na posição 399 aos 30 minutos pode justificar a perda mais rápida da actividade enzimática, observada no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. Outra justificação possível para o número diferente de resíduos observados reside no facto de o processo oxidativo ser mais lento no caso da  $\alpha$ -amilase salivar humana. Este facto pode ser justificado pela presença de inúmeras pontes dissulfureto nesta proteína, o que a torna mais compacta e portanto o acesso do radical hidroxilo aos resíduos é mais difícil. É importante notar que estes resíduos de cisteína se verificaram ser, em grande medida, resistentes ao processo oxidativo.

## **IX. Referências bibliográficas**

---





- Aebersold, R. and D. R. Goodlett (2001). "Mass spectrometry in proteomics." *Chem Rev* **101**(2): 269-95.
- Aebersold, R. and M. Mann (2003). "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature* **422**(6928): 198-207.
- Aghajari, N., G. Feller, et al. (1998). "Structures of the psychrophilic *Alteromonas haloplanctis* alpha-amylase give insights into cold adaptation at a molecular level." *Structure* **6**(12): 1503-16.
- Alam, Z. I., S. E. Daniel, et al. (1997). "A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease." *J Neurochem* **69**(3): 1326-9.
- Alam, Z. I., B. Halliwell, et al. (2000). "No evidence for increased oxidative damage to lipids, proteins, or DNA in Huntington's disease." *J Neurochem* **75**(2): 840-6.
- Amici, A., R. L. Levine, et al. (1989). "Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions." *J Biol Chem* **264**(6): 3341-6.
- Anderson, N. G. and N. L. Anderson (1996). "Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future." *Electrophoresis* **17**(3): 443-53.
- Ann Westman-Brinkmalm, G. B. (2008). "A Mass Spectrometer's Building Blocks. Mass Spectrometry. J. S. A. W.-B. A. K. Rolf Ekman." 15-87.
- Armstrong, R. C. and A. J. Swallow (1969). "Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan." *Radiat Res* **40**(3): 563-79.
- Barelli, S. C., Giorgia; Thadikkaran, Lynne; Crettaz, David; Quadroni, Manfredo; Rossier, Joël S.; Tissot, Jean-Daniel and Lion, Niels (2008). "Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics." *Proteomics Clin. Appl.* **2**: 142-157.
- Barja, G. and A. Herrero (2000). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals." *FASEB J* **14**(2): 312-8.
- Baron, C. P., H. H. Refsgaard, et al. (2006). "Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction--effect of EDTA, tert-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran." *Free Radic Res* **40**(4): 409-17.
- Beal, M. F. (2002). "Oxidatively modified proteins in aging and disease." *Free Radic Biol Med* **32**(9): 797-803.
- Berlett, B. S., B. Friguet, et al. (1996). "Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 1776-80.
- Berlett, B. S. and E. R. Stadtman (1997). "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *J Biol Chem* **272**(33): 20313-6.
- Berndt, P., U. Hohohm, et al. (1999). "Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints." *Electrophoresis* **20**(18): 3521-6.
- Betteridge, D. J. (2000). "What is oxidative stress?" *Metabolism* **49**(2 Suppl 1): 3-8.
- Boel, E., L. Brady, et al. (1990). "Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*." *Biochemistry* **29**(26): 6244-9.
- Bogdanov, M. B., O. A. Andreassen, et al. (2001). "Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease." *J Neurochem* **79**(6): 1246-9.
- Bohring, C. and W. Krause (1999). "The characterization of human spermatozoa membrane proteins--surface antigens and immunological infertility." *Electrophoresis* **20**(4-5): 971-6.
- Brzozowski, A. M., D. M. Lawson, et al. (2000). "Structural analysis of a chimeric bacterial alpha-amylase. High-resolution analysis of native and ligand complexes." *Biochemistry* **39**(31): 9099-107.
- Burley, S. K., S. C. Almo, et al. (1999). "Structural genomics: beyond the human genome project." *Nat Genet* **23**(2): 151-7.
- Buss, H., T. P. Chan, et al. (1997). "Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method." *Free Radic Biol Med* **23**(3): 361-6.
- Byung Pal Yu, H. Y. C. (2006). "Adaptative mechanisms to oxidative stress during aging." *Mechanisms of Ageing and Development* **127**: 436-443.
- Cadenas, E. and K. J. Davies (2000). "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging." *Free Radic Biol Med* **29**(3-4): 222-30.
- Cao, H., R. L. Baldini, et al. (2001). "Common mechanisms for pathogens of plants and animals." *Annu Rev Phytopathol* **39**: 259-84.
- Chatman, K., T. Hollenbeck, et al. (1999). "Nanoelectrospray mass spectrometry and precursor ion monitoring for quantitative steroid analysis and attomole sensitivity." *Anal Chem* **71**(13): 2358-63.
- Chen, C.-H. W. (2008). "Review of a current role of mass spectrometry for proteome research." *Analytica Chimica Acta* **624**: 16-36.

- Chernushevich, I. V., A. V. Loboda, et al. (2001). "An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry." *J Mass Spectrom* **36**(8): 849-65.
- Chevion, M., E. Berenshtein, et al. (2000). "Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage." *Free Radic Res* **33 Suppl**: S99-108.
- Christian Schöneich, V. S. S. (2006). "Mass spectrometry of protein modifications by reactive oxygen and nitrogen species." *Free Radical Biology & Medicine* **41**: 1507-1520.
- Creasy, D. M. and J. S. Cottrell (2004). "Unimod: Protein modifications for mass spectrometry." *Proteomics* **4**(6): 1534-6.
- Creeth, J. M., B. Cooper, et al. (1983). "Studies of the limited degradation of mucus glycoproteins. The effect of dilute hydrogen peroxide." *Biochem J* **211**(2): 323-32.
- Das, S. K. (2003). "Harmful health effects of cigarette smoking." *Mol Cell Biochem* **253**(1-2): 159-65.
- Daubner, S. C., P. J. Hillas, et al. (1997). "Expression and characterization of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase." *Arch Biochem Biophys* **348**(2): 295-302.
- Dauter, Z., M. Dauter, et al. (1999). "X-ray structure of Novamyl, the five-domain "maltogenic" alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7Å resolution." *Biochemistry* **38**(26): 8385-92.
- Davies, K. J. (2000). "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems." *IUBMB Life* **50**(4-5): 279-89.
- Dreisewerd, K. (2003). "The desorption process in MALDI." *Chem Rev* **103**(2): 395-426.
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A. (2009). "Mass Spectrometry - Instrumentation, Interpretation and Applications." *John Wiley & Sons, Inc.*
- Emes, A. V., A. L. Latner, et al. (1975). "Electrofocusing followed by gradient electrophoresis: a two-dimensional polyacrylamide gel technique for the separation of proteins and its application to the immunoglobulins." *Clin Chim Acta* **64**(1): 69-78.
- Feng, X., X. Liu, et al. (2008). "Mass spectrometry in systems biology: an overview." *Mass Spectrom Rev* **27**(6): 635-60.
- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." *Science* **246**(4926): 64-71.
- Fenton, H. J. H. (1893). *J. Chem. Soc. Proc.* **10**: 157-158.
- Ferrante, R. J., S. E. Browne, et al. (1997). "Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurochem* **69**(5): 2064-74.
- Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-47.
- Finley, E. L., J. Dillon, et al. (1998). "Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin." *Protein Sci* **7**(11): 2391-7.
- Fisher, S. Z., L. Govindasamy, et al. (2006). "Structure of human salivary alpha-amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**(Pt 2): 88-93.
- Fitter, J. (2005). "Structural and dynamical features contributing to thermostability in alpha-amylases." *Cell Mol Life Sci* **62**(17): 1925-37.
- Fitzpatrick, P. F. (2003). "Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation." *Biochemistry* **42**(48): 14083-91.
- Gallego, S. e. a. (1996). *Plant Sci.* **121**: 151-159.
- Garfin, D. E. (2003). "Two-dimensional gel electrophoresis: an overview." *Trends Anal Chem* **22**: 263-272.
- Garrison, W. M. (1987). "Reaction mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides and proteins." *Chem Rev* **87**: 381-398.
- Ghezzi, P. and V. Bonetto (2003). "Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins." *Proteomics* **3**(7): 1145-53.
- Glish, G. L., McLuckey, S.A., McBay, E.H. and Bertram, L.K. (1986). *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **70**.
- Gomez, A. a. T., K. (1994). *Phys. Fluids* **6**.
- Gong, M. e. a. (2001). *J. Plant Physiol.* **158**: 1125-1130.
- Gorg, A., C. Obermaier, et al. (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." *Electrophoresis* **21**(6): 1037-53.
- Govorun, V. M. and A. I. Archakov (2002). "Proteomic technologies in modern biomedical science." *Biochemistry (Mosc)* **67**(10): 1109-23.
- Griffiths, I. W. (1997). "J. J. Thomson - the centenary of his discovery of the electron and his invention of mass spectrometry." *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**: 2-16.

