



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DE MEMBRANAS BILIPÍDICAS :
RELAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO LIPÍDICA, AGENTES OXIDANTES E
ANTIOXIDANTES**

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para
obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

ALUNA: VÂNIA RODRIGUES DE LIMA
ORIENTADORA: Profa. Dra. TÂNIA BEATRIZ CRECZYNSKI-PASA
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MIGUEL CARO

Florianópolis-Santa Catarina, fevereiro de 2005

**COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO DE MEMBRANAS BILIPÍDICAS :
RELAÇÃO ENTRE COMPOSIÇÃO LIPÍDICA, AGENTES OXIDANTES E
ANTIOXIDANTES**

VÂNIA RODRIGUES DE LIMA

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos orientadores e membros da banca examinadora

**Prof. Dr. Hernan Terenzi
CCB UFSC**

**Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
Co- Orientador QMC UFSC**

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa
Orientadora CIF UFSC**

**Prof. Dr. Valdir Soldi
QMC UFSC**

**Profa. Dra. Vera Lúcia A. Frescura Bascunan
QMC UFSC**

... Ajuda-me sempre a lembrar de que a mim cabe o esforço, mas que não tenho direito aos frutos da ação.

Ensina-me a aceitar os resultados, mesmo os mais adversos e aparentemente inaceitáveis resultados de minhas ações.

Ensina-me a não mais dizer minhas ações. Sou apenas um instrumento em Tuas mãos cósmicas. Aciona-me...

... Tu bem sabes que, mesmo quando busco servir profissionalmente, estou ligado com a Fonte Alimentadora, que És Tu...

Utiliza-me. Empresta-me Tua Luz e Tua Força.

(fragmentos da “Prece do Karma Yogui”, Hermógenes)

Este trabalho é dedicado àqueles que possam vir a utilizar, propagar e aprimorar tal conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Desde já, aproveito este parágrafo para agradecer todos aqueles que, por algum motivo (principalmente a falta de memória...), não citarei nestas páginas. Todos os seres são manifestações de Deus, e agradecendo à Luz Suprema, por tamanha inspiração, bem-aventurança e amor, doados em todos os meus passos, minha consciência fica tranqüila.

A Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa por ser, mais do que orientadora, uma parceira atenta de seus alunos, que vive passionadamente cada etapa do trabalho do grupo, inspirando a todos com sua autenticidade. Obrigada por tanto aprendizado!

Ao Prof. Dr. Miguel Caro, por me receber tão bem como aluna, pela sua dedicação e bom-humor... é um verdadeiro exemplo como ser humano e profissional.

Aos Profs. Drs. João Cardoso de Lima, Tarcísio Grandi, e a Marli Soldi pelo empenho e cuidado dedicados às medidas de DSC.

A Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, por fornecer os ratos utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Pasa e ao seu grupo de trabalho, pelo apoio e dedicação oferecidos durante o processo de realização deste trabalho.

A Profa. Carla Cristina Charão, pelo apoio dedicado durante o desenvolvimento neste trabalho.

Aos Professores membros da banca, Hernán Terenzi, Valdir Soldi e Vera Frescura, cujo exemplo e profissionalismo inspiram toda a minha confiança em entregar-lhes este trabalho para avaliação.

Aos meus pais, João e Sônia, por serem verdadeiros mestres, ou gurus, fontes inesgotáveis de generosidade e simpatia. A Vladimir e Fabiana, pela benção da convivência, inspiração e

alegria que me proporcionam ao partilhar cada nova descoberta vivida em um amor de muitos anos...

Aos meus amigos queridos, verdadeiros presentes, por todas as “roubadas” maravilhosas que compartilhamos!!! Em especial, ao Marlon, de importância fundamental para a minha aprovação no programa de pós-graduação, pela sua luz, boa vontade e parceria.

À Silvinha e ao Eduardo, por nossa grande amizade e por me inspirarem e incentivarem a percorrer os caminhos sagrados do Yoga.

Aos amigos que conheci no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, Heloísa, Róber, Tiago, Csele, Marcos, Adriana, Prof. Dra. Maria Cláudia Santos Silva, Cris, Mirela, Claudriana e Camila, pelo ótimo astral que proporcionam ao ambiente, e pela solidariedade dedicada em cada momento de êxtase ou desespero.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1. Membranas celulares: Funções, composição lipídica, estado físico e organização.....	28
2.1.1. Fosfolipídios de membranas celulares.....	31
2.1.2. Ácidos graxos insaturados de membranas celulares	39
2.1.3. Fluidez e dinâmica lipídica das membranas celulares.....	42
2.1.4. Modelos de membranas celulares.....	47
2.2. Espécies reativas e radicais livres	50
2.2.1. Reações biológicas que envolvem a presença de espécies reativas	56
2.2.2. Química do radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito	58
2.2.3. Lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados	63
2.3. Antioxidantes.....	66
2.4. Técnicas instrumentais utilizadas para caracterizar membranas fosfolipídicas e suas interações com espécies reativas e antioxidantes.....	72
2.4.1. Calorimetria de varredura diferencial aplicada ao estudo de membranas.....	74
2.4.2. Ressonância magnética nuclear aplicada ao estudo de membranas	78
3. OBJETIVOS	85
3.1. Objetivos gerais.....	85

3.2. Objetivos específicos.....	85
4. MATERIAIS E MÉTODOS	86
4.1. Reagentes utilizados no trabalho	86
4.2. Preparação dos lipossomas	87
4.3. Preparação de microsomas de fígado de rato.....	88
4.4. Determinação da concentração protéica.....	88
4.5. Síntese de radical hidroxil	89
4.6. Síntese de radical ascorbil	89
4.7. Síntese de peroxinitrito.....	89
4.8. Lipoperoxidação induzida por espécies reativas	90
4.9. Experimentos com calorimetria de varredura diferencial	92
4.10. Experimentos com ressonância magnética nuclear de ¹ H	92
4.11. Antioxidantes.....	92
4.12. Instrumentação	93
4.13. Análise estatística	93
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
5.1. Lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina, asolecitina e em microsomas de fígado de rato	94
5.2. Efeitos da incorporação de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina na lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito.....	99

5.3. Efeitos da incorporação de ácido fosfatídico no comportamento termodinâmico de lipossomas de fosfatidilcolina, analisado por calorimetria de varredura diferencial.....	102
5.4. Distribuição lipídica em lipossomas constituídos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, detectada por RMN de ¹ H	105
5.5. Atividade inibitória de antioxidantes naturais contra a lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em membranas.....	109
6. CONCLUSÕES	116
7. PERSPECTIVAS	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9. ANEXOS	152
9.1. Artigo submetido e aceito para publicação na revista “Chemistry and Physics of Lipids”.....	153
9.2. Artigo publicado na revista “Journal of Pineal Research”	166
9.3. Lista de trabalhos apresentados em eventos.....	174

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de alguns fosfolipídios constitutivos de neurônios e mitocôndrias hepáticas	24
Figura 2. Conexões entre composição, estado físico, organização e funções das membranas	29
Figura 3. Estrutura básica da membrana celular	31
Figura 4. Esquema da estrutura de um lipídio e estrutura da fosfatidilcolina.....	32
Figura 5. Estrutura geral de fosfolipídios.....	33
Figura 6. Estrutura da fosfatidiletanolamina	35
Figura 7. Esquema de aminofosfolipídios em fase hexagonal invertida.....	35
Figura 8. Estrutura do fosfatidilinositol	36
Figura 9. Estrutura do ácido fosfatídico	37
Figura 10. Membrana biológica do ponto de vista eletrostático	38
Figura 11. Estrutura do ácido cis-oleico e inclinação da cadeia alquílica propiciada pela ligação dupla cis.....	41
Figura 12. Empacotamento lipídico em bicamadas de fosfatidilcolinas saturadas, monoinsaturadas e poliinsaturadas	42
Figura 13. Frequências características e movimentos relacionados à dinâmica lipídica conformacional e translacional de membranas.....	44
Figura 14. Comportamento da bicamada lipídica na fase gel e na fase líquido-cristalina.....	46
Figura 15. Corte transversal de um lipossoma	49

Figura 16. Distribuição eletrônica em orbitais para diversas espécies reativas de oxigênio.....	51
Figura 17. Exemplos de espécies reativas de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio	52
Figura 18. Reações biológicas que produzem espécies reativas de nitrogênio a partir de monóxido de nitrogênio.....	54
Figura 19. Adição de radical hidroxil à base guanina do DNA	56
Figura 20. Nitração da tirosina por peroxinitrito.....	57
Figura 21. Sistema ativo de oxigênio	58
Figura 22. Oxidação de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico	59
Figura 23. Mecanismo proposto para a lipoperoxidação induzida por ascorbil e ferro microsomal	60
Figura 24. Reações de formação e decomposição de peroxinitrito/ácido peroxinitroso.....	62
Figura 25. Energias de dissociação das ligações C-H para hidrogênios bis-alfílicos, alfílicos e alquil das cadeias hidrocarboneto.....	64
Figura 26. Lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados.....	65
Figura 27. Estrutura da quercetina	67
Figura 28. Estrutura da melatonina	68
Figura 29. Reações de seqüestro de radical hidroxil e peróxido de hidrogênio por melatonina.....	70
Figura 30. Reações entre melatonina e ácido peroxinitroso.....	70
Figura 31. Estrutura dos componentes do grupo vitamina B ₆	71

Figura 32. Arranjo experimental de calorimetria de varredura diferencial por fluxo de calor.....	75
Figura 33. Alargamento dos picos em curvas de calorimetria exploratória diferencial de dimiristoil ácido fosfatídico como função do acréscimo de frações molares de dipalmitoil ácido fosfático.....	77
Figura 34. Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de pulso	79
Figura 35. FID e sinal de domínio de frequência pós-transformada de Fourier	80
Figura 36. Comportamento de momentos magnéticos de um núcleo em um experimento de pulso de 90°	83
Figura 37. Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹ H de vesículas de fosfatidilcolina na presença ou ausência de ânion ferricianeto	84
Figura 38. Diálise para preparação de lipossomas	87
Figura 39. Sistema utilizado para a síntese de peroxinitrito	90
Figura 40. Reação entre ácido tiobarbitúrico e malonildialdeído	91
Figura 41. Índices de lipoperoxidação total induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina, asolecitina e em microssomas de fígado de rato	95
Figura 42. Índices de lipoperoxidação total induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em função de lipossomas com diferentes razões entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina.....	101

Figura 43. Curvas de calorimetria de varredura diferencial de lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina.....	103
Figura 44. Sinais de ressonância magnética de ^1H em lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina na ausência e presença de ânion ferricianeto	106
Figura 45. Sinais de ressonância magnética de ^1H em lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina na ausência e presença de ânion ferrocianeto	107
Figura 46. Atividade inibitória da quercetina contra a lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina, asolecitina e em microsomas de fígado de rato	111
Figura 47. Atividade inibitória da melatonina contra a lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina, asolecitina e em microsomas de fígado de rato	112
Figura 48. Atividade inibitória de vitamina B ₆ contra a lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina, asolecitina e em microsomas de fígado de rato	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Eventos patológicos associados a lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados.....	24
Tabela 2. Álcoois presentes na composição dos fosfolipídios	33
Tabela 3. Composição de ácidos graxos em fosfatidilcolina de ovo fresco e em fosfatidilcolina de soja	39
Tabela 4. Ácidos graxos comuns em membranas biológicas	40
Tabela 5. Fontes celulares de produção de espécies reativas de oxigênio	53
Tabela 6. Peroxinitrito: alvos e ações biológicas	55
Tabela 7. Reações envolvidas no modelo de formação e decomposição de peroxinitrito/ácido peroxinitroso e constantes de velocidade.....	63
Tabela 8. Lipoperoxidação total (%) induzida por espécies reativas em membranas.....	96
Tabela 9. Percentagem de ácidos graxos insaturados em fosfatidilcolina (PC) de ovo, microsomas de fígado de rato (MC) e em asolecitina (ASO) de soja.	98
Tabela 10. Variação de entalpia em lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina.....	104
Tabela 11. Distribuição de fosfatidilcolina em lipossomas contendo diferentes razões entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina.....	108
Tabela 12. IC ₅₀ dos antioxidantes contra a lipoperoxidação induzida por espécies reativas	115

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo para obtenção do valor da variação da energia de Gibbs (ΔG).....	30
Equação 2. Cálculo para obtenção do valor de parâmetro de empacotamento.....	34
Equação 3. Redução do ferro	59
Equação 4. Reação de Fenton.....	59
Equação 5. Reação de Haber-Weiss.....	59
Equação 6. Formação biológica de peroxinitrito.....	61
Equação 7. Síntese de peroxinitrito: formação de cátion nitrosil.....	61
Equação 8. Síntese de peroxinitrito: formação de ácido peroxinitroso.....	61
Equação 9. Síntese de peroxinitrito: desprotonação do ácido peroxinitroso.....	61
Equação 10. Cálculo para obtenção do valor do calor liberado ou absorvido pela amostra durante a transição (dH/dt).....	76
Equação 11. Frequência de absorção de um núcleo.....	78

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AF	— ácido fosfatídico
AF:PC	— razão entre as concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina
\bullet Asc	— radical ascorbil
AscH ₂	— ácido ascórbico
ASO	— asolecitina de soja
B ₀	— campo magnético externo
B ₁	— campo magnético gerado pelo pulso de radio frequência no sistema
CFC	— gás cloro-flúor-carbono
DHA	— ácido dehidroascórbico
DMPO	— 5,5-dimetilpirrolina
DNA	— ácido desoxiribonucleico
Doxil	— N-oxil-4'-4'-dimetiloxazolidina
DSC	— calorimetria de varredura diferencial
ΔH	— variação de entalpia
ΔG	— variação da energia livre de Gibbs
ΔS	— variação da entropia
ΔT	— variação de temperatura
δ	— deslocamento químico
EPR	— ressonância paramagnética eletrônica
EROs	— espécies reativas de oxigênio

ERNs	— espécies reativas de nitrogênio
FID	— decaimento de indução livre
H _{II}	— fase hexagonal invertida
IC ₅₀	— concentração de um composto que inibe em 50% a lipoperoxidação
L _α	— fase líquido-cristalina
L _β	— fase gel
LPO	— lipoperoxidação
LUVs	— vesículas grandes unilamelares
MC	— microsomas de fígado de rato
MDA	— malonildialdeído
Mito	— mitocôndria
MLVs	— vesículas grandes multilamelares
MPO	— mieloperoxidase
NO [•]	— monóxido de nitrogênio
NOS	— óxido nítrico sintase
NTYR	— 3-nitrotirosina
—N ⁺ (CH ₃) ₃ EXT	— colina pertencente à monocamada externa na membrana
—N ⁺ (CH ₃) ₃ INT	— colina pertencente à monocamada interna na membrana
O ₂ ^{•-}	— radical ânion superóxido
•OH	— radical hidroxil
ONOO ⁻	— peroxinitrito
Pβ'	— fase hexagonal periódica

PC	— fosfatidilcolina
PE	— fosfatidiletanolamina
PI	— fosfatidilinositol
PO	— efeito pró-oxidante
PP	— parâmetro de empacotamento
RMN DE ¹ H	— ressonância magnética nuclear de ¹ H
SUVs	— pequenas vesículas unilamelares
TBA	— ácido tiobarbitúrico
TBARS	— substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico
TCA	— ácido tricloroacético
Tm	— temperatura de transição de fases
TEMPO	— 1-oxil-2,2,6,6,-tetrametilpiperidina
XOD	— xantina oxidase
4-HDA	—4-hidroxiacnaldeído

RESUMO

A lipoperoxidação de membranas biológicas, induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito foi investigada em diversos modelos de membranas. Estes modelos consistiram em: i) lipossomas compostos por fosfatidilcolina de ovo; ii) lipossomas contendo asolecitina de soja; iii) lipossomas compostos por uma mistura de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina em diferentes razões de concentração; iv) microssomas de fígado de rato. As variações de entalpia e distribuição lipídica na bicamada, ocasionadas pela incorporação de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina foram investigadas através de calorimetria de varredura diferencial e ressonância magnética nuclear de ^1H , respectivamente. Também foi analisada a inibição do processo lipoperoxidativo pelos antioxidantes naturais quercetina, melatonina e vitamina B₆. Os níveis de lipoperoxidação variaram em função das espécies reativas, dos antioxidantes e da composição das membranas. O potencial oxidante das espécies reativas em lipossomas de fosfatidilcolina e em microssomas de fígado de rato apresentou a seguinte ordem de potência: radical hidroxil \approx radical ascorbil $>$ peroxinitrito, enquanto que em lipossomas de asolecitina tal ordem apresentou-se como: radical ascorbil $>$ radical hidroxil \approx peroxinitrito. A presença de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina, nas concentrações testadas, promoveu uma queda no percentual de lipoperoxidação induzida pelas três espécies reativas utilizadas. Da mesma forma, concentrações crescentes de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina proporcionaram uma redução dos valores de variação de entalpia (ΔH) nas membranas, o que sugere um rearranjo de suas cadeias apolares para uma forma mais ordenada e estável. Os resultados envolvendo a distribuição de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina indicaram a viabilidade do uso de sais de ferrocianeto como reagentes de deslocamento para detectar a razão entre as quantidades de fosfatidilcolina presentes

na monocamada externa e interna da membrana, através de RMN de ^1H , visto que os resultados obtidos apresentaram-se de acordo com os dados documentados na literatura. Dentre os antioxidantes testados, as concentrações de melatonina necessárias para inibir em 50% os danos lipoperoxidativos nas membranas testadas apresentaram as maiores diferenças em função do tipo de espécie reativa e da composição das membranas. Uma caracterização pioneira foi realizada sobre o efeito protetor de vitamina B₆ contra a lipoperoxidação induzida por espécies reativas de nitrogênio em membranas. Os resultados foram discutidos de forma a contribuir para uma visão mais completa sobre a influência do comportamento intrínseco de membranas, espécies oxidantes e antioxidantes na dinâmica da lipoperoxidação.

ABSTRACT

Membrane lipid peroxidation induced by hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite was investigated in egg phosphatidylcholine, soy asolectin and egg phosphatidylcholine / phosphatidic acid mixtures liposomes as well as in rat liver microsomes. Enthalpy variation (ΔH) and the distribution of phospholipids on phosphatidylcholine: phosphatidic acid in different molar ratios in liposomes were obtained by differential scanning calorimetry and ^1H -nuclear magnetic resonance, respectively. It was also evaluated the lipid peroxidation inhibition by quercetin, melatonin and vitamin B₆. The distinct responses obtained in this study can be explained through the membrane polyunsaturated phospholipid contents and through the intrinsic behavior of reactive species and antioxidants involved in the lipid peroxidation assays. The oxidant effect power follows the order hydroxyl radical \approx ascorbyl radical $>$ peroxynitrite on phosphatidylcholine and rat liver microsomes, whilst on asolectin liposomes it follows the order ascorbyl radical $>$ hydroxyl radical \approx peroxynitrite. Increasing amounts of phosphatidic acid in phosphatidylcholine liposomes resulted in lower levels of lipid peroxidation. The ΔH values indicate a more ordered membrane arrangement as a function of phosphatidic acid amount. The lipid distribution in the bilayers containing phosphatidic acid and phosphatidylcholine demonstrated that ferrocyanide salts are suitable shift reagents to measure the outside/inside ratio of phosphatidylcholine using ^1H -NMR. The results obtained in this experiment are in accordance with other results described in the literature. The differences in the antioxidant concentration-answer curves were more evident with melatonin. The responses obtained with vitamin B₆ group allowed a first characterization of its protective effect against membrane peroxidation induced by reactive nitrogen species. The results were discussed in order

to provide a more complete view involving the influence of membranes, oxidants and antioxidants intrinsic behavior on the lipid peroxidation dynamics.

1. INTRODUÇÃO

As membranas biológicas, matrizes basicamente lípidio-protéicas organizadas em bicamadas, determinam as características estruturais e funcionais das células eucarióticas, através da interação entre fatores relacionados com a sua composição química, seu estado físico e modo de organização ^{1,2}.

A permeabilidade das membranas celulares, bem como as atividades enzimáticas relacionadas, estão diretamente associadas ao seu grau de fluidez. A fluidez da membrana, por sua vez, pode sofrer modificações propiciadas por processos de lipoperoxidação (LPO) induzida por Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e de Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) em fosfolipídios ^{3,4}. A lipoperoxidação é um processo altamente destrutivo associado a eventos patológicos como diabetes, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), danos por isquemia e reperfusão, processos inflamatórios crônicos, doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, dentre outros, conforme apresentado na tabela 1 ^{5, 6-9}.

A extensão do dano lipoperoxidativo causado por espécies reativas está associada à diferenciação qualitativa e quantitativa dos constituintes fosfolipídicos em função dos tecidos do organismo. As células neuronais, por exemplo, são ricas em esfingomiéline, enquanto que a membrana de mitocôndrias hepáticas é constituída por fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, diacilglicerol e fosfatidiletanolamina ^{1,10}. A figura 1 representa a estrutura de alguns dos fosfolipídios associados a neurônios ou a mitocôndrias hepáticas.

A heterogeneidade da composição fosfolipídica em membranas biológicas também afeta o potencial de sistemas antioxidantes contra os danos causados pela lipoperoxidação induzida por espécies reativas ¹².

EVENTOS PATOLÓGICOS ASSOCIADOS A LPO INDUZIDA POR EROs E ERNs

CATEGORIA	EXEMPLOS
Isquemia/ reperfusão	Derrame cerebral, infarto do miocárdio, arritmias, angina, choque (perda temporária da função do miocárdio).
Danos imunes/ processos inflamatórios	Glomerulonefrites, vasculites, doenças auto-imunes, artrite reumatóide, hepatites.
Doenças neurodegenerativas	Doença de Alzheimer, doença de Parkinson, síndrome de Down, esquizofrenia, danos nervosos induzidos por xenobióticos, apoptose neuronal.
Danos oxidativos ao DNA	Câncer

Tabela 1- Eventos patológicos associados a lipoperoxidação (LPO) induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ^{8,9}.

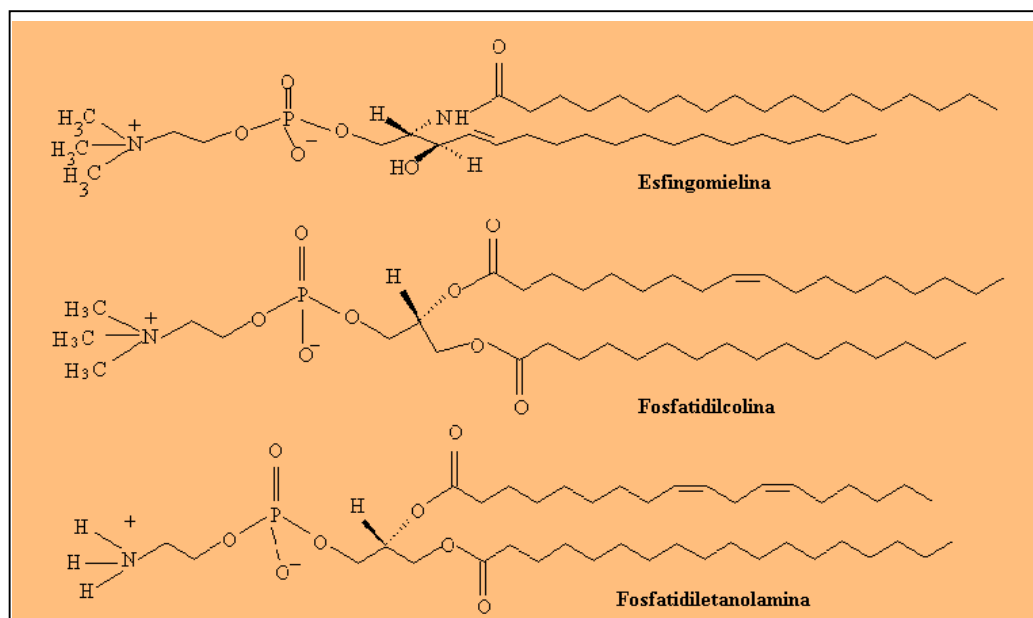


Figura 1- Estrutura de alguns fosfolipídios presentes em neurônios e mitocôndrias hepáticas¹¹.

As células apresentam defesas antioxidantes que podem ser classificadas em: i) enzimáticas, que incluem as superóxido dismutases, catalases e glutathione peroxidases; ii) não enzimáticas endógenas, tais como glutathione reduzida e o composto indólico melatonina; iii) não enzimáticas exógenas, dentre as quais podem ser citados os compostos fenólicos, como flavonóides e vitaminas como α -tocoferol (vitamina E) e vitamina B₆⁸. Os mecanismos de ação de defesas antioxidantes incluem: i) atividades inibidoras da produção de radicais livres, induzida por metais de transição; ii) atividades inibidoras de reações em cadeia; e iii) atuações através de mais de um mecanismo, ou “mecanismos mistos de ação”¹³.

Indolaminas, como a melatonina, demonstraram atividade antioxidante através do seqüestro de radicais livres, como o radical hidroxil¹⁴. Em situações de estresse oxidativo, em que a membrana torna-se mais rígida, a melatonina pode estabilizá-la a um nível de fluidez ótimo¹⁵.

As propriedades antioxidantes de compostos polifenólicos de plantas, como os flavonóides, podem estar relacionadas com as suas atividades como agentes redutores, doadores de hidrogênio e/ou seqüestradores de oxigênio singlete¹⁶. Flavonóides interagem com lipídios como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina, modificando a fluidez da membrana, o que parece ser um mecanismo adicional através do qual promove sua atividade antioxidante na bicamada^{17,18}.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para investigar as propriedades físico-químicas de membranas, e os efeitos causados nas mesmas após suas interações com espécies reativas e antioxidantes. Dentre tais técnicas, podem ser citadas a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorção UV-visível, ressonância paramagnética eletrônica (EPR), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e ressonância magnética nuclear (RMN)^{5, 19-21}.

A técnica de DSC permite a caracterização termodinâmica do comportamento de fase em bicamadas lipídicas ⁵. Esta técnica pode ser utilizada para o estudo do efeito causado por interações entre fosfolipídios no comportamento termodinâmico de fase de bicamadas hidratadas. A interação de fármacos com modelos de membrana também pode ser investigada por DSC ²²⁻²⁴.

A técnica de RMN é uma das mais potentes no estudo de membranas biológicas e modelos de membrana ²⁵. Esta técnica pode ser utilizada para pesquisas que envolvem a elucidação estrutural de membranas, velocidade de movimentos conformacionais e translacionais, ordem e reorientação molecular, e polimorfismo dos lipídios ^{25,26}. Estudos com RMN de ¹H investigaram a distribuição fosfolipídica em modelos de membranas binárias, bem como a permeabilidade de lipossomas a íons ^{27,28}.

Devido à quantidade e diversidade de patologias associadas com a lipoperoxidação de membranas celulares, torna-se importante investigar a influência das interações entre fosfolipídios, bem como o comportamento intrínseco de espécies reativas e antioxidantes no favorecimento ou inibição do processo lipoperoxidativo. A susceptibilidade de lipossomas a lipoperoxidação induzida por espécies reativas de oxigênio está consideravelmente documentada na literatura ^{7,12,29}, o que não pode ser afirmado para o dano oxidativo induzido por espécies reativas de nitrogênio. Da mesma forma, os estudos que abordam o efeito antioxidante de vitamina B₆, atualmente estão restritos ao potencial da vitamina contra a espécie ânion superóxido ³⁰.

Neste trabalho, diferentes modelos de membrana foram avaliados, considerando a susceptibilidade a lipoperoxidação induzida por espécies reativas, bem como as interações com antioxidantes naturais. Para isto, os níveis de lipoperoxidação, induzidos por radicais hidroxil e ascorbil e por peroxinitrito (ONOO⁻), foram quantificados em lipossomas e em microssomas de fígado de rato (MC). Três composições lipossomais foram utilizadas: i) asolecitina de soja, que

possui como componentes majoritários a fosfatidilcolina, o fosfatidilinositol e a fosfatidiletanolamina ³¹; ii) fosfatidilcolina de ovo fresco, que apresenta diversos ácidos graxos saturados e insaturados em sua composição; iii) uma mistura contendo diferentes razões de concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC). Os microsomas de fígado de rato possuem, adicionalmente aos fosfolípidos e ácidos graxos, sistemas enzimáticos em sua composição ^{32,33}, uma variável diferencial em comparação aos modelos de lipossomas utilizados.

A influência de relações inter-fosfolípídicas na susceptibilidade da membrana ao dano induzido pelas três espécies reativas citadas, foi investigada a partir de ensaios de lipoperoxidação, em lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina. Para melhor entendimento de tais influências, a investigação foi direcionada para o estudo das modificações causadas pela incorporação de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina. Neste sentido, foram avaliados o comportamento termodinâmico de fase da bicamada, através de medidas de DSC, e a distribuição fosfolípídica do modelo de membrana, através do uso da técnica de RMN de ¹H.

A percentagem de inibição dos danos lipoperoxidativos nas membranas, induzidos por espécies reativas, após interação das bicamadas com os antioxidantes naturais quercetina, melatonina e vitamina B₆ também foi determinada.

Os resultados obtidos neste trabalho foram discutidos de forma a contribuir para um ponto de vista amplo e singular sobre a dinâmica da lipoperoxidação, induzida não somente por espécies reativas de oxigênio, como também por espécies reativas de nitrogênio, em membranas. A compreensão desta dinâmica é relevante para o desenvolvimento de terapias preventivas e curativas dos eventos patológicos associados a este processo oxidativo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MEMBRANAS CELULARES: FUNÇÕES, COMPOSIÇÃO LIPÍDICA, ESTADO FÍSICO E ORGANIZAÇÃO.

Membranas biológicas são responsáveis pelas características estruturais e funcionais das células eucarióticas. São consideradas como centro de regulação da atividade celular, e fundamentais para conservação da energia biológica. As funções básicas das membranas celulares são: delimitar compartimentos intra e extracelulares; criar gradientes químicos e elétricos, para regular o transporte de solutos nos compartimentos internos e externos da célula; controlar a atividade das enzimas de membranas, acomodando-as de forma que exerçam suas funções metabólicas de modo coordenado; fornecer substratos para o metabolismo como, por exemplo, ácido aracdônico para síntese de prostaglandinas; e favorecer a transdução de sinais ^{1,34}. Também possuem funções importantes durante os processos de endocitose, exocitose, divisão, fusão e comunicação intercelular ^{1,35}.

As funções das membranas são determinadas pela inter-relação de três fatores: i) composição química; ii) estado físico; e iii) modo de organização da bicamada. Estas inter-relações estão mostradas na figura 2.

As membranas são compostas por uma matriz de lipídios, distribuídos de forma heterogênea, na qual cerca de 10^9 moléculas de diversas espécies, como proteínas e polipeptídeos, estão inseridas e mantidas na interface ³⁶⁻³⁸. Existe uma variedade quantificada em mais de 2000 lipídios nas membranas de mamíferos. Os lipídios podem ser classificados, de acordo com sua estrutura, em fosfolipídios, esfingolipídios e glicolipídios ¹. A composição

química das membranas determina suas propriedades físicas de carga líquida, potencial de dipolo, propriedades elásticas, comportamento de transição de fases e hidratação, dentre outras ².

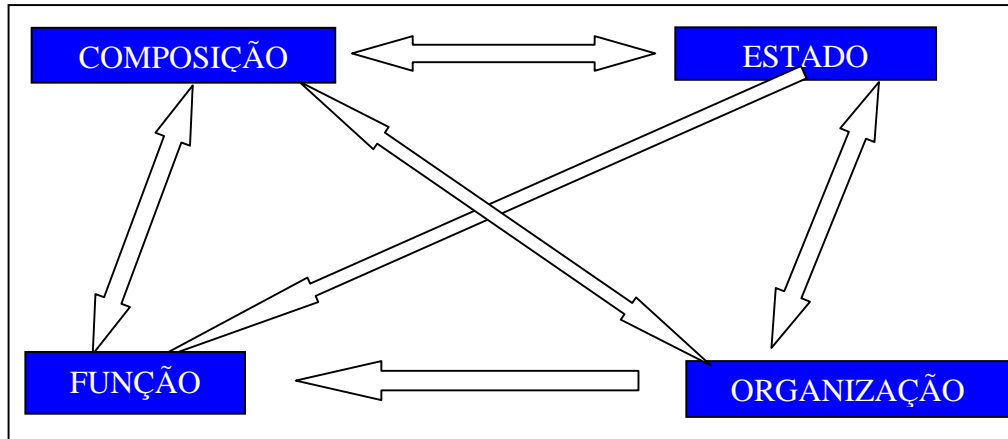


Figura 2- Conexões entre composição, estado físico, organização e funções das membranas ².