- Griffiths, W. J., A. P. Jonsson, et al. (2001). "Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry." Biochem J **355**(Pt 3): 545-61.
- Grossman, A. and H. Takahashi (2001). "Macronutrient Utilization by Photosynthetic Eukaryotes and the Fabric of Interactions." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**: 163-210.
- Grune, T., T. Jung, et al. (2004). "Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggresomes' during oxidative stress, aging, and disease." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2519-30.
- Guilhaus, M., D. Selby, et al. (2000). "Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry." Mass Spectrom Rev **19**(2): 65-107.
- H. Deutsch, K. B., S. Matt, and T. D. Mark (2000). "Theoretical determination of absolute electron-impact ionization cross sections of molecules." Int. J. Mass Spectrom. **197**: 37-69.
- Hagerman, H. M. A. a. A. E. (2006). "Oxidative Stress, Exercise and Aging." 1-184.
- Halliwell, B. (1996). "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans." Free Radic Res **25**(1): 57-74.
- Halliwell, B. (2007). "Biochemistry of oxidative stress." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1147-50.
- Hensley, K., N. Hall, et al. (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." J Neurochem **65**(5): 2146-56.
- Henzel, W. J., T. M. Billeci, et al. (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5011-5.
- Hoffmann, E. d., Stroobant, V. (2007). "Mass Spectrometry - Principles and Applications 3rd ed, Wiley."
- Hu, Q., R. J. Noll, et al. (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." J Mass Spectrom **40**(4): 430-43.
- Isabella Dalle-Donne, R. R., Daniela Giustarini, Aldo Milzani, Roberto Colombo (2003). "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress." Clinica Chimica Acta **329**: 23-38.
- Jensen, O. N. (2006). "Interpreting the protein language using proteomics." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(6): 391-403.
- Jensen, O. N., P. Mortensen, et al. (1997). "Automation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using fuzzy logic feedback control." Anal Chem **69**(9): 1706-14.
- Jonsson, A. P. (2001). "Mass spectrometry for protein and peptide characterisation." Cellular and Molecular Life Sciences **58**: 868-884.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.
- Karpe, F. and A. Hamsten (1994). "Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE." J Lipid Res **35**(7): 1311-7.
- Keller, R. J., N. C. Halmes, et al. (1993). "Immunochemical detection of oxidized proteins." Chem Res Toxicol **6**(4): 430-3.
- Kikugawa, K., T. Kato, et al. (1994). "Damage of amino acids and proteins induced by nitrogen dioxide, a free radical toxin, in air." Free Radic Biol Med **16**(3): 373-82.
- Kim, J. G., F. Sabbagh, et al. (1997). "Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide-modified proteins." Free Radic Biol Med **23**(2): 251-9.
- Kleiner, I. C. G. a. O. (2005). "Application of Mass Spectrometry in Proteomics." Bioscience Reports **Vol. 25**(Nos. 1/2): 71-93.
- Knochenmuss, R. (2002). "A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization." J Mass Spectrom **37**(8): 867-77.
- Knochenmuss, R. (2003). "A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation." Anal Chem **75**(10): 2199-207.
- Knochenmuss, R. and R. Zenobi (2003). "MALDI ionization: the role of in-plume processes." Chem Rev **103**(2): 441-52.
- Koufen, P., A. Ruck, et al. (1999). "Free radical-induced inactivation of creatine kinase: influence on the octameric and dimeric states of the mitochondrial enzyme (Mib-CK)." Biochem J **344 Pt 2**: 413-7.
- Lee, S. (2005). "Modern Mass Spectrometry." MacMillan Group Meeting
- Leeuwenburgh, C., P. Wagner, et al. (1997). "Caloric restriction attenuates dityrosine cross-linking of cardiac and skeletal muscle proteins in aging mice." Arch Biochem Biophys **346**(1): 74-80.
- Lenz, A. G., U. Costabel, et al. (1989). "Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride." Anal Biochem **177**(2): 419-25.
- Levine, R. L., D. Garland, et al. (1990). "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." Methods Enzymol **186**: 464-78.