Como citado anteriormente, a composição heterogênea das membranas celulares está intimamente relacionada com seu estado físico ^{37,39}. Os estados podem variar entre fases líquido-cristalinas (L_{α}) e gel (L_{β}), típicas de bicamadas lipídicas; fase hexagonal invertida (H_{II}), caracterizada pela ausência da organização dos componentes de membrana em bicamadas; e outros estados intermediários que ocorrem em transições de fase, como por exemplo, a fase hexagonal periódica (P_{β}) ^{36,40}. Estes estados da membrana são influenciados por diversos fatores, como temperatura, potencial de membrana, forças osmóticas, vibração “stretching” dos componentes e presença de solutos na fase aquosa, dentre outros ².

A composição química e o estado físico das membranas propiciam as interações entre os seus componentes, determinando a forma como os mesmos organizam-se ². Os lipídios estão organizados estruturalmente em bicamadas assimétricas, nas quais faces hidrofílicas

proporcionadas pelas regiões polares dos lipídios estão direcionadas para o meio aquoso citoplasmático e extracelular ^{1,36}. Entre estas faces polares, estão localizados os centros hidrofóbicos dos lipídios, protegidos da exposição ao meio aquoso extracelular ^{41,42}. A estrutura da membrana celular está representada na figura 3.

Dentre as forças associadas à manutenção do arranjo lipídico em bicamada no meio aquoso, estão incluídas as ligações de hidrogênio e outras provindas de interações hidrofílicas (entre as cadeias polares dos lipídios), e as forças de Van der Waals (entre as cadeias hidrofóbicas lipídicas) ⁴³. Existem ainda forças associadas às interações entre as cadeias polares e/ou apolares com o meio aquoso. Interações entre as cadeias hidrofóbicas dos lipídios e o meio aquoso estabelecem e caracterizam o efeito hidrofóbico, que é imprescindível para manter o arranjo lipídico sob forma de bicamada ³⁶. Estas interações são energeticamente desfavoráveis, devido às contribuições oferecidas por uma variação de entropia no sistema de valor negativo ($\Delta S < 0$). Tais valores de ΔS contribuem para um valor positivo da variação da energia livre de Gibbs (ΔG). , visto que esta é calculada pela equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{(Equação 1),}$$

em que ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura absoluta e ΔS , a variação de entropia do sistema. Por outro lado, as interações entre as cabeças polares lipídicas e a água direcionam a ΔG para um valor menos positivo, caracterizando tais interações como sendo de ocorrência mais espontânea, quando comparada às que envolvem as cadeias apolares ¹.

As inter-relações que envolvem a composição química, o estado físico e o modo de organização da membrana, estão associadas à dinâmica lipídica. Esta dinâmica pode determinar propriedades físico-químicas da membrana, como a fluidez. As influências causadas pela

composição lipídica, estado físico e modo de organização sobre a dinâmica lipídica serão discutidas adiante com mais detalhes.

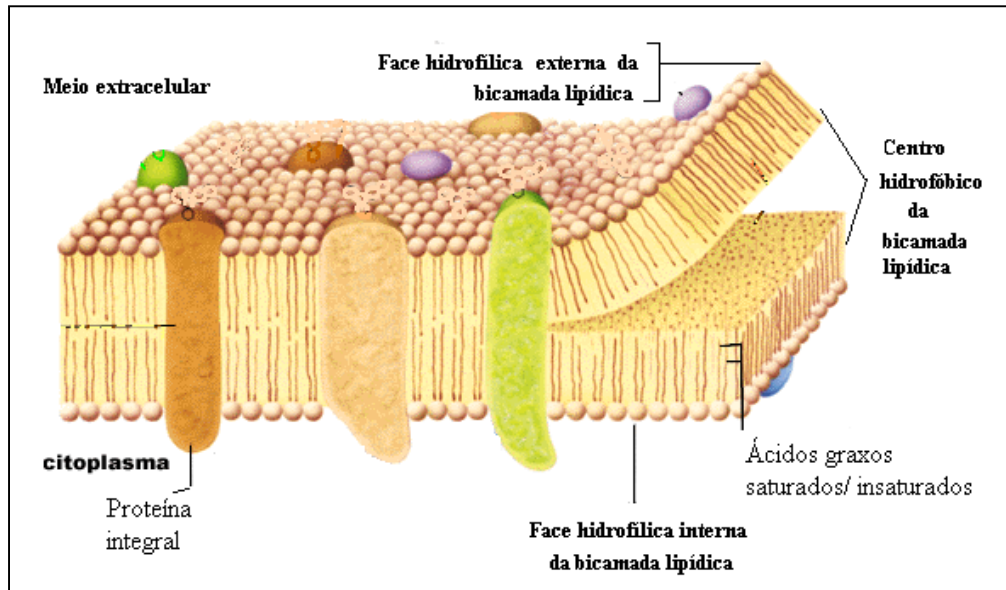


Figura 3- Estrutura básica da membrana celular ⁴⁴.

2.1.1. FOSFOLIPÍDIOS DE MEMBRANAS CELULARES

Os lipídios de membrana geralmente possuem estrutura anfipática, contendo assim uma porção hidrofílica, denominada cabeça polar, e outra hidrofóbica, conhecida por cauda apolar (figura 4) ¹.

A cabeça polar pode ser constituída por grupos fosfato, amina e álcool, e a cauda apolar contém cadeias de ácidos graxos. De acordo com suas características estruturais, os lipídios de membrana podem ser classificados em : i) fosfolipídios; ii) esfingolipídios; iii) glicolipídios e iv) esteróis ¹. Com o objetivo de focalizar na proposta deste trabalho, somente os fosfolipídios serão abordados de forma detalhada.

A estrutura química dos fosfolipídios caracteriza-se por conter duas cadeias de ácidos graxos que sofreram esterificação com um glicerol, cujo carbono na posição 3' apresenta ligações éster com um grupo fosfato. Este último está unido, também através de esterificação, a um grupo álcool^{1,45}. A estrutura química dos fosfolipídios está representada na figura 5. A tabela 2 mostra os diversos grupos álcoois que podem estar presentes na cabeça polar dos fosfolipídios.

A fosfatidilcolina é o fosfolipídio de constituição majoritária na membrana celular^{1,45}. Fosfatidilcolinas naturais apresentam uma cabeça polar constituída por um grupo fosfocolina zwitteriônico. Estes fosfolipídios também possuem duas cadeias de ácidos graxos de extensão similar. A cadeia apolar ligada ao carbono 1' do glicerol apresenta-se geralmente saturada, enquanto que a cadeia ligada ao carbono 2' costuma possuir insaturações (figuras 4 e 5). A cadeia ligada ao carbono 2' do glicerol contém geralmente de uma a seis duplas ligações, na conformação cis⁴⁶.

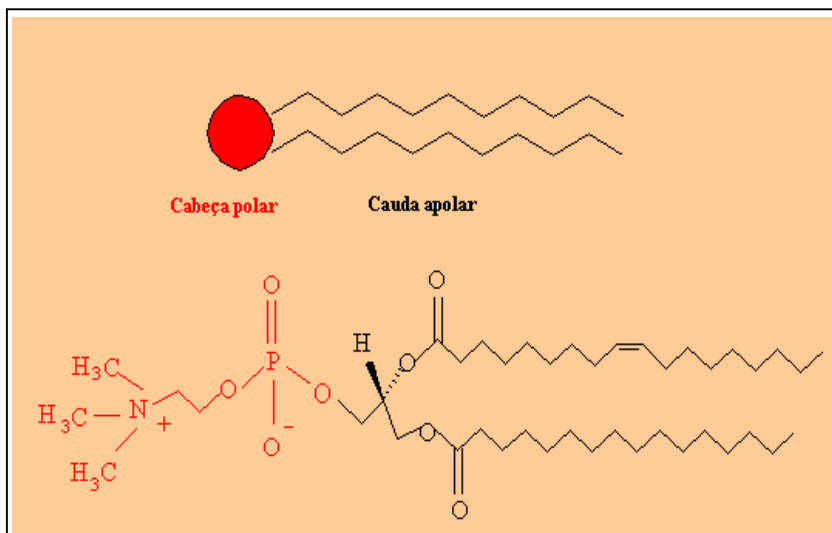


Figura 4- Representação esquemática da estrutura de um lipídio (superior) e estrutura da fosfatidilcolina (inferior). Em vermelho, a cabeça polar; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas do lipídio^{1,11}.

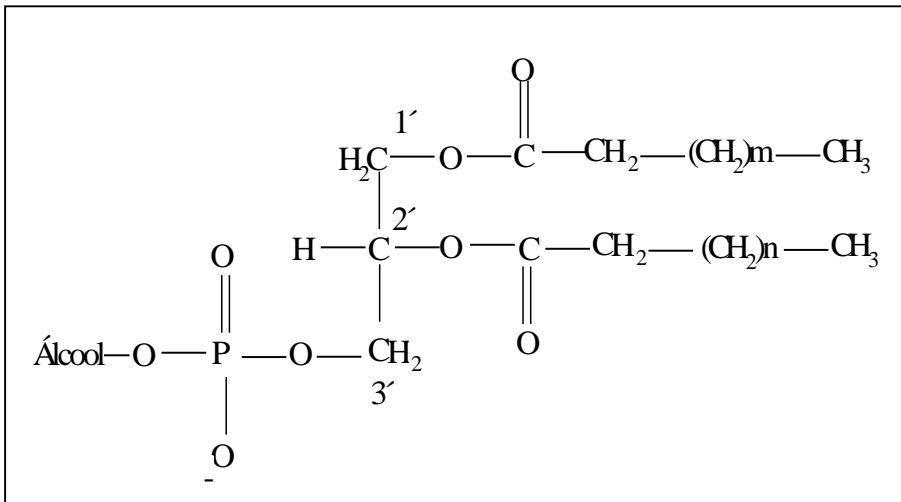


Figura 5- Estrutura geral de fosfolipídios ¹.

FUNÇÕES ÁLCOOL PRESENTES EM FOSFOLIPÍDIOS DE MEMBRANA	
FUNÇÃO ÁLCOOL	ESTRUTURA
Colina	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$
Etanolamina	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{NH}}_3$
Serina	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \underset{\text{COO}^-}{\text{CH}} - \overset{+}{\text{NH}}_3$
Glicerol	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{CH}_2\text{OH}$
Inositol	

Tabela 2- Estrutura dos grupos álcoois presentes na composição dos fosfolipídios ¹.

O parâmetro de empacotamento (PP, abreviatura da expressão em inglês “packing parameter”) relativo a fosfatidilcolinas aproxima-se da unidade. Isto significa que estes fosfolípidios apresentam conformação cilíndrica e tendem a adquirir uma organização em bicamada, quando em meio aquoso. Para efeito de comparação, moléculas com PP muito inferior ou superior a 1, tendem a associarem-se na forma de micelas ou em estruturas hexagonais invertidas. Este parâmetro é definido por:

$$PP = V / a l_c \quad \text{(Equação 2),}$$

Em que V corresponde ao volume hidrofóbico; a , à área de superfície média ocupada pela região polar na interface ar/água; e l_c , ao comprimento das cadeias alquílicas do fosfolípido ^{47,48}.

O empacotamento da bicamada de fosfatidilcolina parece ser determinado pela organização de seus grupos glicerol, de forma a regular a permeabilidade de bicamada ⁴⁹. As fosfatidilcolinas distribuem-se principalmente na monocamada externa da membrana celular ^{50,51}.

A principal função das fosfatidilcolinas é manter a estrutura e organização das membranas celulares ⁴⁵. Participam também da sinalização celular, atuando como um reservatório de mensageiros lipídicos secundários. As fosfatidilcolinas são fontes de lipídios bioativos como diacilgliceróis, fatores de ativação plaquetária, ácido aracdônico, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico ⁵²⁻⁵⁶.

A cabeça polar da fosfatidiletanolamina (figura 6) contém um grupo amino livre, e ocupa menos espaço em relação às cadeias de ácidos graxos. A relação entre as áreas ocupadas pela cabeça polar e as cadeias hidrofóbicas da fosfatidiletanolamina proporciona ao aminofosfolípido o formato de um cone ¹. Os aminofosfolípidios possuem a tendência de formar estruturas não lamelares, isto é, sem a organização em bicamada, como em fases hexagonais invertidas (H_{II}) (figura 7) ou fases cúbicas ⁴⁵.

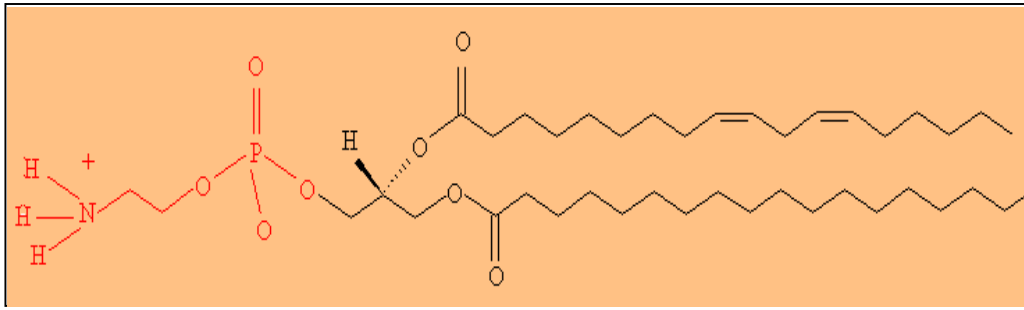


Figura 6- Estrutura da fosfatidiletanolamina. Em vermelho, a cabeça polar fosfoetanolamina; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas do lipídio¹¹.

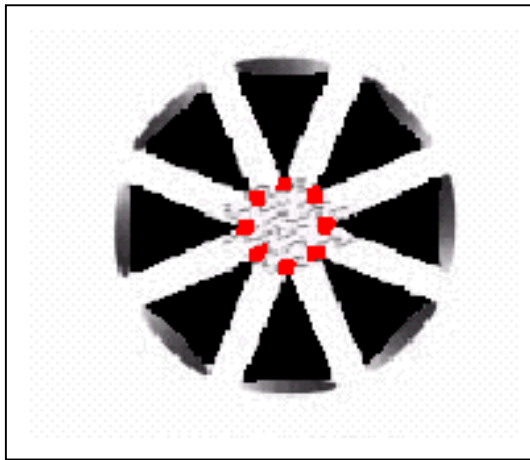


Figura 7- Representação esquemática de aminofosfolipídios em fase hexagonal invertida (H_{II}). Em vermelho, a cabeça polar destes fosfolipídios; em preto, o glicerol e as cadeias apolares⁵⁷.

Quando os aminofosfolipídios são forçados em uma estrutura planar, como em uma bicamada, distribuem-se preferencialmente na monocamada interna. Nestas condições, a pressão intrínseca na parte hidrofóbica da membrana é aumentada^{50,51,57}. Estas variações na tensão das cadeias hidrofóbicas parecem regular a atividade e dobramento das proteínas inseridas na membrana plasmática⁵⁷. Dentre outros processos regulados pelos aminofosfolipídios, podem ser citados a coagulação sangüínea, adesão celular e endocitose⁵⁸⁻⁶⁰.

O fosfatidilinositol contém, como a fosfatidilcolina, uma cadeia hidrofóbica saturada ligada ao carbono 1' do glicerol, e uma cadeia insaturada ligada ao carbono 2' (figura 8)⁴⁵.

Possui um grupo fosfoinositol em sua cabeça polar, o que confere uma carga negativa a este lipídio. O fosfatidilinositol ainda pode sofrer fosforilações. De acordo com o número de fosfatos extras, que podem unir-se por ligações éster as suas hidroxilas, o fosfolipídio pode denominar-se como di- ou tri- fosfatidilinositol. Tais fosfatos extras propiciam cargas adicionais ao fosfatidilinositol, distribuídas ao longo da superfície da membrana celular. Desta forma, a presença de fosfatidilinositol, bem como a de outros fosfolipídios negativamente carregados, influencia a carga total da superfície da membrana ¹. O fosfatidilinositol parece ter papel importante na sinalização celular e no deslocamento dos lipídios de membrana ⁶¹.

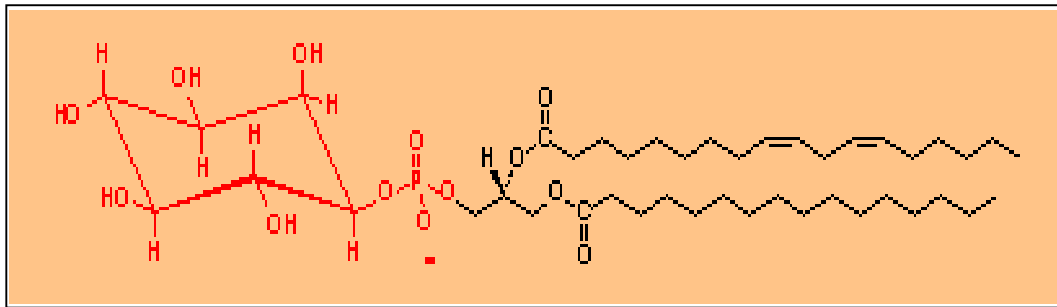


Figura 8- Estrutura do fosfatidilinositol. Em vermelho, a cabeça polar fosfoinositol; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas do lipídio¹¹.

O fosfatidilinositol pode facilmente organizar-se em bicamadas e, na membrana celular, parece estar principalmente localizado na monocamada interna ^{62,63}.

Dentre os fosfolipídios presentes na membrana celular, os ácidos fosfatídicos possuem a estrutura química mais simples. Estes fosfolipídios não possuem o substituinte álcool ligado ao seu grupo fosfato (figura 9) ^{1,64}. Os estudos associados à distribuição de ácido fosfatídico na bicamada lipídica apresentam resultados controversos ^{27,65}, como será discutido adiante neste trabalho. Por ser um importante intermediário biosintético na síntese de triacilglicerol e

diacilglicerol, o ácido fosfatídico ocorre de forma minoritária nas membranas celulares ^{1,66}. Está associado aos processos de proliferação, mobilidade, agregação celular e processos de fusão e transporte na membrana ⁶⁵⁻⁶⁸. Como o fosfatidilinositol, o ácido fosfatídico é um agente indutor de carga negativa na membrana celular ^{63,69}.

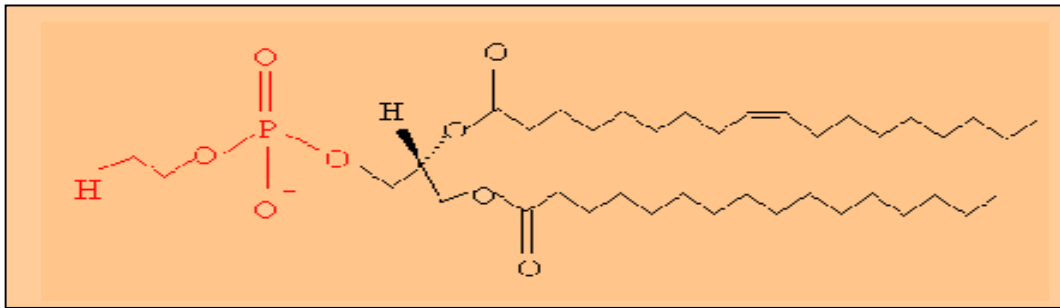


Figura 9- Estrutura do ácido fosfatídico (AF). Em vermelho, a cabeça polar fosfato sem substituintes; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas do lipídio ¹¹.

A presença de cargas nas membranas celulares acarreta fenômenos eletrostáticos que influenciam a conformação, atividade e transporte de várias moléculas, e controlam parcialmente o reconhecimento intra e intercelular ⁷⁰.

Membranas celulares contêm numerosos íons e grupos polares, como os propiciados por fosfolipídios, apresentando assim uma carga de superfície (figura 10). A presença de cargas na superfície da bicamada pode atrair contra-íons, bem como influenciar a distribuição dos mesmos na interface membrana-meio aquoso ^{70,71}. O fluxo de difusão de contra-íons ao longo desta interface propicia um potencial de superfície, que pode atrair e regular as atividades funcionais de diversas espécies, como a proteína kinase C ^{71,72}.

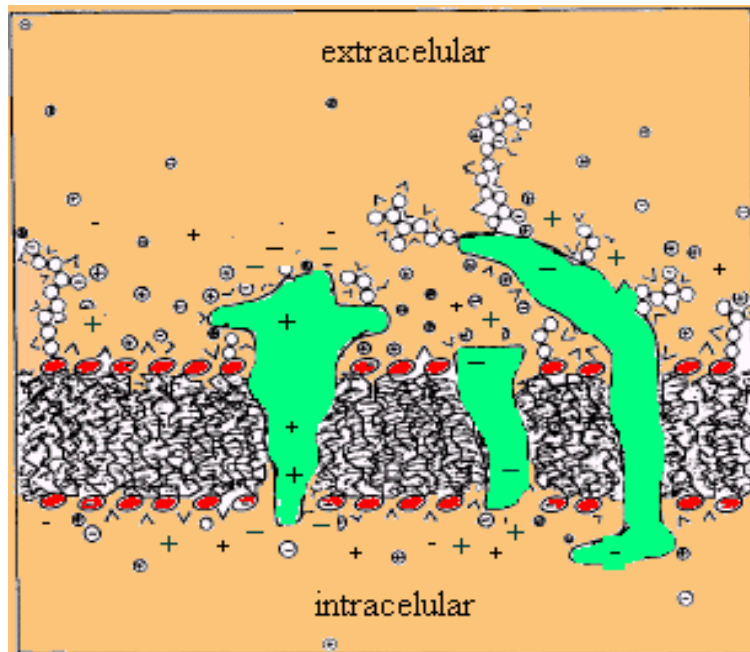


Figura 10- Representação esquemática de uma membrana biológica do ponto de vista eletrostático. Em vermelho, as faces hidrofílicas da membrana, constituída pelas cabeças polares dos lipídios; em preto, o centro hidrofóbico da membrana; em verde, proteínas inseridas na bicamada. Adaptada de Cevc ⁷⁰.

Estudos em bicamadas de fosfatidilcolinas demonstraram a presença de associações eletrostáticas interfosfolipídios entre o grupo amônio e o grupo fosfato. Estes estudos ressaltaram a importância da carga presente na cabeça polar da fosfatidilcolina para manutenção do arranjo em bicamada da membrana ⁷³. Outras interações influenciadas por cargas de superfície envolvem antioxidantes e membranas fosfolipídicas, como demonstrado em experimentos *in vitro* com Trolox, a forma hidrossolúvel da vitamina E, em vesículas fosfolipídicas de diferentes cargas ²⁹.

A diversidade das estruturas associadas à cadeia polar dos fosfolipídios torna-se menos complexa quando comparada à variedade de cadeias de ácidos graxos que cada tipo de

fosfolípido pode apresentar. As diversas composições de ácidos graxos são peculiares a cada classe de fosfolípido e tipo de membrana ¹. Os ácidos graxos podem possuir cadeias alquílicas saturadas e/ou insaturadas, e regulam a permeabilidade das membranas a substâncias hidrofílicas⁷⁴.

2.1.2. ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DE MEMBRANAS CELULARES

Cada classe de fosfolípidos possui uma composição típica de ácidos graxos, influenciada pela sua origem tecidual ¹. As diferenças na composição de ácidos graxos em fosfatidilcolinas de ovo fresco e de soja são mostradas na tabela 3.

A tabela 4 apresenta alguns ácidos graxos saturados e insaturados presentes em membranas biológicas.

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ENCONTRADOS EM PC DE OVO FRESCO E EM PC DE SOJA			
ÁCIDO GRAXO	SÍMBOLO	% EM PC DE OVO	% EM PC DE SOJA
Palmítico	16:0	34	17
Palmitoleico	16:1	2	-
Estearico	18:0	11	6
Oléico	18:1	32	13
Linoleico	18:2	18	59
Linolênico	18:3	-	5
Aracdônico	20:4	3	-

Tabela 3- Percentual de ácidos graxos presentes em fosfatidilcolina de ovo fresco e fosfatidilcolina de soja ^{1,11}. Símbolo= número de carbonos da cadeia: (número de insaturações).


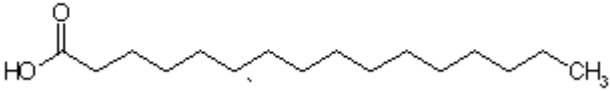
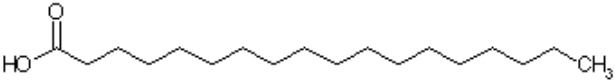
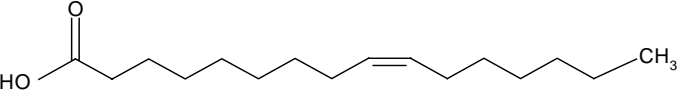
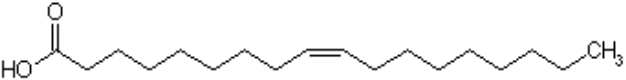
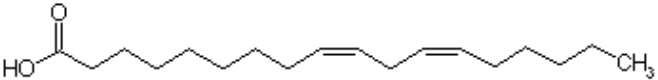
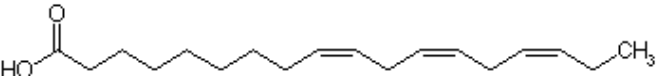
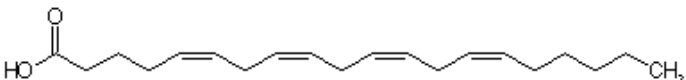
ÁCIDOS GRAXOS COMUNS EM MEMBRANAS BIOLÓGICAS		
SÍMBOLO	NOME POPULAR	ESTRUTURA
Saturados		
14:0	Ácido mirístico	
16:0	Ácido palmítico	
18:0	Ácido esteárico	
Insaturados		
16:1	Ácido palmitoleico	
18:1	Ácido oléico	
18:2	Ácido linoleico	
18:3	Ácido linolênico	
20:4	Ácido aracdônico	

Tabela 4- Estrutura de ácidos graxos presentes em membranas biológicas ¹.

Os ácidos graxos encontrados na membrana celular de animais são, em sua maior parte, polienólicos. Contêm ligações duplas de conformação predominantemente cis que, por sua vez, apresentam um arranjo polialfílico ⁷⁵.

Dados de cristalografia de raio-X determinaram que a presença de uma insaturação cis na porção alquílica dos ácidos graxos ocasiona um desvio no ângulo entre ligações. Este desvio angular resulta na inclinação da cadeia alquílica ⁷⁶, conforme mostrado na figura 11.

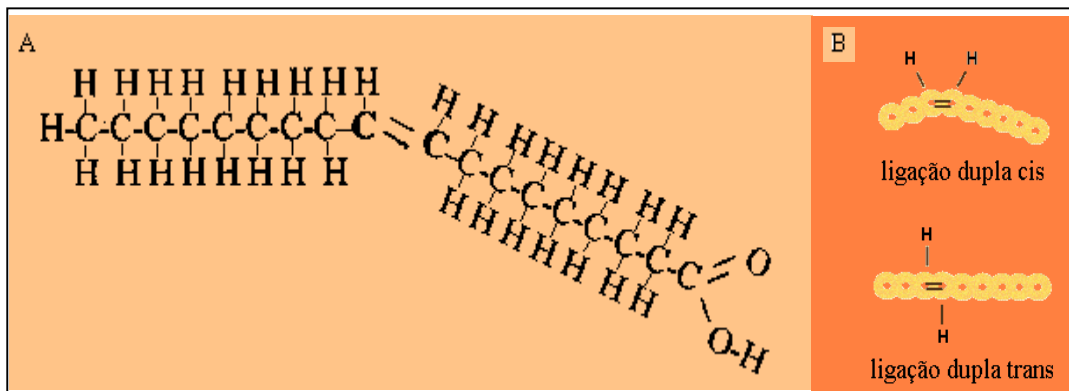


Figura 11- A) Estrutura do ácido cis-oleico; B) inclinação da cadeia alquílica propiciada pela ligação dupla cis, comparada a cadeia contendo uma ligação trans ^{76,77}.

O ângulo entre uma ligação simples de carbono e uma insaturação cis é de 123° , enquanto que o ângulo entre duas ligações simples de carbono é de 111° . Por esta diferença, o empacotamento inter-cadeias torna-se mais difícil, em relação ao empacotamento de ácidos graxos saturados, à medida que o número de insaturações aumenta. Isto propicia uma desordem na cadeia e um menor grau de rigidez na membrana ^{76,78}. O efeito da presença de insaturações cis na cadeia alquílica no empacotamento da bicamada está representado na figura 12.

Ao influenciar a ordem do arranjo lipídico e, por conseqüência, seu grau de mobilidade, as configurações cis e trans das cadeias alquílicas influenciam o estado físico da membrana ⁷⁴.

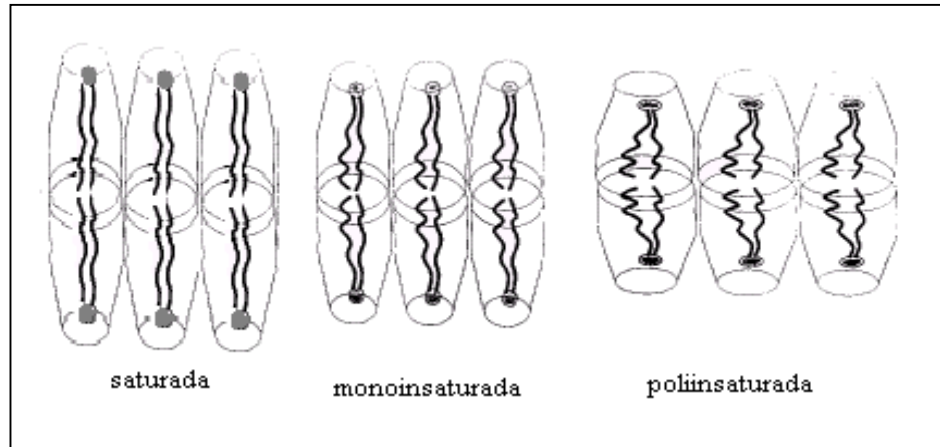


Figura 12- Representação esquemática do empacotamento lipídico em bicamadas de fosfatidilcolinas saturadas, monoinsaturadas e poliinsaturadas⁷⁹.

Através dos efeitos decorrentes dos graus de insaturação e do arranjo polialfílico da cadeia apolar lipídica, os ácidos graxos podem ser associados a processos de fusão da membrana^{80,81}, modulação da atividade enzimática ligada a membrana^{82,83} e adesão celular^{84,85}, e manutenção ou alteração da permeabilidade^{86,87}.

Como pode ser observado, a presença de insaturações na cadeia de ácidos graxos exerce uma influência profunda nas propriedades da membrana⁷⁴. Alguns autores sugerem que o fator determinante principal do grau de fluidez das membranas é o grau de insaturações presentes em suas cadeias de ácidos graxos^{88,89}.

2.1.3. FLUIDEZ E DINÂMICA LIPÍDICA DAS MEMBRANAS CELULARES

A fluidez da membrana celular é uma propriedade físico-química de definição complexa, devido à natureza fortemente anisotrópica da bicamada. Modelos convencionais consideram a

bicamada lipídica como uma estrutura de fase unicamente fluida, associando a mobilidade lateral de seus componentes, quando não estão diretamente ancorados ao citoesqueleto, à mobilidade lateral dos líquidos⁹⁰. Porém, a grande heterogeneidade dos componentes de membrana propicia a ocorrência de fenômenos cooperativos, que podem resultar em diferentes transições de fase, outros fenômenos de ponto crítico e equilíbrios multi-fases. Tais fenômenos cooperativos proporcionam à bicamada lipídica uma estrutura com características de fase líquido-cristalina, que pode conter áreas delimitadas em fase gel, e/ou vice-versa³⁷. Estas áreas são conhecidas por domínios, que são definidos como qualquer região cuja composição lipídica seja diferente em relação às outras áreas remanescentes da membrana³⁹.