- Levine, R. L., J. A. Williams, et al. (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." *Methods Enzymol* **233**: 346-57.
- Lim, M. S. and K. S. Elenitoba-Johnson (2004). "Proteomics in pathology research." *Lab Invest* **84**(10): 1227-44.
- Linden, A. and M. Wilmanns (2004). "Adaptation of class-13 alpha-amylases to diverse living conditions." *ChemBiochem* **5**(2): 231-9.
- Lindner, H. and W. Helliger (2001). "Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins." *Exp Gerontol* **36**(9): 1551-63.
- Link, A. J. (2002). "Multidimensional peptide separations in proteomics." *Trends Biotechnol* **20**(12 Suppl): S8-13.
- Loo, J. A. and H. Muenster (1999). "Magnetic sector-ion trap mass spectrometry with electrospray ionization for high sensitivity peptide sequencing." *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**(1): 54-60.
- Lyras, L., P. J. Evans, et al. (1996). "Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue." *Free Radic Res* **24**(5): 397-406.
- Lyras, L., R. H. Perry, et al. (1998). "Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies." *J Neurochem* **71**(1): 302-12.
- MacGregor, E. A., S. Janecek, et al. (2001). "Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes." *Biochim Biophys Acta* **1546**(1): 1-20.
- Machius, M., G. Wiegand, et al. (1995). "Crystal structure of calcium-depleted Bacillus licheniformis alpha-amylase at 2.2 Å resolution." *J Mol Biol* **246**(4): 545-59.
- Makarov, A. (2000). "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis." *Anal Chem* **72**(6): 1156-62.
- Mann, M., S. E. Ong, et al. (2002). "Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome." *Trends Biotechnol* **20**(6): 261-8.
- Marabottini, R., C. Schraml, et al. (2001). "Foliar antioxidant status of adult Mediterranean oak species (*Quercus ilex* L. and *Q. pubescens* Willd.) exposed to permanent CO<sub>2</sub>-enrichment and to seasonal water stress." *Environ Pollut* **115**(3): 413-23.
- Marnett, L. J. (1999). "Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde." *Mutat Res* **424**(1-2): 83-95.
- Marshall, A. G. (2000). "Milestones in Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Technique Development." *Int. J. Mass Spectrom.* **200**: 331-356.
- Masaki, H., T. Atsumi, et al. (1995). "Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation." *Biochem Biophys Res Commun* **206**(2): 474-9.
- Maskos, Z., J. D. Rush, et al. (1992). "The hydroxylation of tryptophan." *Arch Biochem Biophys* **296**(2): 514-20.
- McDonough, J. L., I. Neverova, et al. (2002). "Proteomic analysis of human biopsy samples by single two-dimensional electrophoresis: Coomassie, silver, mass spectrometry, and Western blotting." *Proteomics* **2**(8): 978-87.
- Migliore, L. and F. Coppede (2009). "Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging." *Mutat Res* **674**(1-2): 73-84.
- Mora, J. F., G. J. Van Berkel, et al. (2000). "Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry." *J Mass Spectrom* **35**(8): 939-52.
- Moran, G. R., S. C. Daubner, et al. (1998). "Expression and characterization of the catalytic core of tryptophan hydroxylase." *J Biol Chem* **273**(20): 12259-66.
- Munson, B. (2000). "Development of chemical ionization mass spectrometry." *Int. J. Mass Spectrom.* **200**: 243-251.
- Nandakumar, M. P. and M. R. Marten (2002). "Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins." *Electrophoresis* **23**(14): 2216-22.
- Nielsen, J. E. and T. V. Borchert (2000). "Protein engineering of bacterial alpha-amylases." *Biochim Biophys Acta* **1543**(2): 253-274.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins." *J Biol Chem* **250**(10): 4007-21.
- Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." *Nature* **405**(6788): 837-46.
- Pappin, D. J., P. Hojrup, et al. (1993). "Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting." *Curr Biol* **3**(6): 327-32.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, et al. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis* **20**(18): 3551-67.

- Person, M. D., T. J. Monks, et al. (2003). "An integrated approach to identifying chemically induced posttranslational modifications using comparative MALDI-MS and targeted HPLC-ESI-MS/MS." *Chem Res Toxicol* **16**(5): 598-608.
- Pham-Huy, L., H. He, et al. (2008). "Free radicals, Antioxidants in Disease and Health." *Int J Biomed Sci* **4**: 89-96.
- Pignatelli, B., C. Q. Li, et al. (2001). "Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients." *Cancer Res* **61**(2): 778-84.
- Pramanik, B. N., P. L. Bartner, et al. (1998). "Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: an emerging technology." *J Mass Spectrom* **33**(10): 911-20.
- Prasad, T. K., M. D. Anderson, et al. (1994). "Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide." *Plant Cell* **6**(1): 65-74.
- Pryor, W. A. and J. P. Stanley (1975). "Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation." *J Org Chem* **40**(24): 3615-7.
- Pujadas, G. and J. Palau (2001). "Evolution of alpha-amylases: architectural features and key residues in the stabilization of the (beta/alpha)(8) scaffold." *Mol Biol Evol* **18**(1): 38-54.
- Qian, M., R. Haser, et al. (1994). "The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-A resolution." *Biochemistry* **33**(20): 6284-94.
- Qin, W., J. B. Smith, et al. (1992). "Rates of carbamylation of specific lysyl residues in bovine alpha-crystallins." *J Biol Chem* **267**(36): 26128-33.
- Ramasubbu, N., C. Ragunath, et al. (2003). "Probing the role of a mobile loop in substrate binding and enzyme activity of human salivary amylase." *J Mol Biol* **325**(5): 1061-76.
- Ramires, P. R. and L. L. Ji (2001). "Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(2): H679-88.
- Reid, G. E. and S. A. McLuckey (2002). "'Top down' protein characterization via tandem mass spectrometry." *J Mass Spectrom* **37**(7): 663-75.
- Requena, J. R., C. C. Chao, et al. (2001). "Glutamic and amino adipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 69-74.
- Rice, R. H., G. E. Means, et al. (1977). "Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation." *Biochim Biophys Acta* **492**(2): 316-21.
- Riley, P. A. (1994). "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 27-33.
- Robinson, A. A. R. a. C. V. (1999). "Detection of the intact GroEL chaperonin assembly by mass spectrometry." *Am. Chem. Soc.* **121**: 4718-4719.
- Robinson, A. B. and L. R. Robinson (1991). "Distribution of glutamine and asparagine residues and their near neighbors in peptides and proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(20): 8880-4.
- Robinson, C. E., A. Keshavarzian, et al. (1999). "Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting." *Anal Biochem* **266**(1): 48-57.
- Robinson, N. E. a. R., A.B. (2004). "Molecular Clocks: Deamidation of Asparaginyl and Glutaminyl residues in Peptides and Proteins." *Althouse Press, Cave Junction, OR.*
- Rydberg, E. H., G. Sidhu, et al. (1999). "Cloning, mutagenesis, and structural analysis of human pancreatic alpha-amylase expressed in *Pichia pastoris*." *Protein Sci* **8**(3): 635-43.
- Salazar, O. and J. A. Asenjo (2007). "Enzymatic lysis of microbial cells." *Biotechnol Lett* **29**(7): 985-94.
- Sano, M., C. Ernesto, et al. (1997). "A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study." *N Engl J Med* **336**(17): 1216-22.
- Sarah Aldred, M. M. G., Helen R. Griffiths (2004). "The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research." *Clinical Biochemistry* **37**: 943-952.
- Shacter, E. (2000). "Quantification and significance of protein oxidation in biological samples." *Drug Metabolism Reviews* **32**(3&4): 307-326.
- Shaw, P. J., P. G. Ince, et al. (1995). "Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord." *Ann Neurol* **38**(4): 691-5.
- Shevchenko, A., I. Chernushevich, et al. (1997). "Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer." *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**(9): 1015-24.
- Sickmann, A., J. Reinders, et al. (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13207-12.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**(2): 291-5.

- Skouri-Panet, F., F. Bonnete, et al. (2001). "Lens crystallins and oxidation: the special case of gammaS." Biophys Chem **89**(1): 65-76.
- Smith, C. D., J. M. Carney, et al. (1991). "Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10540-3.
- Sohal, R. S. (2002). "Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process." Free Radic Biol Med **33**(1): 37-44.
- Somogyi, Á., and V. Károly, et al. (2008). "Mass spectrometry instrumentation and techniques. Medical Applications of Mass Spectrometry. ." Amsterdam, Elsevier: 93-140.
- Spengler, B. and R. J. Cotter (1990). "Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis." Anal Chem **62**(8): 793-6.
- Stadtman, E. R. (1997). "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress." The Journal of Biological Chemistry **272**(August 15): 20313-20316.
- Stadtman, E. R. (2006). "Protein oxidation and aging." Free Radic Res **40**(12): 1250-8.
- Stadtman, E. R. and B. S. Berlett (1997). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." Chem Res Toxicol **10**(5): 485-94.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2000). "Protein oxidation." Ann N Y Acad Sci **899**: 191-208.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2003). "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins." Amino Acids **25**(3-4): 207-18.
- Stadtman, E. R. and C. N. Oliver (1991). "Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences." J Biol Chem **266**(4): 2005-8.
- Stadtman, E. R. a. B., Barbara S. (1998). "Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease." Drug Metabolism Reviews **30**(No.2): 225-243.
- Stark, G. R. (1965). "Reactions of cyanate with functional groups of proteins. IV. Inertness of aliphatic hydroxyl groups. Formation of carbamyl- and acylhydantoins." Biochemistry **4**(11): 2363-7.
- Stephens, W. (1946). Phys. Rev. **69**.
- Storey, K. B. a. S., J.M. (1996). "Natural freezing survival in animals." Ann. Rev. Ecol. Syst. **27**: 365-386.
- Stump, M. J. F., R. C.; Gong, W.-H. et al. (2002). Appl. Spectrosc. Rev. **37**.
- Swallow, A. J. (1960). "Effect of ionizing radiation on proteins, RCO groups, peptide bound cleavage, inactivation, -SH oxidation." In: Swallow AJ (ed) Radiation chemistry of organic compounds. John Wiley & Sons, New York: 211-224.
- Swift, H. J., L. Brady, et al. (1991). "Structure and molecular model refinement of *Aspergillus oryzae* (TAKA) alpha-amylase: an application of the simulated-annealing method." Acta Crystallogr B **47** (Pt 4): 535-44.
- Talrose, V. L., M. D. Person, et al. (1999). "Insight into absorption of radiation/energy transfer in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization: the roles of matrices, water and metal substrates." Rapid Commun Mass Spectrom **13**(21): 2191-8.
- Tanaka, A. and E. Hoshino (2002). "Calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha-amylase determined by inactivation kinetics." Biochem J **364**(Pt 3): 635-9.
- Tanaka, K., Yaki, H., Ido, Y., Akida, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988). "Detection of High Mass Molecular Ions by Laser Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry " Rapid Commun Mass Spectrom **2**: 151.
- Taylor, J. A., K. A. Walsh, et al. (1996). "Sherpa: a Macintosh-based expert system for the interpretation of electrospray ionization LC/MS and MS/MS data from protein digests." Rapid Commun Mass Spectrom **10**(6): 679-87.
- Taylor, S. W., E. Fahy, et al. (2003). "Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins." J Biol Chem **278**(22): 19587-90.
- Teng-umnuay, P., H. R. Morris, et al. (1998). "The cytoplasmic F-box binding protein SKP1 contains a novel pentasaccharide linked to hydroxyproline in *Dictyostelium*." J Biol Chem **273**(29): 18242-9.
- Thomson, J. J. (1913). "Rays of positive electricity and their applications to chemical analysis." Longmans Green, London.
- Tuma, D. J., M. L. Kearley, et al. (2001). "Elucidation of reaction scheme describing malondialdehyde-acetaldehyde-protein adduct formation." Chem Res Toxicol **14**(7): 822-32.
- Tyler-Cross, R. and V. Schirch (1991). "Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides." J Biol Chem **266**(33): 22549-56.
- Valacchi, G., E. Pagnin, et al. (2004). "In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin." Free Radic Biol Med **36**(5): 673-81.

- Valentina Cecarini, J. G., Evandro Fioretti, Manila Amici, Mauro Angeletti, Anna Maria Eleuteri, Jeffrey N. Keller (2007). "Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism." Biochimica et Biophysica Acta **1773**: 93-104.
- Valko, M., H. Morris, et al. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-208.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Vartapetian, B. B. a. J., M.B. (1997). "Plant Adaptations to Anaerobic Stress." Annals Bot. **79**: 3-20.
- Veaser, S., M. J. Dunn, et al. (2001). "Multiresolution image registration for two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **1**(7): 856-70.
- Vogt, W. (1995). "Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal." Free Radic Biol Med **18**(1): 93-105.
- Vorm, O. and P. Roepstorff (1994). "Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Biol Mass Spectrom **23**(12): 734-40.
- Vranova, E., D. Inze, et al. (2002). "Signal transduction during oxidative stress." J Exp Bot **53**(372): 1227-36.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, et al. (1995). "Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium." Electrophoresis **16**(7): 1090-4.
- Weir, W. P. B. a. M. P. (1999). "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins." **17**: 121-127.
- Wilkins, M. R., E. Gasteiger, et al. (1998). "Multiple parameter cross-species protein identification using MultiIdent--a world-wide web accessible tool." Electrophoresis **19**(18): 3199-206.
- Wilkinson, J. M. (1986). "Fragmentation of Polypeptides by Enzymic Methods " In: Practical Protein Chemistry: A Handbook. A. Darbre, ed. New York: John Wiley and Sons.
- Winchester, R. V. and K. R. Lynn (1970). "X- and gamma-radiolysis of some tryptophan dipeptides." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **17**(6): 541-8.
- Yan, L. J. and R. S. Sohal (1998). "Gel electrophoretic quantitation of protein carbonyls derivatized with tritiated sodium borohydride." Anal Biochem **265**(1): 176-82.
- Yan, L. J. and R. S. Sohal (1998). "Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 12896-901.
- Yates, J. R. (2004). "Mass Spectral Analysis in Proteomics." Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. **33**: 297-316.
- Yates, J. R., 3rd (2004). "Mass spectral analysis in proteomics." Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 297-316.
- Yates, J. R., 3rd, A. Gilchrist, et al. (2005). "Proteomics of organelles and large cellular structures." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 702-14.
- Zhang, H., X. Zha, et al. (2002). "Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs." J Biol Chem **277**(42): 39379-87.
- Zhu, H., S. Pan, et al. (2002). "Amino acid residue specific stable isotope labeling for quantitative proteomics." Rapid Commun Mass Spectrom **16**(22): 2115-23.





**X. Anexos**

---



**Tabela 1:** Lista das modificações oxidativas encontradas para todas as amostras oxidadas para a  $\alpha$ -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens*. Sequências de péptidos com a correspondente localização no resíduo modificado, massas observadas para cada sequência de péptidos e respectivo erro associado (PPM) para cada uma das modificações encontradas.