O comportamento de fase e a organização lateral de membranas heterogêneas podem sofrer alterações, ocasionadas por variações sutis de composição lipídica, temperatura, força iônica e pH³⁷. Isto reforça a visão de que todos os fenômenos ocorrentes na membrana celular, inclusive os que repercutem na variação do seu grau de fluidez, são consequência da interação entre todos os seus componentes e não apenas do efeito proporcionado por moléculas individuais. Este ponto de vista torna-se necessário para melhor entendimento da dinâmica existente na membrana celular⁹⁰.

A dinâmica lipídica envolve características conformacionais e translacionais das moléculas no plano da bicamada⁹¹ (figura 13).

A dinâmica conformacional envolve movimentos intra-moleculares como rotação ao longo do eixo, vibração metilênica “stretching” simétrica / assimétrica e isomerização trans-gauche⁹¹. Uma das técnicas que pode ser utilizada para investigar a dinâmica intra-molecular dos lipídios é a espectroscopia Raman. Através desta técnica pode-se detectar estas cadeias lipídicas, quando na configuração gauche, através da análise das bandas na região próxima a 1100 cm^{-1} (92).

O aparecimento de moléculas na configuração gauche está diretamente associado a um aumento do grau de fluidez na membrana ^{92,93}.

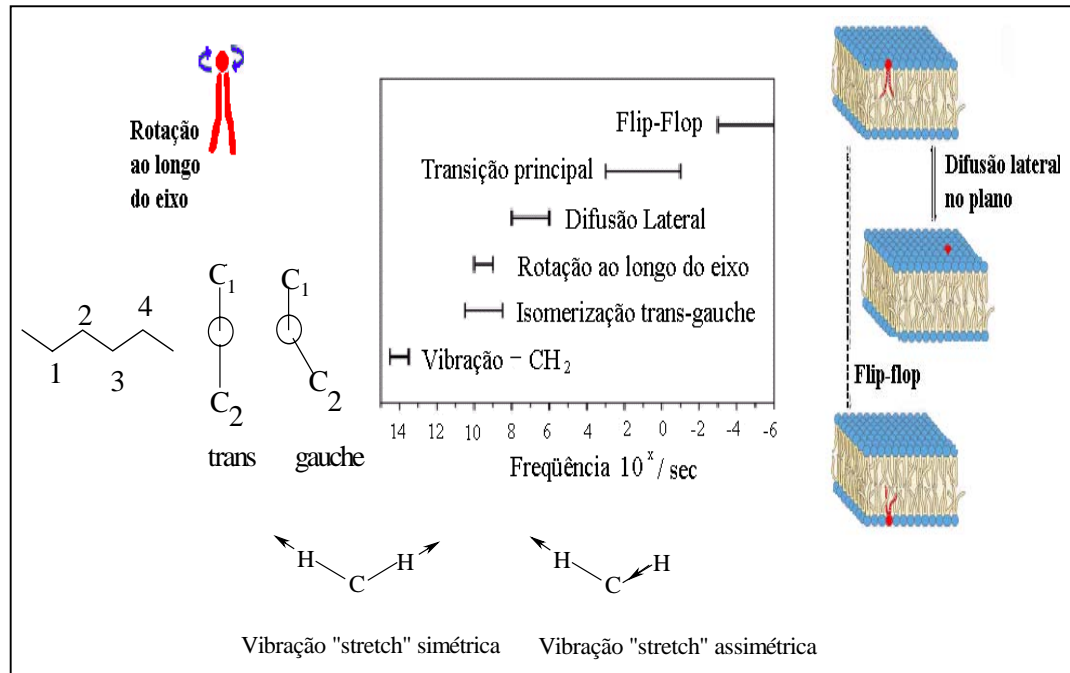


Figura 13- Frequências características e movimentos relacionados à dinâmica lipídica conformacional e translacional de membranas ⁹¹.

A dinâmica translacional dos lipídios envolve indicadores da posição lateral da molécula no plano da membrana, como os fenômenos de difusão passiva trans-bicamada (flip-flop) e a transição de fase principal ⁹¹.

Em fosfolipídios de constituição majoritária em bicamadas, como a fosfatidilcolina, a velocidade da dinâmica translacional é bastante inferior àquela correspondente a dinâmica conformacional ^{91,94}. A velocidade do processo de difusão passiva trans-bicamada dos lipídios (tempo de meia vida, $t_{1/2}$ = horas a dias) é consequência do desfavorecimento energético envolvido na difusão das suas cabeças hidrofílicas através do centro hidrofóbico da bicamada ⁹⁵.

Isto indica que cabeças polares carregadas podem reduzir a velocidade relativa da mobilidade trans-bicamada dos lipídios. Entretanto, alguns fosfolipídios negativamente carregados, como o ácido fosfatídico, podem ter suas cargas neutralizadas por protonação, o que reduz o $t_{1/2}$ de movimentação trans-bicamada para segundos ⁹⁶. No organismo, este $t_{1/2}$ é principalmente reduzido pela ação de proteínas catalisadoras da difusão lipídica trans-bicamada, como as aminofosfolipídios translocases ⁹⁷.

A transição de fase principal é um fenômeno pseudo-crítico, isto é, um princípio de primeira ordem que ocorre muito próximo ao ponto crítico e, conseqüentemente, está associado a variações térmicas ^{37,98,99}. Refere-se à transição de uma bicamada lipídica na fase gel para a fase líquido-cristalina ³⁷.

Na fase gel (figura 14A), os lipídios apresentam uma velocidade de difusão lateral reduzida e cadeias apolares de mobilidade restrita, cujas insaturações tendem a adotar uma configuração trans. Nesta fase, a conformação e orientação lipídica tornam-se altamente ordenadas ¹.

Na fase líquido-cristalina, os lipídios apresentam conformação e orientação desordenada (figura 14B), sofrendo rápidas difusões laterais e translacionais no plano da bicamada ³⁶. O estado líquido-cristalino propicia um alto grau de mobilidade lateral aos lipídios de membrana, o que determina as condições ótimas para o funcionamento de proteínas ^{90,100}.

A transição principal é geralmente acompanhada pela formação de domínios, na qual grandes variações de densidade térmica são manifestadas, induzindo uma diferenciação no comportamento termodinâmico de lipídios de membrana ³⁷. À medida que o grau de heterogeneidade das membranas aumenta, a formação de domínios e os fenômenos cooperativos adquirem maior complexidade ⁹⁰. Isto pode ocasionar uma separação macroscópica de fases e gerar diferentes fenômenos de ordenamento de natureza estática ou mesmo um ordenamento

global das moléculas ³⁷. Durante a separação de fases, parece ocorrer um forte fenômeno de compressão na membrana, e as propriedades seletivas a solutos são modificadas ².

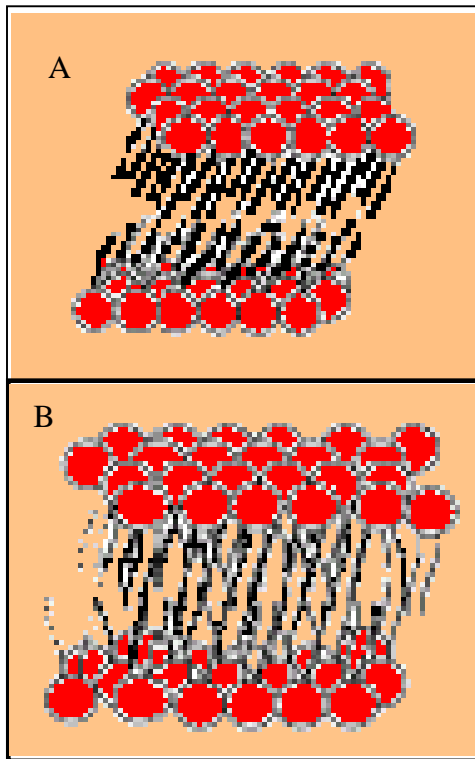


Figura 14- Comportamento da bicamada lipídica na fase gel (A) e líquido-cristalina (B). Representadas em cor vermelha, a cabeça polar dos fosfolipídios; as cadeias apolares, representadas em cor preta, possuem alto grau de movimentação ³⁶.

Outras propriedades da membrana que podem ser alteradas durante a transição principal estão relacionadas à morfologia, área, ordem conformacional das cadeias hidrofóbicas, ordem translacional/ cristalinidade lipídio-moléculas e espessura ^{37,40,90}.

Um segundo tipo de transição relacionado a membranas é conhecido como pré-transição, por apresentar-se de forma adjacente à fase gel e líquido-cristalina. Lipídios que sofrem a pré-transição apresentam fase hexagonal periódica ($P_{\beta'}$), caracterizada por ondulações resultantes do pareamento irregular entre as áreas respectivas ao grupo polar e às cadeias hidrofóbicas ^{101,102}. A velocidade desta transição é baixa e os valores de ΔH envolvidos são inferiores aos correspondentes a uma transição principal ^{103,104}. Neste tipo de transição podem ocorrer

mudanças consideráveis em propriedades dos lipídios, como variações no grau de hidratação da cabeça polar, no acoplamento entre as monocamadas, na simetria característica ao empacotamento das cadeias alquílicas, ou ainda um aumento no número de ligações gauche¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

Os estados das fases, bem como a composição lipídica, extensão da cadeia hidrofóbica, pressão, grau de hidratação, interação com colesterol e fármacos anestésicos, e o processo de lipoperoxidação são fatores determinantes do grau de fluidez das membranas^{2,90,110,111}.

A composição lipídica está intimamente associada à temperatura das transições de fase e, conseqüentemente a um aumento ou redução do grau de fluidez das membranas. O comportamento termodinâmico de lipídios contendo cadeias apolares insaturadas é diferenciado do relativo a lipídios saturados, visto que a presença de insaturações na cadeia alquílica reduz as temperaturas típicas de transição de fases dos lipídios para uma faixa abaixo de 0°C¹¹²⁻¹¹⁴. Estudos anteriores demonstraram que a incorporação de ácidos graxos insaturados na conformação cis, como ácido oleico, linolenico e aracdônico, em um sistema composto por fosfatidilcolina, reduziu a sua temperatura de transição da fase gel para líquido-cristalina¹¹⁵.

O estudo científico sobre as influências específicas dos lipídios nas propriedades das membranas celulares pode ser dificultado, devido à grande heterogeneidade de cadeias apolares presentes nestas bicamadas lipídicas. Entretanto, tais interferências podem ser eliminadas através da utilização de modelos de membrana, que propiciam um maior controle sobre os componentes que podem influenciar o sistema estudado^{74,116}.

2.1.4. MODELOS DE MEMBRANAS CELULARES

Os estudos das estruturas e propriedades das membranas celulares muitas vezes são dificultados pela interferência provocada pela sua heterogeneidade. Assim sendo, tornam-se

importantes os modelos de membrana celular, cujas variáveis podem ser estabelecidas e controladas, permitindo que os princípios físico-químicos e interações específicas sejam interpretados de forma mais precisa^{74,116}. Neste trabalho, lipossomas e microsomas de fígado de rato foram utilizados como modelos de membrana.

O uso de lipossomas como modelo de membranas celulares em experimentos científicos é bastante difundido, e proporciona vantagens como a facilidade de produção, com propriedades reproduzíveis, além da possibilidade de obtenção em grandes quantidades^{1,5,117,118}. Os lipossomas possuem constituição lipídica similar a da matriz de células e organelas, e podem apresentar uma ou várias bicamadas, também conhecidas por lamelas, simulando de forma eficiente determinadas propriedades das membranas⁵.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho, número de lamelas, ou método de preparação¹¹⁹. Os três tipos mais comuns de lipossomas usados em trabalhos científicos são: vesículas grandes multilamelares (MLVs), vesículas grandes unilamelares (LUVs) e vesículas pequenas unilamelares (SUVs). As MLVs possuem um diâmetro superior a 400 nm e são compostas por muitas lamelas heterogêneas em seus compartimentos internos. A quantidade de lamelas presentes nestas vesículas dificulta o estudo de propriedades da bicamada lipídica, como permeabilidade e fusão. As MLVs costumam ser preparadas a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso^{119,120}. LUVs apresentam diâmetros na faixa de 50-400 nm e são organizados em apenas uma bicamada. Podem ser preparadas a partir da filtração sob pressão em filtros de policarbonato de porosidade definida, sonicação, ou extrusão de uma amostra de MLV^{25,94,119}. Técnicas modificadas de hidratação, como procedimentos que envolvem a evaporação de solventes e diálise de lipídios dissolvidos em detergentes, podem ser utilizadas para formar LUVs de uma forma direta, não originadas de MLVs^{7,121,122}. SUVs possuem diâmetro na faixa de 20-50

nm e são mais instáveis em relação aos dois primeiros tipos de lipossomas ¹¹⁹. A estrutura de um lipossoma unilamelar está representada na figura 15.

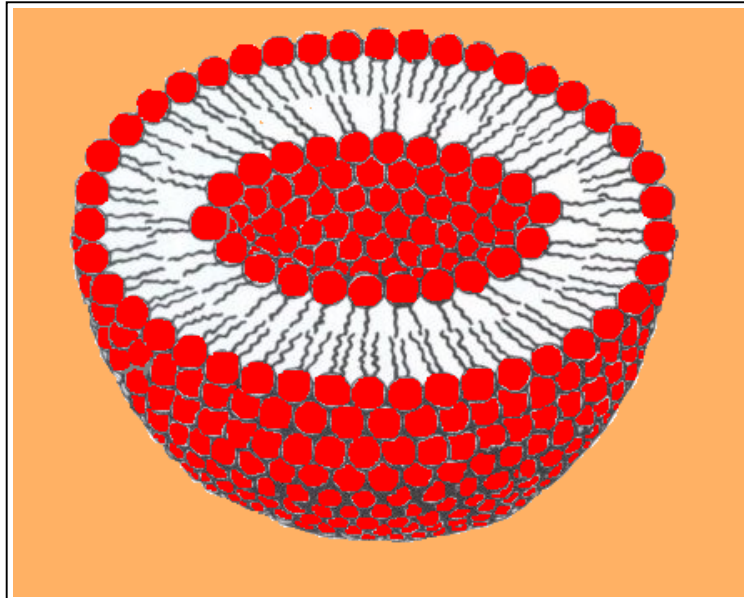


Figura 15- Corte transversal de um lipossoma unilamelar. Em vermelho, as cabeças polares; em preto, as caudas hidrofóbicas ¹²³.

Lipossomas constituídos por grupos polares carregados são considerados modelos realísticos e de efeitos similares quando comparados com as membranas ^{124,125}.

Os microsomas de fígado de rato são modelos de membranas naturais que possuem uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados ³². Também fazem parte da composição microsomal fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingolípídios, colesterol e sistemas enzimáticos como o citocromo P-450 e citocromo b₅ ¹²⁶⁻¹³⁰. A atividade enzimática decorrente do retículo endoplasmático, presente nos microsomas, é uma

variável diferencial neste modelo de membrana, quando comparado ao modelo de lipossomas descrito. Tal característica viabiliza o uso de microssomas para estudos com xenobióticos^{33,131}.

Neste trabalho, lipossomas unilamelares e microssomas foram usados, como modelos de membrana, em ensaios de lipoperoxidação induzida por espécies reativas. As características destas espécies serão discutidas adiante.

2.2. ESPÉCIES REATIVAS E RADICAIS LIVRES

De forma geral, um radical livre pode ser definido como um átomo ou uma molécula independente que possui um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica¹³². O elétron desemparelhado altera a reatividade química de seu respectivo átomo, tornando-o mais reativo em relação a sua forma não-radical⁴. Assim, são características dos radicais livres a instabilidade, a alta reatividade e o paramagnetismo^{33,133}.