Amostra	Resíduo	Resíduo	Modificação	Sequência	Posição	Massa Observada	Massa Calculada	Erro PPM
<b>Controlo</b>								
	250	(Y)[6]	Aminotirosina	KWGIWYANELSLDGFR	245-260	1969,95	1969,99	-20
	427	(Y)[4]	Aminotirosina	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2547,12	2547,17	-21
	481	(Y)[7]	Aminotirosina	NAGETWYDITGNR	475-487	1511,64	1511,69	-33
	275	(W)[2]	Dioxidação	DWVQAVR	274-280	905,46	905,45	18
	429	(P)[5]	Dioxidação	YAYGPQHDIHPDVIGWTR	425-444	2531,06	2531,07	-4
	444	(R)[22]	Dioxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2692,23	2692,24	-4
	442	(W)[20]	Formilquinurenina	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2692,23	2692,24	-4
	187	(Y)[4]	Hidroxilação	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2150,87	2150,91	-20
	245	(K)[1]	Lys->Ácido aminoadípico	KWGIWYANELSLDGFR	245-260	1969,95	1969,94	4
	423	(K)[1]	Lys->Alisina	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2659,16	2659,22	-23
	167	(W)[2]	Oxidação	AWTDFR	166-171	795,53	795,38	-7
	184	(W)[1]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESR	184-198	2038,74	2038,81	-33
	185	(H)[2]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESR	184-198	2038,74	2038,81	-33
	186	(W)[3]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESR	184-198	2022,78	2022,82	-17
	246	(W)[1]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,80	1858,88	-42
	72	(P)[19]	Pro->Pirrolidona	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK G	54-77	2552,22	2552,35	-50
	151	(P)[16]	Pro->pyro-Glu	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1913,91	1913,88	12
<b>30 min Ox 10</b>								
	127	(Y)[5]	Aminotirosina	NVQVYGDVVLNHK	123-135	1499,72	1499,80	-52
	480	(W)[6]	Dioxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1528,66	1528,67	-2
	481	(Y)[7]	Dioxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1560,63	1560,66	-17
	246	(W)[1]	Formilquinurenina	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1874,88	1874,87	5
	275	(W)[2]	Formilquinurenina	DWVQAVR	274-280	921,47	921,44	32
	93	(L)[17]	Hidroxilação	GLSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQQ K	77-99	2610,09	2610,16	-29
	144	(V)[9]	Hidroxilação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,91	1915,90	7
	250	(Y)[5]	Hidroxilação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1874,88	1874,87	5
	276	(V)[3]	Hidroxilação	DWVQAVR	274-280	921,47	921,44	32
	290	(V)[5]	Hidroxilação	EMFTVAEYWQNNAGK	286-300	1803,73	1803,80	-42
	394	(Y)[13]	Hidroxilação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1857,75	1857,80	-28
	439	(V)[17]	Hidroxilação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,28	2676,25	13
	85	(Y)[8]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQQK	78-99	2595,09	2595,13	-16
	70	(W)[17]	Oxidação	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK GLSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQQ K	54-76	2567,27	2567,31	-16
	92	(D)[16]	Oxidação	GLSQSDNGYGPYDLYDLGFEFQQ K	77-99	2610,09	2610,16	-29
	143	(D)[8]	Oxidação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,91	1915,90	7
	167	(W)[2]	Oxidação	AWTDFRFPGR	166-175	1268,63	1268,62	11
	169	(D)[4]	Oxidação	AWTDFRFPGR	166-175	1268,63	1268,62	11
	274	(D)[1]	Oxidação	DWVQAVR	274-280	889,50	889,45	48
	287	(M)[2]	Oxidação	EMFTVAEYWQNNAGK	286-300	1803,73	1803,80	-42
	389	(Y)[4]	Oxidação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1873,71	1873,80	-46
	397	(M)[12]	Oxidação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1857,75	1857,80	-28
	401	(K)[16]	Oxidação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1873,71	1873,80	-46
	436	(H)[14]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2692,21	2692,24	-14

Stress oxidativo e oxidação proteica: caracterização estrutural da  $\alpha$ -amilase

	442	(W)[20]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,28	2676,25	13
	444	(R)[22]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,28	2676,25	13
	482	(D)[8]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1528,69	1528,67	12
	376	(P)[1]	Pro->pyro-Glu	PLAYAFILTR	376-385	1178,68	1178,66	22
<b>30 min</b>								
<b>Ox 1</b>								
	39	(Y)[8]	Aminotirosina	VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWK	32-52	2629,15	2629,19	-16
	187	(Y)[4]	Aminotirosina	WHWYHFDGADWDESR	184-198	2021,80	2021,83	-16
	427	(Y)[4]	Aminotirosina	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2547,07	2547,17	-37
	427	(Y)[5]	Aminotirosina	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2675,16	2675,26	-38
	249	(W)[4]	Dioxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,78	1858,88	8
	275	(W)[2]	Dioxidação	DWVQAVR	274-280	905,43	905,45	-19
	184	(W)[1]	Formilquinurenina	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2182,83	2182,90	-31
	397	(Y)[13]	Hidroxilação	ESGYPQVFGDMYGTK	386-401	1873,78	1873,79	-8
	439	(V)[16]	Hidroxilação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,11	2548,15	-18
	481	(Y)[7]	Hidroxilação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,68	1512,67	4
	85	(Y)[8]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQK	78-99	2595,19	2595,13	23
	186	(W)[3]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2166,83	2166,91	-33
	188	(H)[5]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2166,83	2166,91	-33
	189	(F)[6]	Oxidação	WHWYHFDGADWDESR	184-198	2038,78	2038,81	-16
	250	(Y)[5]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,89	1858,88	8
	252	(N)[7]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,89	1858,88	8
	390	(P)[5]	Oxidação	ESGYPQVFGDMYGTK	386-401	1873,78	1873,79	-8
	397	(M)[12]	Oxidação	ESGYPQVFGDMYGTK	386-401	1873,78	1873,79	-8
	442	(W)[19]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,11	2548,15	-18
	442	(W)[20]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,28	2676,25	10
	444	(R)[22]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,28	2676,25	10
	480	(W)[6]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,68	1512,67	4
	482	(D)[8]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1528,69	1528,67	15
	87	(P)[11]	Pro->pyro-Glu	GLSQSDNGYGPYDLYDLGEFQK	77-99	2608,07	2608,15	-30
	246	(W)[1]	Quinona	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1870,85	1870,84	4
<b>1h</b>								
<b>Ox 10</b>								
	85	(Y)[8]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQK	78-99	2595,10	2595,13	-9
	167	(W)[2]	Oxidação	AWTDFRFPGR	166-175	1268,61	1268,62	-5
	275	(W)[7]	Oxidação	FSFLRDWVQAVR	269-280	1539,77	1539,81	-21
	397	(M)[12]	Oxidação	ESGYPQVFGDMYGTK	386-401	1857,78	1857,80	-9
<b>1h</b>								
<b>Ox 1</b>								
	427	(Y)[5]	Aminotirosina	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2675,20	2675,26	-25
	194	(W)[11]	Formilquinurenina	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2166,88	2166,91	-10
	69	(V)[17]	Hidroxilação	RLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAY K	53-76	2722,27	2722,38	-43
	144	(V)[9]	Hidroxilação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,96	1915,90	33
	187	(Y)[4]	Hidroxilação	WHWYHFDGADWDESRK	184-199	2150,86	2150,91	-22
	429	(P)[6]	Hidroxilação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,13	2548,15	-8
	433	(Y)[11]	Hidroxilação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2675,20	2675,22	-8
	249	(W)[4]	Hidroxiquinurenina	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1846,87	1846,88	-4
	76	(K)[24]	Lys->Alisina	RLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAY K	53-76	2722,27	2722,38	-43
	423	(K)[1]	Lys->Alisina	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2659,22	2659,22	0
	85	(Y)[8]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQK	78-99	2595,03	2595,13	-39
	42	(W)[7]	Oxidação	LMQYFEWYTPNDGQHWK	36-52	2410,05	2410,13	-34
	143	(D)[8]	Oxidação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,96	1915,90	33
	186	(W)[4]	Oxidação	KWHWYHFDGADWDESR	183-198	2182,85	2182,90	-24