O termo espécie reativa é utilizado para descrever não somente radicais livres mas também outras moléculas não-radicalares que, em condições fisiológicas, podem promover reações de oxidação ou de redução³³. A figura 16 representa a distribuição eletrônica em orbitais de diversas espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas biológicas podem ser classificadas em Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), de acordo com as moléculas a partir das quais foram originadas. Exemplos de espécies reativas estão apresentados na figura 17⁸.

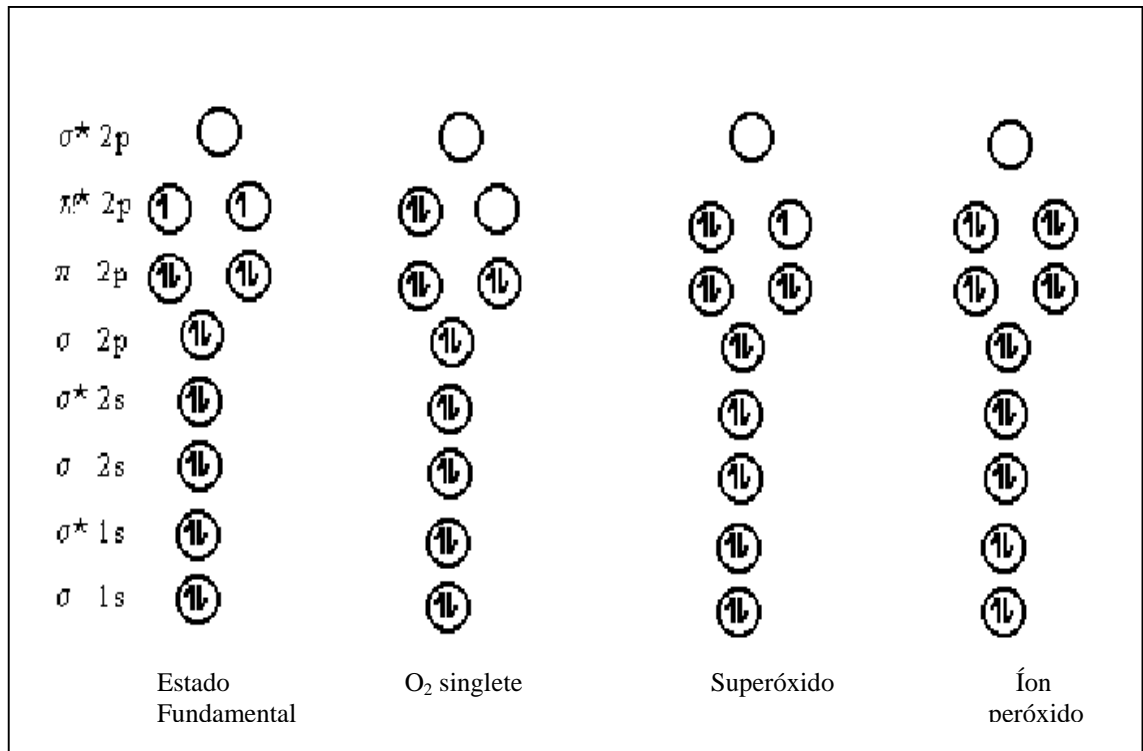


Figura 16- Distribuição eletrônica em orbitais para diversas espécies reativas de oxigênio⁸.

Espécies reativas de oxigênio são geradas a partir do metabolismo de amins biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos, carnitina e enzimas como a xantina oxidase. Também podem ser produzidas a partir da auto-oxidação endógena de pequenas moléculas como flavinas, catecolaminas, hidroquinonas e hemoglobinas, bem como da ação de redutases de flavoproteínas e de citocromos P₄₅₀, entre outros^{133,134}. A tabela 5 apresenta algumas fontes celulares de produção de diversas espécies reativas de oxigênio (EROs).

<u>EROs</u>	
<u>Radicais</u>	<u>Não radicais</u>
Superóxido, $O_2^{\bullet-}$	Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2
Hidroxil, $\bullet OH$	Ácido hipocloroso, $HOCl$
Peroxil, RO_2^{\bullet}	Ozônio, O_3
Alcoxil, RO^{\bullet}	Oxigênio singlete, $^1\Delta g$
Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}	
<u>ERNs</u>	
<u>Radicais</u>	<u>Não radicais</u>
Monóxido de Nitrogênio, NO^{\bullet}	Ácido Nitroso, HNO_2
Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}	Trióxido de dinitrogênio, N_2O_3
	Íon nitrônio, NO_2^+
	Ânion Nitroxil, NO^-
	Tetróxido de Dinitrogênio, N_2O_4
	Peroxinitrito, $ONOO^-$
	Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$
	Cloreto de Nitrila, NO_2Cl

Figura 17- Exemplos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ⁸.

FONTES CELULARES DE PRODUÇÃO DE EROs		
	FONTES	EROs
ENDÓGENAS	Mitocôndria	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$
	Citocromo P-450	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2
	Macrófagos/ células inflamatórias	$O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OCl^-
	Peroxisomos	H_2O_2
EXÓGENAS	Metais	$\bullet OH$
	Radiação	$\bullet OH$

Tabela 5- Fontes celulares de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)¹³⁵.

Em sistemas biológicos, as espécies reativas de nitrogênio possuem como fonte primária o monóxido de nitrogênio ou óxido nítrico, NO^{\bullet} , espécie sintetizada por óxido nítrico sintases, geralmente em concentrações de 0,02 a $2\mu M$ ^{136,137}. As reações mais proeminentes do monóxido de nitrogênio envolvem interações com centros metálicos em proteínas, como os de ferro e cobre, ou com radicais livres, que resultam na produção de diversas espécies reativas de nitrogênio (figura 18). Dentre estas espécies, pode ser citado o peroxinitrito, $ONOO^-$, produto gerado durante lesões teciduais que podem ocorrer, por exemplo, em casos de hipertensão^{8, 138}.

Espécies reativas de oxigênio parecem estar envolvidas em importantes funções fisiológicas, como a transdução de sinais que propiciam a expressão genética, e a proliferação celular^{139,140}. As espécies reativas de nitrogênio possuem função essencial como intermediários

da sinalização celular que envolve oxi-redução como, por exemplo, as respostas celulares específicas reguladas por fatores de crescimento e citocinas ¹⁴¹.

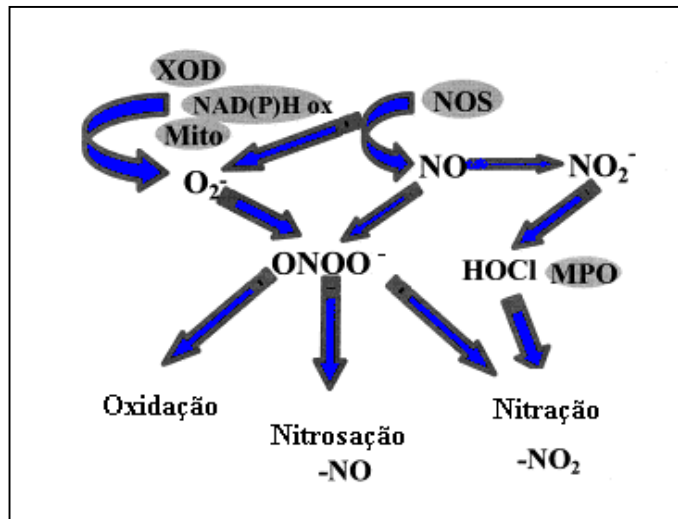


Figura 18 – Representação esquemática de reações biológicas que produzem espécies reativas de nitrogênio a partir do monóxido de nitrogênio, NO[•]. MPO= mieloperoxidase; NOS= óxido nítrico sintase; Mito= mitocôndria; XOD= xantina oxidase ¹³⁶.

A atividade de espécies reativas de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio em um organismo sadio costuma ser regulada através de defesas antioxidantes, que podem ter origem: i) enzimática, como as superóxido dismutases, catalases e glutathione peroxidases; endógena não-enzimática, como a glutathione reduzida; iii) exógena, tais como flavonóides, α -tocoferol (vitamina E) e o grupo conhecido por vitamina B₆ ⁸.

As patologias associadas a espécies reativas decorrem do estresse oxidativo, isto é, um desequilíbrio na razão entre espécies oxidantes e sistemas de defesas antioxidantes em favor das primeiras ^{142,143}. O estresse oxidativo é propiciado através do efeito causado pela exposição do

organismo a qualquer situação fisiológica de estresse, e/ou fontes exógenas de espécies reativas, como poluentes ambientais, nos sistemas de proteção celulares. Dentre os poluentes ambientais podem ser citados fumaça de cigarro, radiação, hidrocarbonetos halogenados (como o gás cloro-flúor-carbono), metais pesados, e certos pesticidas, como o Paraquat (dimetil pirimidina)^{133,144,145}. Uma segunda fonte exógena de espécies reativas é o álcool, cujo consumo pode induzir reações oxidativas no fígado¹⁴⁶.

Diversos efeitos associados a espécies reativas podem ser desencadeados no organismo: a modificação de aminoácidos, alteração de atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas, modificações em glicoproteínas, perda de metal em metaloproteínas, aumento na susceptibilidade a proteólise, oxidação de grupos tióis para pontes dissulfetos e alterações nos receptores e no caráter antigênico, dentre outros^{133,147,148}. Espécies reativas de oxigênio podem interagir com o ácido desoxiribonucleico (DNA), induzindo mutações nas bases nitrogenadas e câncer^{8,133}. Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o ONOO⁻ pode induzir a apoptose de tipos celulares como tímócitos e células corticais^{149,150,151}, dentre outras ações descritas na tabela 6.

PEROXINITRITO: ALVOS E AÇÕES BIOLÓGICAS		
ALVO	EFEITO	CONSEQÜÊNCIA
Tióis	Oxidação: depleção da glutathiona reduzida	Redução de fatores antioxidantes e de transcrição
Lipídios	Oxidação : lipoperoxidação	Dano às membranas
MnSOD	Nitração: inibição enzimática	Redução da dismutação do ânion superóxido
Citoesqueleto	Nitração: alteração da estrutura	Desorganização da arquitetura celular

Tabela 6- Ações biológicas causadas por interação de peroxinitrito com moléculas específicas¹⁵².

2.2.1. REAÇÕES BIOLÓGICAS QUE ENVOLVEM A PRESENÇA DE ESPÉCIES REATIVAS

As espécies reativas interagem com outras moléculas biológicas através das seguintes reações: i) adição, ii) transferência de elétrons e iii) abstração de hidrogênio ⁸.

Uma reação de adição importante ocorre entre o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e a base guanina do DNA, e está representada na figura 19. Esta adição constitui um mecanismo de lesão ao ácido nucleico e possui como produto a 8-hidroxi guanina ⁸.

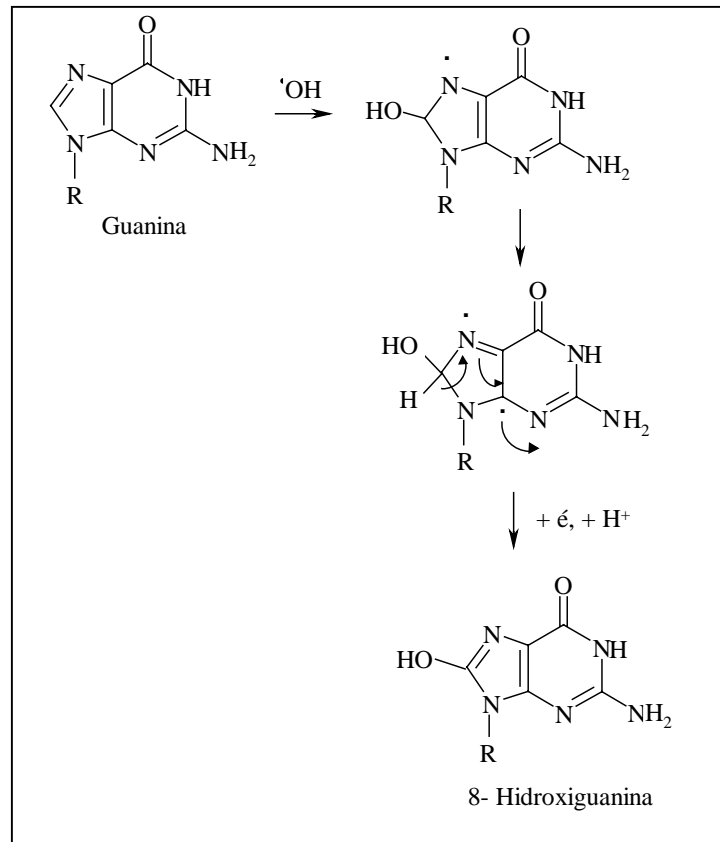


Figura 19- Adição de radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) à base guanina do DNA ⁸.

A adição de NO_2 (nitração), NO^+ (nitrosação) e NO (nitrosilação) são frequentes em reações envolvendo espécies reativas de nitrogênio ^{136,153,154}. Por exemplo, a nitração de resíduos de tirosina (TYR), representada na figura 20, pode ocorrer no peptídeo vasoconstritor angiotensina II ^{155,156}. Esta reação gera 3-nitrotirosina (NTYR), um produto estável que vem sendo utilizado em estudos científicos como um marcador do dano tecidual mediado por NO^\bullet e ONOO^- ^{156,157}.

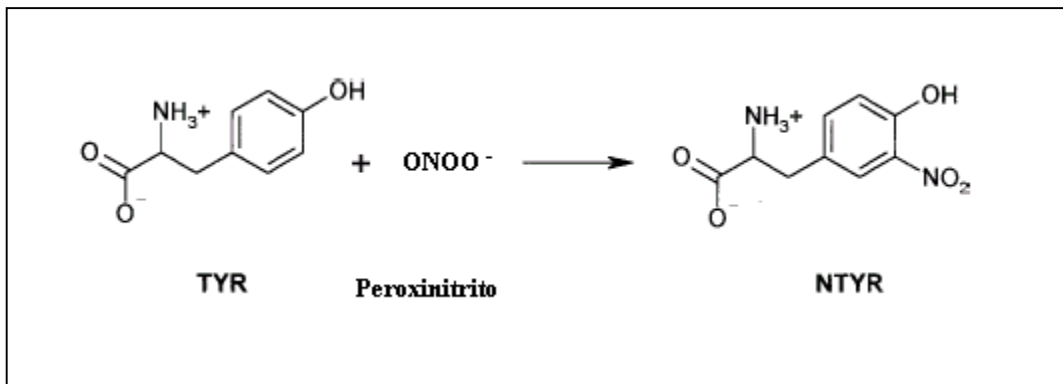


Figura 20– Nitração da tirosina por ação de peroxinitrito ¹⁵⁶.

Dentre as reações que envolvem transferência eletrônica, podem ser citadas as envolvidas no sistema ativo de oxigênio, que reduz o oxigênio molecular à água. O sistema ativo de oxigênio consiste de quatro etapas nas quais ocorre a transferência consecutiva de quatro elétrons, um em cada etapa. A transferência eletrônica em cada etapa do sistema promove a formação de, respectivamente, ânion superóxido (O_2^\bullet), peróxido (O_2^-), radical hidroxil ($^\bullet\text{OH}$) e água (figura 21) ¹⁵⁸.

A abstração de um hidrogênio pode ocorrer nas cadeias alquílicas de ácidos graxos, desencadeando o início do processo de lipoperoxidação em membranas biológicas, discutido detalhadamente adiante ⁸.