186	(W)[3]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-199	2150,86	2150,91	-22
188	(H)[6]	Oxidação	KWHWYHFDGADWDES	183-198	2182,85	2182,90	-24
189	(F)[6]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2022,79	2022,82	-11
246	(W)[1]	Oxidação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1858,83	1858,88	-22
250	(Y)[5]	Oxidação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1842,86	1842,88	-12
275	(W)[2]	Oxidação	DWVQAVR	274-280	889,44	889,45	-11
431	(H)[8]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,13	2548,15	-8
431	(H)[9]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,18	2676,25	-27
432	(D)[9]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,13	2548,15	-8
436	(H)[14]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2664,17	2664,25	-29
442	(W)[20]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2664,17	2664,25	-29
444	(R)[21]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,05	2548,15	-41
481	(Y)[7]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,62	1512,67	-34
437	(P)[15]	Pro->Pirrolidona	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2664,17	2664,25	-29
151	(P)[16]	Pro->pyro-Glu	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1913,95	1913,88	36
429	(P)[7]	Pro->pyro-Glu	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2674,17	2674,23	-22
480	(W)[6]	Trp->Oxolactona	NAGETWYDITGNR	475-487	1510,58	1510,66	-49
<b>2h30 Ox 10</b>							
480	(W)[6]	Dioxidação	NAGETWYDITGNR	475-488	1528,67	1528,67	3
144	(V)[9]	Hidroxilação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-155	1931,83	1931,89	-32
481	(Y)[7]	Hidroxilação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,68	1512,67	8
482	(D)[8]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-490	1528,67	1528,67	3
151	(P)[16]	Pro->pyro-Glu	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1913,87	1913,88	-9
<b>2h30 Ox 1</b>							
187	(Y)[4]	Aminotirosina	WHWYHFDGADWDES	184-198	2021,84	2021,83	4
70	(W)[18]	Dioxidação	RLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAY K	53-76	2739,32	2739,41	-33
397	(M)[12]	Dioxidação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1873,72	1873,79	-40
498	(W)[6]	Dioxidação	IGSDGWGEFHVNDGVSIVYVQK	493-514	2426,05	2426,13	-33
39	(Y)[8]	Hidroxilação	VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWK	32-52	2630,20	2630,18	8
250	(Y)[5]	Hidroxilação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1842,90	1842,88	11
394	(Y)[9]	Hidroxilação	ESGYPQVIFYGDMYGTK	386-401	1873,72	1873,79	-40
427	(Y)[4]	Hidroxilação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,06	2548,15	-36
439	(V)[16]	Hidroxilação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,11	2548,15	-16
439	(V)[17]	Hidroxilação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,33	2676,25	30
42	(W)[11]	Oxidação	VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWK	32-52	2630,20	2630,18	8
167	(W)[2]	Oxidação	AWTDFR	166-171	811,39	811,37	20
184	(W)[1]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2054,82	2054,81	4
186	(W)[3]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2022,85	2022,82	19
188	(H)[5]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2054,82	2054,81	4
189	(F)[6]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2054,78	2054,81	-14
190	(D)[7]	Oxidação	WHWYHFDGADWDES	184-198	2022,85	2022,82	19
246	(W)[1]	Oxidação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1858,84	1858,88	-22
249	(W)[4]	Oxidação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1842,90	1842,88	11
252	(N)[7]	Oxidação	WGIWYANESLSDGFR	246-260	1858,84	1858,88	-22
275	(W)[2]	Oxidação	DWVQAVR	274-280	889,45	889,45	-2
287	(M)[2]	Oxidação	EMFTVAEYWQNNAGKLENYLN K	286-307	2678,13	2678,26	-48
431	(H)[8]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,06	2548,15	-36
442	(W)[20]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2676,19	2676,25	-20
444	(R)[21]	Oxidação	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2548,11	2548,15	-16
480	(W)[6]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,65	1512,67	-16
481	(Y)[7]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1528,70	1528,67	24

482	(D)[8]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1528,70	1528,67	24
496	(D)[4]	Oxidação	IGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK	493-514	2426,05	2426,13	-33
501	(F)[9]	Oxidação	IGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK	493-514	2426,05	2426,13	-33
502	(H)[10]	Oxidação	IGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK	493-514	2426,05	2426,13	-33
72	(P)[19]	Pro->Pirrolidona	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	56-76	2565,27	2565,26	2
73	(P)[20]	Pro->pyro-Glu	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	56-76	2565,27	2565,26	2
429	(P)[6]	Pro->pyro-Glu	EYAYGPQHDIHPDVIGWTR	424-444	2546,06	2546,14	-32
70	(W)[17]	Quinona	LQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYK	56-76	2565,27	2565,26	2
<b>4h Ox 10</b>							
85	(Y)[8]	Aminotirosina	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQQK	78-99	2610,18	2610,14	16
167	(W)[2]	Dioxidação	AWTDFRFPGR	166-175	1284,60	1284,61	-7
246	(W)[1]	Dioxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,83	1858,88	-24
144	(V)[9]	Hidroxilação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,86	1915,89	-18
88	(Y)[11]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQQK	78-99	2610,18	2610,14	16
143	(D)[8]	Oxidação	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1915,86	1915,89	-18
250	(Y)[5]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,83	1858,88	-24
252	(N)[7]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,83	1858,88	-24
275	(W)[7]	Oxidação	FSFLRDWVQAVR	269-280	1539,74	1539,81	-41
480	(W)[6]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,67	1512,67	0
481	(Y)[7]	Oxidação	NAGETWYDITGNR	475-487	1512,67	1512,67	0
151	(P)[16]	Pro->pyro-Glu	AGADATEDVTAVEVNPANR	136-154	1913,89	1913,88	5
<b>4h Ox 1</b>							
179	(Y)[3]	Aminotirosina	NTYSDFKWHWYHFDGADWDES R	177-198	2935,20	2935,19	3
187	(Y)[11]	Aminotirosina	NTYSDFKWHWYHFDGADWDES R	177-198	2951,10	2951,18	-28
167	(W)[2]	Dioxidação	AWTDFRFPGR	166-175	1284,62	1284,61	10
429	(P)[7]	Dioxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2707,19	2707,21	12
498	(W)[6]	Dioxidação	IGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK	493-514	2426,07	2426,13	-23
246	(W)[1]	Formilquinurenina	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,93	1858,88	26
250	(Y)[5]	Hidroxilação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1842,92	1842,88	20
250	(Y)[6]	Hidroxilação	KWGIWYANELSLDGFR	245-260	1970,97	1970,98	-4
398	(Y)[13]	Hidroxilação	ESGYPQVFGDMYGTGKTSK	386-406	2328,01	2328,05	-17
433	(Y)[11]	Hidroxilação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2692,28	2692,24	12
473	(V)[5]	Hidroxilação	MYAGLKNAGETWYDITGNR	469-487	2175,95	2176,01	-31
275	(W)[7]	Hidroxiquinurenina	FSFLRDWVQAVR	269-280	1543,77	1543,80	-20
109	(K)[6]	Lys->Alisina	TKYGTKSELQDAIGSLHSR	104-122	2090,02	2090,05	-14
85	(Y)[8]	Nitro	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFQQK	78-99	2595,02	2595,13	-43
184	(W)[8]	Nitro	NTYSDFKWHWYHFDGADWDES R	177-198	2951,10	2951,18	-28
186	(W)[10]	Nitro	NTYSDFKWHWYHFDGADWDES R	177-198	2935,20	2935,19	3
245	(K)[1]	Oxidação	KWGIWYANELSLDGFR	245-260	1970,97	1970,98	-4
249	(W)[4]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1842,92	1842,88	20
249	(W)[5]	Oxidação	KWGIWYANELSLDGFR	245-260	1970,97	1970,98	-4
252	(N)[7]	Oxidação	WGIWYANELSLDGFR	246-260	1858,93	1858,88	26
397	(M)[12]	Oxidação	ESGYPQVFGDMYGTGKTSK	386-406	2328,01	2328,05	-17
432	(D)[10]	Oxidação	KEYAYGPQHDIHPDVIGWTR	423-444	2692,28	2692,24	12
469	(M)[1]	Oxidação	MYAGLKNAGETWYDITGNR	469-487	2175,95	2176,01	-31
376	(P)[26]	Pro->Pirrolidona	AVTFVENHDTQPGQSLESTVQT WFKPLAYAFILTR	351-385	3995,17	3995,00	44
373	(W)[23]	Quinona	AVTFVENHDTQPGQSLESTVQT WFKPLAYAFILTR	351-385	3995,17	3995,00	44