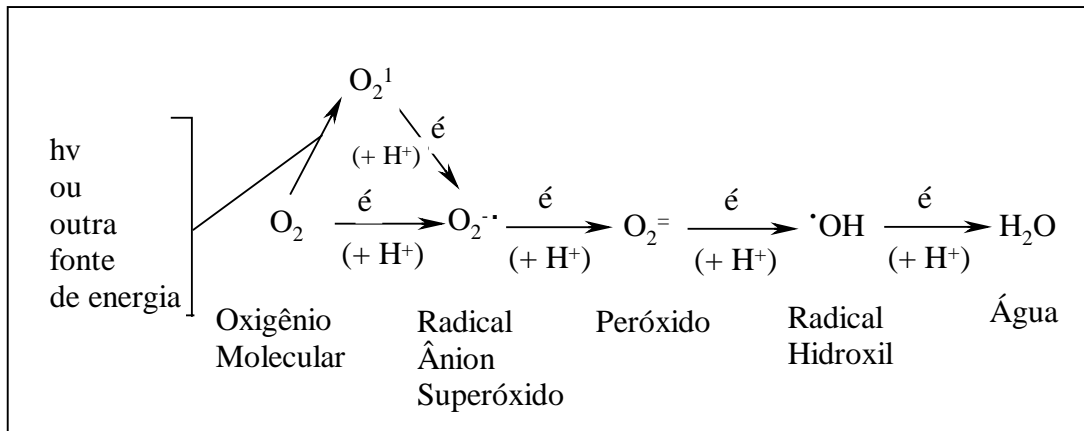


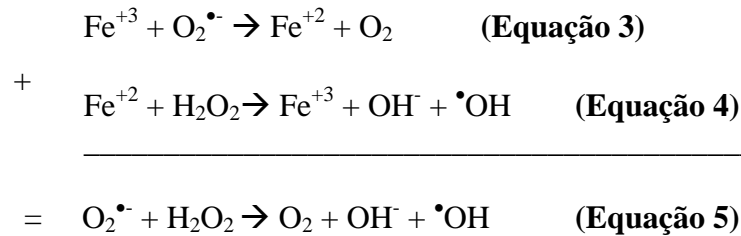
Figura 21- Sistema ativo de oxigênio ¹⁵⁸.

2.2.2. QUÍMICA DO RADICAL HIDROXIL, RADICAL ASCORBIL E DO PEROXINITRITO

Utilizou-se neste trabalho radical hidroxil ($\cdot OH$), radical ascorbil ($\cdot Asc$) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), justificando assim uma revisão sobre estas espécies reativas.

Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil possui um dos maiores potenciais oxidativos, sendo gerado *in vivo* a partir da redução monovalente da molécula de O_2 (ver figura 21) ^{8,134,159}. Foi estabelecido que, em sistemas biológicos, o radical hidroxil também pode ser produzido a partir da reação de Fenton/ Haber-Weiss, embora a importância biológica da mesma ainda seja discutida atualmente ^{147,159-161}. A reação de Fenton (equação 4) é catalisada por Fe^{3+} (e algumas vezes por Cu^{2+}), desde que este é reduzido ao interagir com $O_2^{\cdot-}$, gerando o íon

ferroso. O Fe^{2+} pode reagir com H_2O_2 , recuperando o ferro em seu estado de maior oxidação e produzindo ânion hidroxila e $\bullet\text{OH}$. A somatória das duas reações descritas nas equações 3 e 4, constitui a reação de Haber-Weiss (equação 5) ^{162,163}.



O radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) é uma espécie intermediária formada durante a oxidação do ácido ascórbico (AscH_2) a ácido dehidroascórbico (DHA) ¹⁶⁴, conforme representado na figura 22.

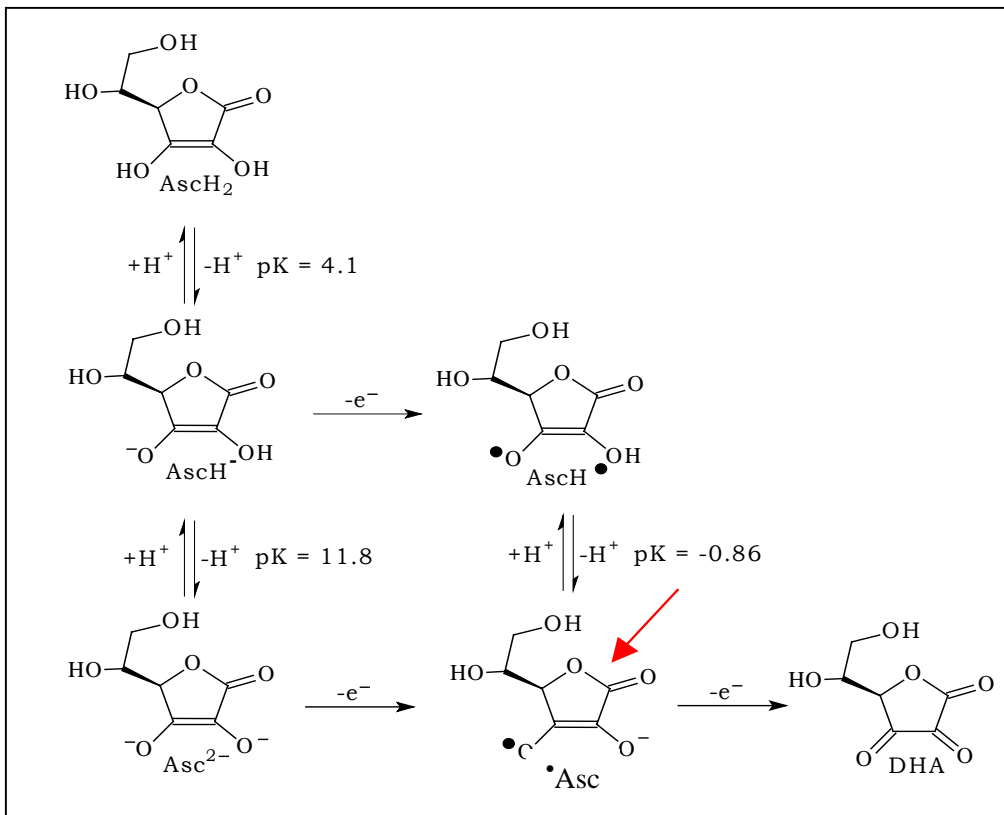


Figura 22- Oxidação de ácido ascórbico (AscH_2) a ácido dehidroascórbico (DHA). O radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) é o intermediário formado durante a perda de um elétron do ácido ascórbico e está assinalado por uma flecha vermelha ¹⁶⁵.

Em microsomas de fígado de rato, o radical ascorbil parece complexar-se com o ferro ligado à membrana (figura 23). Casalino e colaboradores ¹⁶⁶ sugeriram que este complexo catalisaria o processo oxidativo em cadeias apolares de membranas biológicas.

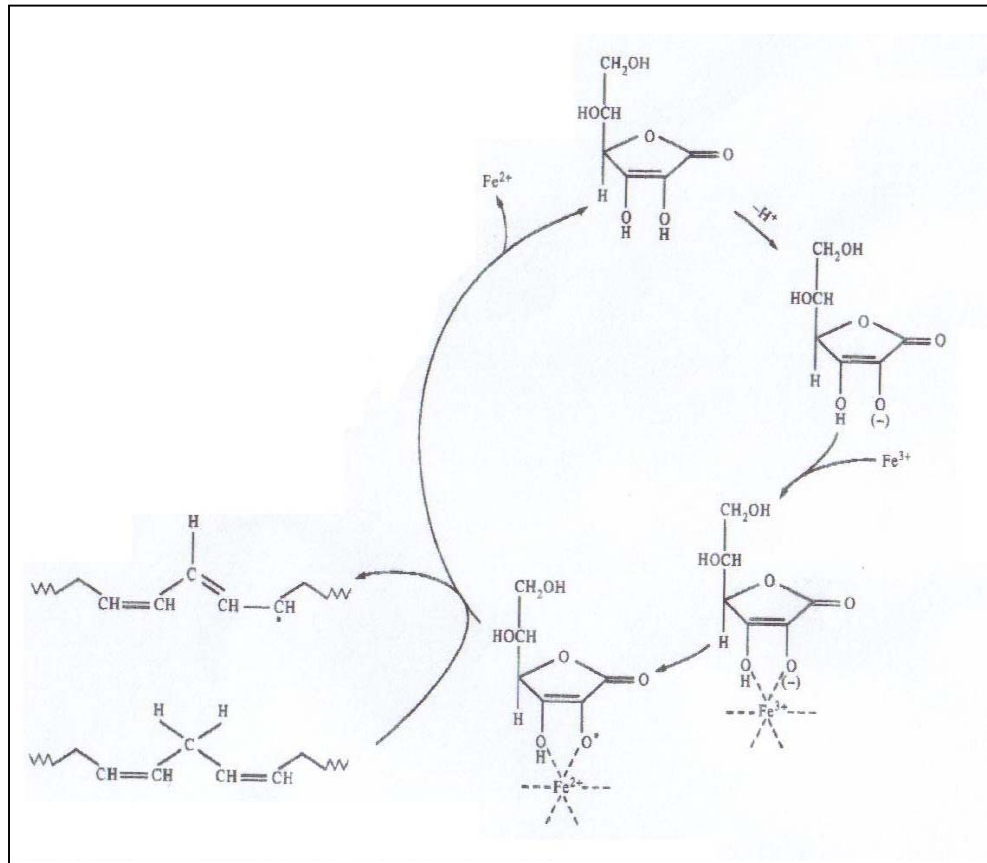
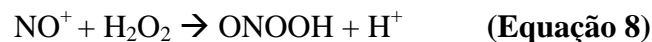
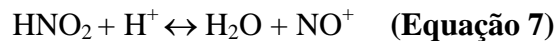


Figura 23- Complexação entre radical ascorbil e ferro microsomal, catalisando um processo oxidativo em membranas biológicas. Adaptada de Casalino, Sblano e Landriscina ¹⁶⁶.

O peroxinitrito (ONOO⁻) apresenta um alto potencial oxidante, sendo produzido no organismo através da reação entre o monóxido de nitrogênio e o ânion superóxido ^{167,168}.



O método mais utilizado para a síntese experimental de peroxinitrito ocorre via “quenched-flow”, que será detalhadamente descrito na seção referente a materiais e métodos. A síntese por este método envolve reações entre nitrito acidificado e peróxido de hidrogênio (equação 8), formando ácido peroxinitroso. Em meio básico, o ácido peroxinitroso (ONOOH) desprotona a peroxinitrito (equação 9) ¹⁶⁹.



O peroxinitrito apresenta pKa (pKa= 6,8) próximo ao pH fisiológico (pH= 7,4). Desta forma, esta espécie reativa pode atuar no organismo também na presença de ácido peroxinitroso ^{154,167}. O ácido peroxinitroso possui alta velocidade de decomposição. Os produtos da decomposição do ácido peroxinitroso são compostos de 60-70% de íon nitrato (NO₃⁻) e de 30-40% de dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e radical hidroxil (•OH) ^{170,171}.

O peroxinitrito também pode interagir com dióxido de carbono, CO₂, espécie importante por sua função de tamponamento em diversos sistemas no organismo ¹⁶⁷. O dióxido de carbono parece catalisar a decomposição de peroxinitrito, formando um aducto ONOOCO₂⁻. O aducto pode decompor-se rapidamente em radical ânion carbonato (•CO₃) e radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) ^{170, 172-175}. Um diagrama esquemático do modelo proposto por Stanbro ¹⁶⁷ da formação e decomposição de peroxinitrito/ ácido peroxinitroso (considerados no esquema diretamente como ONOO⁻) em lipoproteínas é demonstrado na figura 24.

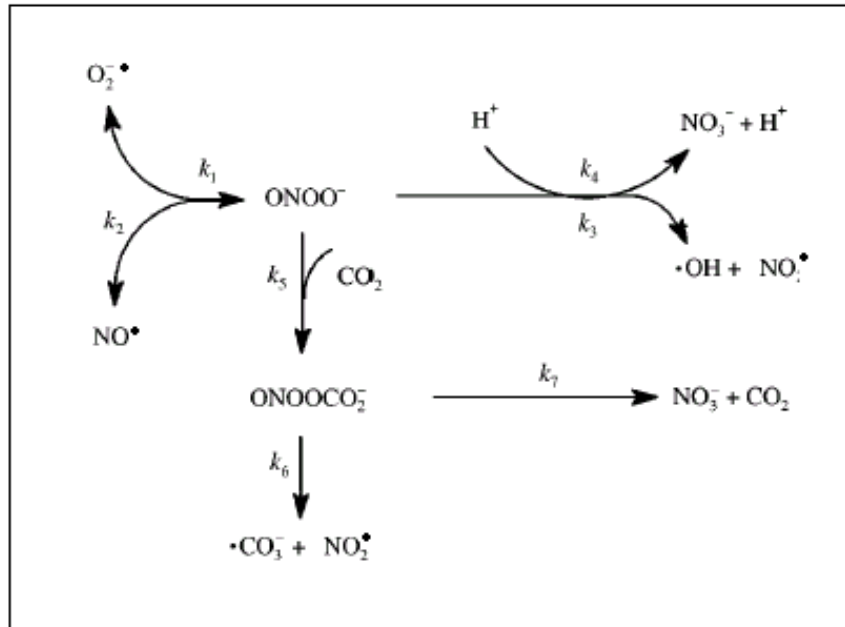


Figura 24- Diagrama esquemático das reações de formação e decomposição de peroxinitrito/ácido peroxinitroso ¹⁶⁷.

Na tabela 7 são mostradas as reações envolvidas no modelo proposto para formação e decomposição de peroxinitrito/ ácido peroxinitroso e suas respectivas constantes de velocidade ^{167,170,171,176-178}.

É válido ressaltar que as reações formadoras das espécies reativas de nitrogênio são aceleradas quando em compartimentos hidrofóbicos, como ocorre nas lipoproteínas ^{136,167,179}.

Neste trabalho, o radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito foram utilizados para promover a lipoperoxidação em modelos de membrana. A compreensão da química destas espécies reativas é primordial para um estudo mais abrangente sobre os fatores determinantes dos índices de oxidação em diversos modelos de membrana.

REAÇÕES ENVOLVIDAS NO MODELO DE FORMAÇÃO E DECOMPOSIÇÃO DE ONOO ⁻ / ONOOH E CONSTANTES DE VELOCIDADE	
REAÇÕES	CONSTANTES DE VELOCIDADE
(1) $\text{NO}^{\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$	$k_1 = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(2) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}^{\bullet} + \text{O}_2^{\bullet-}$	$k_2 = 0,017 \text{ s}^{-1}$
(3) $\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO}_2^{\bullet} + \bullet\text{OH}$	$k_3 = 0,207 \text{ s}^{-1}$
(4) $\text{ONOOH} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	$k_4 = 0,483 \text{ s}^{-1}$
(5) $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ONOOCO}_2^-$	$k_5 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(6) $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_2^{\bullet} + \bullet\text{CO}_3^-$	$k_6 = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$
(7) $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{CO}_2$	$k_7 = 7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$

Tabela 7- Reações envolvidas no modelo de formação e decomposição de ONOO⁻/ ONOOH e constantes de velocidade ^{167,170,171,176-178}.

2.2.3. LIPOPEROXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

O processo de lipoperoxidação em membranas lipídicas compreende de três eventos principais: iniciação, propagação e terminação.

A iniciação geralmente ocorre quando uma espécie reativa abstrai um hidrogênio pertencente à cadeia poli-insaturada de lipídios da membrana. A abstração de hidrogênio por espécies reativas é favorecida energeticamente em hidrogênios metilênicos bis-álílicos, cujo valor da energia de dissociação da ligação C-H (75-80 kcal/mol), é inferior ao correspondente à energia envolvendo a dissociação de hidrogênios alílicos (≈ 88 kcal/mol) e alquil (≈ 101 kcal/mol) (figura 25). Ao possuir uma dissociação mais favorecida energeticamente em relação aos outros tipos de hidrogênios presentes na cadeia, os hidrogênios bis-álílicos estão mais susceptíveis à oxidação ^{180,181}.

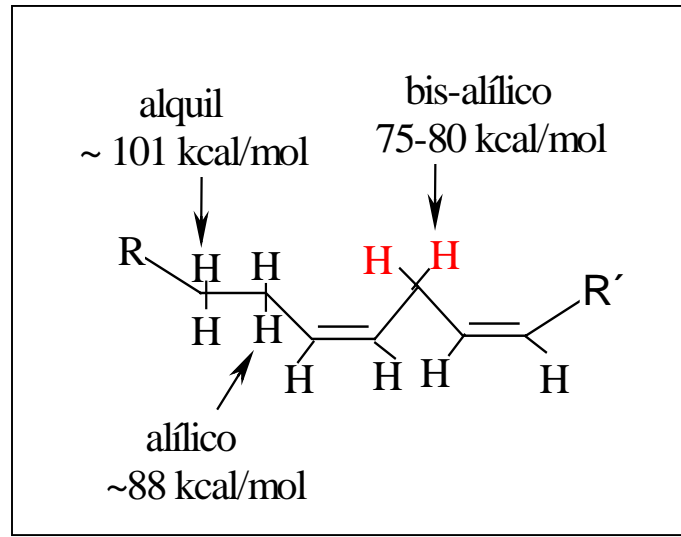


Figura 25- Energias de dissociação das ligações C-H para hidrogênios bis-alílicos (em vermelho), alílicos e alquil de cadeias hidrocarbonetos ¹⁸².