**Tabela 2:** Lista das modificações oxidativas encontradas para todas as amostras oxidadas para a  $\alpha$ -amilase de salivar humana. Sequências de péptidos com a correspondente localização no resíduo modificado, massas observadas para cada sequência de péptidos e respectivo erro associado (PPM) para cada uma das modificações encontradas.

Amostra	Resíduo	Resíduo	Modificação	Sequência	Posição	Massa Observada	Massa Calculada	Erro PPM
<b>Controlo</b>								
	425	(Y)[12]	Dioxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,22	2617,17	21
	149	(W)[10]	Dioxidação	DFPAVPYSGWDFNDGK	140-155	1846,83	1846,79	18
	420	(P)[6]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,13	2599,09	13
	421	(F)[7]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,13	2599,09	13
	424	(W)[10]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,13	2599,09	13
	425	(Y)[11]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,13	2599,09	13
	31	(L)[6]	Hidroxilação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,68	1303,68	1
	29	(V)[4]	Hidroxilação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	9
	197	(Y)[4]	Hidroxilação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,96	1934,98	-10
	34	(W)[9]	Hidroxiquinurenina	TSIVHLFEWR	26-35	1307,64	1307,67	-29
	30	(W)[5]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,68	1303,68	1
	424	(W)[11]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,23	2601,18	19
	200	(H)[7]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,96	1934,98	-10
	420	(P)[7]	Pro->pyro-Glu	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2599,15	2599,16	-4
	331	(W)[13]	Trp->Oxolactona	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1629,77	1629,78	-3
<b>30 min Ox 10</b>								
	34	(W)[9]	Dioxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1319,69	1319,67	9
	310	(F)[4]	Dioxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,68	1459,69	-7
	331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,78	1647,79	-7
	424	(W)[11]	Formilquinurenina	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,13	2617,17	-15
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,68	1443,7	-9
	308	(L)[2]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1475,69	1475,69	1
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1475,69	1475,69	1
	197	(Y)[4]	Hidroxilação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,93	1934,98	-13
	420	(P)[7]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,14	2601,18	-12
	425	(Y)[12]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,18	2601,18	2
	328	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,8	1631,79	7
	32	(F)[7]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1319,69	1319,67	9
	35	(R)[10]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1320,69	1320,67	10
	314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,68	1443,7	-9
	316	(N)[7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,68	1443,7	-9
	310	(F)[4]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,71	1443,7	9
	312	(D)[6]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,68	1459,69	-7
	316	(N)[7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1475,69	1475,69	1
	332	(D)[14]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,8	1647,79	5
	330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,8	1647,79	5
	200	(H)[7]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,93	1934,98	-23
	198	(M)[5]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,93	1934,98	-13
	420	(P)[7]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,14	2617,17	-10
	425	(Y)[12]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,14	2617,17	-10
	424	(W)[11]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,14	2601,18	-12
	423	(N)[10]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,14	2601,18	-12



Stress oxidativo e oxidação proteica: caracterização estrutural da  $\alpha$ -amilase

426	(D)[13]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,18	2601,18	2
424	(W)[11]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,18	2601,18	2
331	(W)[13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,8	1631,79	7
421	(F)[8]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,14	2617,17	-10
399	(C)[16]	Oxidação	EVTINPDTTTCGNDWVCEHR	384-402	2190,91	2190,92	-3
397	(W)[14]	Oxidação	EVTINPDTTTCGNDWVCEHR	384-402	2190,91	2190,92	-3
427	(W)[14]	Quinona	EVTINPDTTTCGNDWVCEHR	384-402	2218,91	2218,91	-1
389	(P)[6]	Pro→Pirrolidona	EVTINPDTTTCGNDWVCEHR	384-402	2190,91	2190,92	-3
<b>30 min</b>							
<b>Ox 1</b>							
425	(Y)[13]	Aminotirosina	RNVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	413-436	2756,20	2756,29	-34
31	(L)[6]	Hidroxilação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	6
311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,69	1443,7	-5
332	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,76	1631,79	-21
420	(P)[7]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,12	2601,18	-21
216	(H)[1]	Oxidação	HMWPGDIK	216-223	999,47	999,47	3
217	(M)[2]	Oxidação	HMWPGDIK	216-223	999,47	999,47	3
30	(H)[5]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	6
34	(W)[9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	7
35	(R)[10]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	7
314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,69	1443,7	-5
312	(D)[6]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,69	1443,7	-5
330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,76	1631,79	-21
332	(D)[14]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,78	1631,79	-10
200	(H)[7]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,97	1934,98	-2
198	(M)[5]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1934,97	1934,98	-2
420	(P)[7]	Pro→Pirrolidona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2585,16	2585,14	6
34	(W)[9]	Quinona	TSIVHLFEWR	26-35	1317,65	1317,66	-4
424	(W)[11]	Quinona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2585,16	2585,14	6
331	(W)[13]	Trp→Oxolactona	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1629,79	1629,78	10
<b>1h</b>							
<b>Ox 10</b>							
310	(F)[4]	Dioxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,68	1459,69	-7
331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,8	1647,79	6
425	(Y)[12]	Dioxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,14	2617,17	-12
311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,71	1443,7	11
201	(L)[8]	Hidroxilação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1935,01	1934,98	14
328	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	9
34	(W)[9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	8
314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,67	1443,7	-19
312	(D)[6]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,68	1459,69	-7
345	(P)[10]	Oxidação	MAVGFMLAHPYGFTR	338-350	1775,75	1775,8	-33
346	(Y)[11]	Oxidação	MAVGFMLAHPYGFTR	338-351	1776,75	1776,8	-32
200	(H)[7]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1935,01	1934,98	14
203	(D)[10]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1935,01	1934,98	14
424	(W)[11]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,07	2601,18	-40
426	(D)[13]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2633,11	2633,17	-22
427	(N)[14]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-437	2634,11	2634,17	-21
313	(N)[7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-319	1460,68	1460,69	-6
343	(M)[6]	Oxidação	MAVGFMLAHPYGFTR	338-352	1777,75	1777,8	-31
425	(Y)[12]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-438	2635,11	2635,17	-20
331	(W)[13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	-2
330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	-2

	420	(P)[7]	Pro->Pirrolidona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2585,18	2585,14	14
	424	(W)[11]	Quinona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2615,19	2615,15	13
<b>1h Ox 1</b>								
	331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,79	1647,79	3
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,71	1443,7	8
	328	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	-4
	425	(Y)[12]	Nitro	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2630,18	2630,17	7
	34	(W)[9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,68	1303,68	3
	314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,71	1443,7	8
	330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	-4
	331	(W)[13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,79	1631,79	-4
	423	(N)[10]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,18	2617,17	3
	425	(Y)[12]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,18	2617,17	4
	243	(P)[1]	Pro->piro-Glu	PFIYQEVIDLGGPEIK	243-258	1831,89	1831,95	-30
	424	(W)[11]	Trp->Oxolactona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2599,12	2599,16	-15
<b>2h30 Ox 10</b>								
	420	(P)[6]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,16	2599,10	25
	421	(F)[7]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,16	2599,10	25
	424	(W)[10]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,16	2599,10	25
	425	(Y)[11]	Dioxidação	VVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	415-436	2599,16	2599,10	25
	34	(W)[9]	Dioxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1319,7	1319,67	20
	310	(F)[4]	Dioxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,69	12
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,67	1443,7	-18
	309	(V)[3]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,7	1443,7	4
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,69	12
	314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,67	1443,7	-18
	313	(N)[7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,67	1443,7	-18
	312	(D)[6]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,7	12
	310	(F)[4]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1475,69	1475,69	3
	34	(W)[9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,68	1303,68	4
	331	(W)[13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,75	1631,79	-24
	320	(H)[2]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1661,73	1661,77	-20
	420	(P)[7]	Pro->Pirrolidona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2587,08	2587,16	-29
	424	(W)[11]	Quinona	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-437	2587,08	2587,16	-28
<b>2h30 Ox 1</b>								
	425	(Y)[12]	Aminotirosina	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2600,17	2600,19	-9
	330	(F)[12]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,71	1647,79	-45
	331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,78	1647,79	-4
	328	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,8	1631,79	3
	187	(K)[11]	Lys->Alisina	LSGLLDLALGKDYVR	177-191	1631,86	1631,9	-25
	314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,7	1443,69	-1
	331	(W)[13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,8	1631,79	3
	330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,8	1631,79	3
	420	(P)[7]	Pro->pyro-Glu	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2599,14	2599,16	-7
<b>4h Ox 10</b>								
	310	(F)[4]	Dioxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,69	9
	331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,79	1647,79	4
	424	(W)[11]	Formilquinurenina	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2633,01	2633,17	-49
	311	(V)[5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,69	1443,7	-7
	311	(V)[3,5]	Hidroxilação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,69	9
	425	(Y)[12]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,12	2601,18	-23

328	(L) [10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,77	1631,79	-12
416	(V) [3]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2633,01	2633,17	-49
310	(F)[4]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,7	1443,7	2
312	(D)[6]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1459,71	1459,69	9
426	(D)[13]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,12	2601,18	-23
34	(W) [9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,65	1303,68	-21
35	(R) [10]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,65	1303,68	-21
331	(W) [13]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1319,59	1319,67	-12
332	(D) [14]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,77	1631,79	-12
330	(F) [12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,77	1631,79	-12
425	(W) [11]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,05	2601,18	-35
420	(P) [7]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,05	2601,18	-49
423	(N) [10]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2601,05	2601,18	-49
421	(F) [8]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2633,01	2633,17	-49
317	(N)[7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-319	1460,71	1460,69	10
34	(W) [9]	Quinona	TSIVHLFEWR	26-35	1317,69	1317,66	30
<b>4h</b>							
<b>Ox 1</b>							
425	(Y)[12]	Aminotirosina	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2600,18	2600,19	-4
331	(W)[13]	Dioxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1647,77	1647,79	-12
34	(W) [9]	Dioxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1319,68	1319,67	6
302	(M) [9]	Dioxidação	NWGEGWGFMPSTR	294-306	1602,67	1602,63	28
295	(W) [2]	Dioxidação	NWGEGWGFMPSTR	294-306	1602,67	1602,63	28
342	(F) [5]	Dioxidação	MAVGFMLAHPYGFTR	338-352	1729,83	1729,82	5
149	(W) [10]	Dioxidação	DFPAVPYSGWDFNDGK	140-155	1846,73	1846,79	-34
328	(L)[10]	Hidroxilação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,73	1631,79	-37
420	(P)[7]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,18	2617,17	3
416	(V)[3]	Hidroxilação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,16	2617,17	-3
314	(H)[8]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,71	1443,7	7
330	(F)[12]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,73	1631,79	-37
332	(D)[14]	Oxidação	GHGAGGASILTFWDAR	319-334	1631,81	1631,79	9
423	(N)[10]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,16	2617,17	-3
430	(N)[17]	Oxidação	NVVDGQPFTNWDNGSNQVAFGR	414-436	2617,18	2617,17	3
34	(W) [9]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,65	1303,68	-21
35	(R) [10]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,68	1303,68	2
32	(F) [7]	Oxidação	TSIVHLFEWR	26-35	1303,69	1303,68	11
313	(N) [7]	Oxidação	ALVFVDNHDNQR	307-318	1443,69	1443,70	-7
338	(M) [1,6]	Oxidação	MAVGFMLAHPYGFTR	338-352	1729,83	1729,82	5
150	(D) [11]	Oxidação	DFPAVPYSGWDFNDGK	140-155	1830,73	1830,80	-37
151	(F) [12]	Oxidação	DFPAVPYSGWDFNDGK	140-155	1846,73	1846,79	-34
198	(M) [5]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1950,97	1950,97	-3
203	(D) [10]	Oxidação	IAEYMNHLIDIGVAGFR	194-210	1950,97	1950,97	-3
34	(W) [9]	Quinona	TSIVHLFEWR	26-35	1317,70	1317,66	30