Após a abstração do hidrogênio, uma nova espécie radical centrada no carbono é formada, podendo interagir com oxigênio molecular para formar um radical lipídico peroxil. Este radical lipídico pode abstrair um átomo de hidrogênio de um segundo ácido graxo, levando à geração de outro radical centrado no carbono e de um radical hidroperóxido. O peroxil também pode sofrer ciclização, formando um peróxido cíclico, que pode sofrer rearranjos a endoperóxidos. As reações descritas a partir da formação de radical peroxil caracterizam a etapa de propagação do processo oxidativo. A oxigenação, hidrólise dos endoperóxidos ou o fornecimento de energia via calor para os mesmos são reações que participam da etapa de terminação, gerando produtos não radicais como malonildialdeído (MDA) e 4- hidroxialcenais (4-HDA) ^{8,182,183}.

As etapas ocorrentes no processo de lipoperoxidação induzida por espécies reativas estão representadas na figura 26.

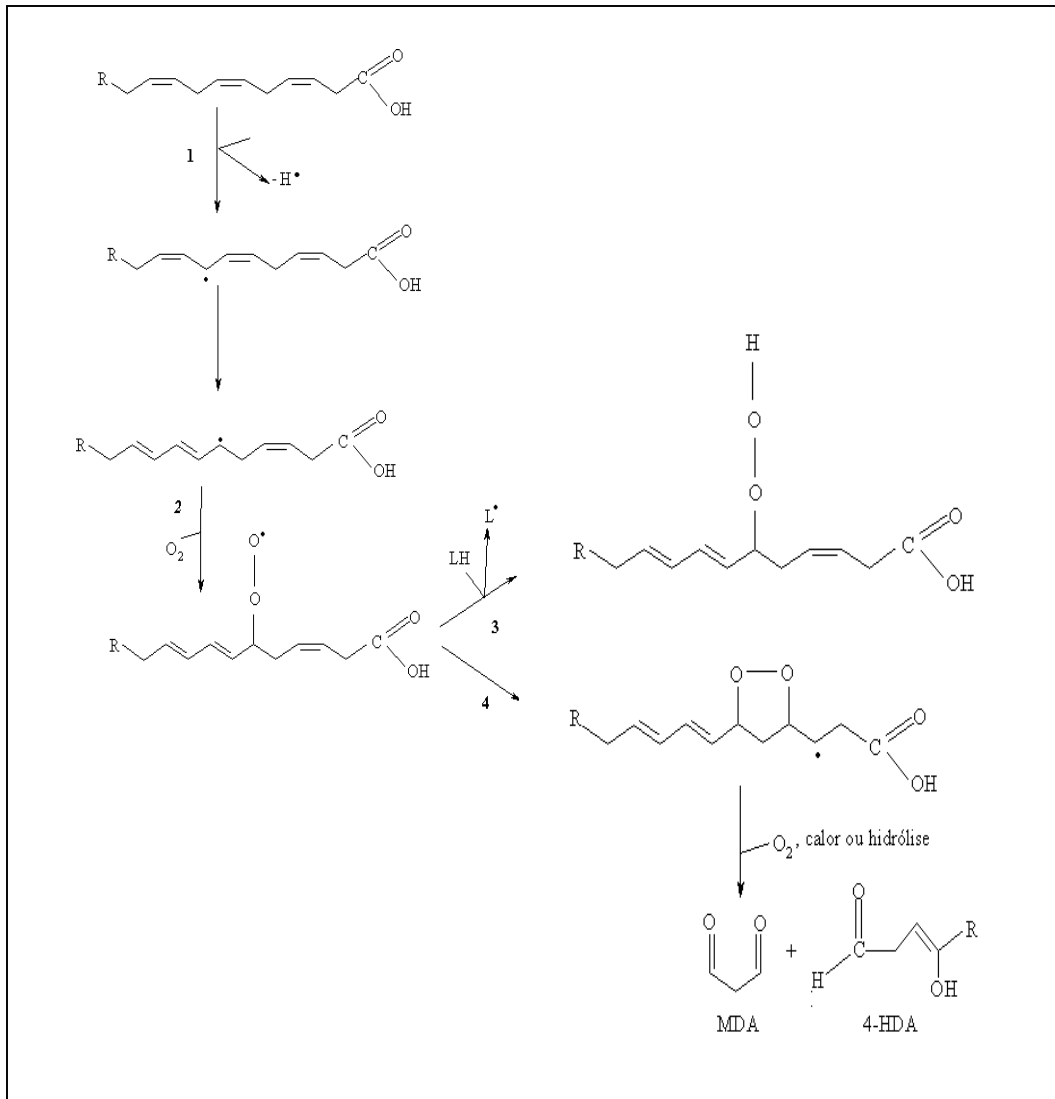


Figura 26- Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados. 1:abstração de hidrogênio da cadeia poli-insaturada de lipídios de membrana; 2:formação de radical peróxil; 3: formação da segunda espécie radical centrada no carbono; 4: formação de endoperóxidos. Adaptado de Halliwell e Gutteridge⁸.

A lipoperoxidação pode propiciar o enrijecimento da membrana ao aumentar a razão molar entre colesterol e fosfolipídios^{110,111}. A influência do processo oxidativo no aumento do

grau de rigidez da membrana está bem evidenciado na literatura através de estudos envolvendo doenças neurodegenerativas e envelhecimento ^{111,184}.

Em modelos de membrana, o processo espontâneo de lipoperoxidação pode propiciar efeitos diferentes entre o grau de fluidez de lipossomas e de microsomas de fígado de rato. Em lipossomas, a lipoperoxidação provoca o enrijecimento da bicamada. Em microsomas, tal dano oxidativo costuma desencadear um aumento no grau de fluidez da membrana ¹⁸⁵.

As células apresentam defesas que atuam em sinergismo contra a lipoperoxidação induzida por espécies reativas nas membranas celulares, como citado anteriormente. Os mecanismos de defesa de diversas espécies antioxidantes, bem como um estudo detalhado sobre os compostos utilizados neste trabalho, serão discutidos a seguir.

2.3. ANTIOXIDANTES

As espécies antioxidantes podem ser classificadas segundo o mecanismo de ação em: i) inibidoras da produção de radicais livres, induzida por metais de transição; ii) inibidoras de reações em cadeia; e iii) espécies que atuam por dois ou mais mecanismos sinérgicos, também conhecidos por “mecanismos mistos de ação” ^{13,186}.

O ácido dehidroascórbico é um exemplo de espécie inibidora da produção de radicais livres, induzida por metais de transição. Esta espécie pode atuar em misturas de íons metálicos de transição e lipoproteínas ^{13,187-189}.

Dentre os inibidores de reações em cadeia estão incluídos os compostos capazes de seqüestrar ou estabilizar radicais livres. São exemplos deste grupo: i) radicais livres relativamente estáveis, como o radical óxido nítrico e 1-oxil-2,2,6,6- tetrametilpiperidina (TEMPO) ^{190,191}; ii)

agentes redutores, como o ácido ascórbico e a vitamina E ^{189,192}; e iii) compostos que interagem com radicais livres de forma a diminuir sua reatividade, como o estradiol ¹⁸⁶.

Dentre os compostos que atuam por mecanismos mistos, podem ser citados os antioxidantes naturais quercetina, melatonina e vitamina B₆.

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) é um flavonóide consideravelmente discutido na literatura por suas propriedades biológicas, que inclui o potencial antioxidante contra radicais hidroxil, ânion superóxido, peroxil e alcoxil ^{8,18}. Os flavonóides costumam atuar via seqüestro de radicais livres e/ou ligando-se a metais de transição ¹⁹³.

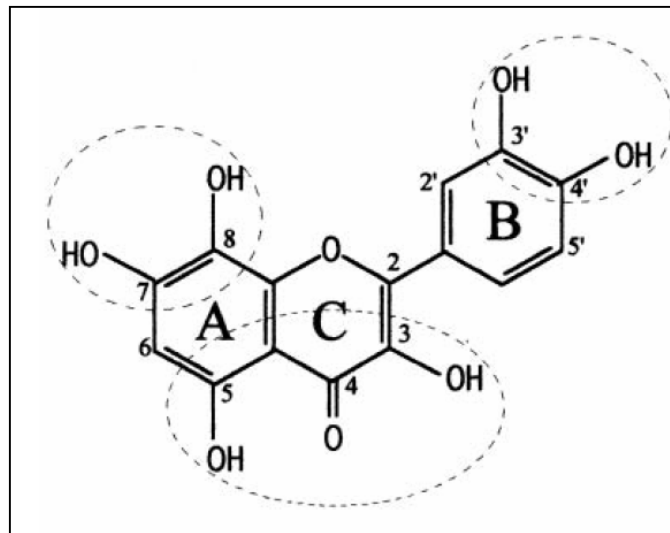


Figura 27- Estrutura da quercetina (3,5,7,3', 4'- pentahidroxi flavona) ¹⁹⁴.

A estrutura da quercetina apresenta grande importância para a sua atividade antioxidante (figura 27). Os grupos funcionais responsáveis por tal atividade estão circundados na figura 27 por linhas tracejadas. O potencial redox da quercetina é aumentado devido à presença do grupo catecol no anel B e do grupo hidroxil no anel C, que possuem propriedades elétron-doadoras, constituindo um alvo para espécies reativas ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. A presença da insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel C confere à estrutura da quercetina um maior grau de coplanaridade em relação a

outros flavonóides que não possuem esta dupla ligação, como a taxifolina ¹⁹⁸. A conjugação desta dupla ligação com o grupo carbonila no carbono 4 é responsável pelo deslocamento de elétrons provindos do anel B. Isto potencializa a capacidade seqüestrante de radicais livres ou pode conferir um alto grau de estabilidade aos radicais fenoxil, resultantes da abstração do hidrogênio pertencente ao grupo hidroxila por espécies reativas ^{199,200}. Tal estabilidade é fator determinante para eficiência de flavonóides no seqüestro de espécies reativas ^{18,199}.

Um segundo fator que favorece o potencial antioxidante da quercetina é a sua interação com o centro hidrofóbico das membranas e a sua complexação reversível com as cadeias polares dos fosfolipídios ^{197,201}.

A melatonina (N-acetil-2-metoxitriptamina) é um neurohormônio, cuja síntese ocorre principalmente na glândula pineal, a partir do metabolismo do triptofano ²⁰². A melatonina atua como um mediador químico que regula uma variedade de funções endócrinas, neurais e imunes ^{203, 204}. A estrutura da melatonina está apresentada na figura 28.

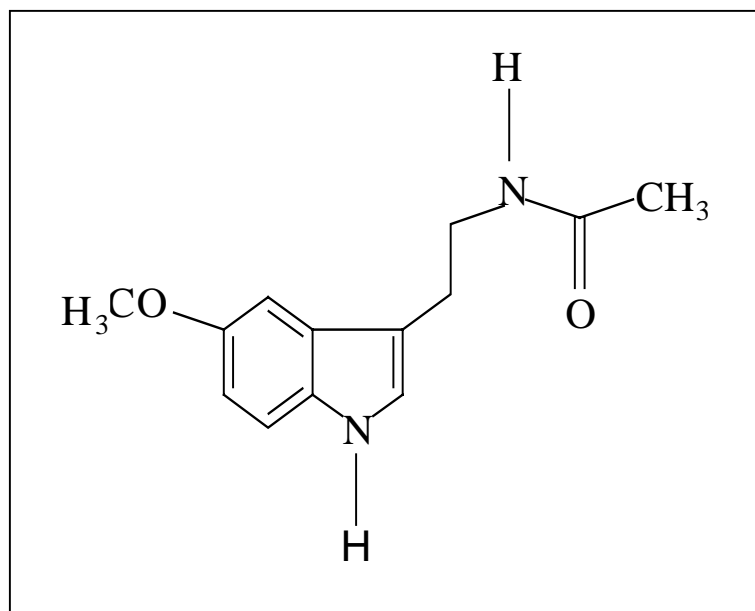


Figura 28- Estrutura da melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) ²⁰⁵

A melatonina tem sido considerada uma espécie antioxidante potente contra os efeitos danosos provocados pelo estresse oxidativo no organismo. Este neurohormônio atua através do seqüestro de uma variedade de espécies reativas como radical hidroxil, peroxinitrito, ácido peroxinitroso, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e monóxido de nitrogênio.

O potencial seqüestrante de espécies reativas da melatonina é determinado pelos substituintes do anel heteroaromático indolamínico que, por sua vez, proporciona uma alta eletroreatividade no sistema. Pode-se afirmar que a química de oxidação da melatonina está diretamente associada a um balanço dos efeitos provocados pela presença dos resíduos N-acetil e metóxi ²⁰⁶. O substituinte metóxi ligado ao carbono 5 da melatonina parece evitar a formação de radicais intermediários centrados no oxigênio e/ou diminuir a formação de radicais centrados no carbono, uma vez que estes radicais podem comportar-se de forma pro-oxidativa ou propiciar a formação de produtos tóxicos, como dímeros ^{207,208}. O substituinte N-acetil determina a química de oxidação da melatonina, como pode ser visto na figura 29, relativa a reações entre o antioxidante e radical hidroxil para formar 3-hidroxi-melatonina cíclica, produto facilmente excretado na urina ^{205,206}.

A interação entre melatonina e ácido peroxinitroso (ONOOH) parece envolver uma transferência eletrônica da primeira para o segundo, propiciando a formação de um radical cátion melatoninil (figura 30). Os produtos majoritários provindos destas interações são o 5-metóxi-2-hidropirrol indol e 6-hidroxi-melatonina. Estes produtos podem reagir novamente com ácido peroxinitroso, resultando em N-acetil-N'-formil-5-metóxicinuramina e 4,6-dihidroxi-melatonina, respectivamente ²⁰⁹. A 6-hidroxi-melatonina parece atuar como um seqüestrador de outros radicais livres ²¹⁰.

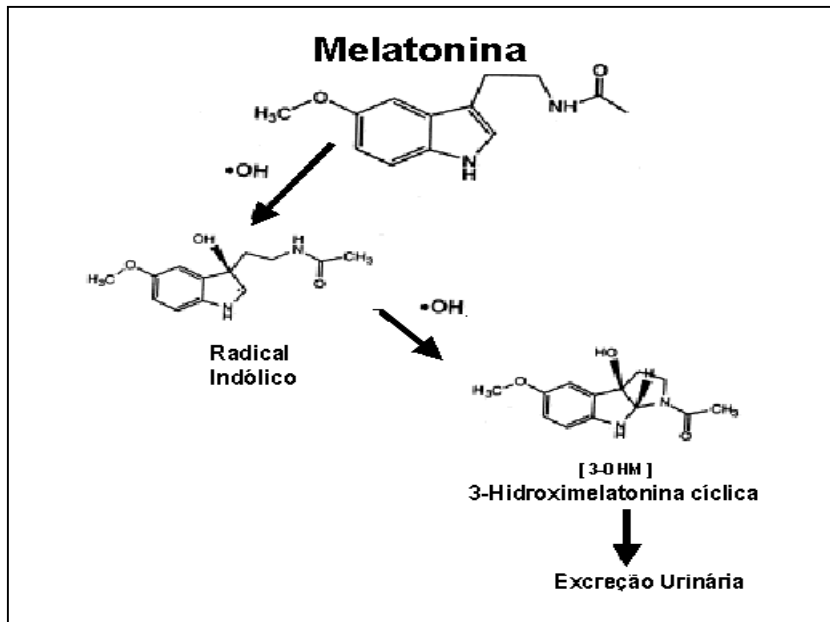


Figura 29 - Reações de sequestro de radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e peróxido de oxigênio (H_2O_2) por melatonina.

Adaptado de Tan e colaboradores²⁰⁵

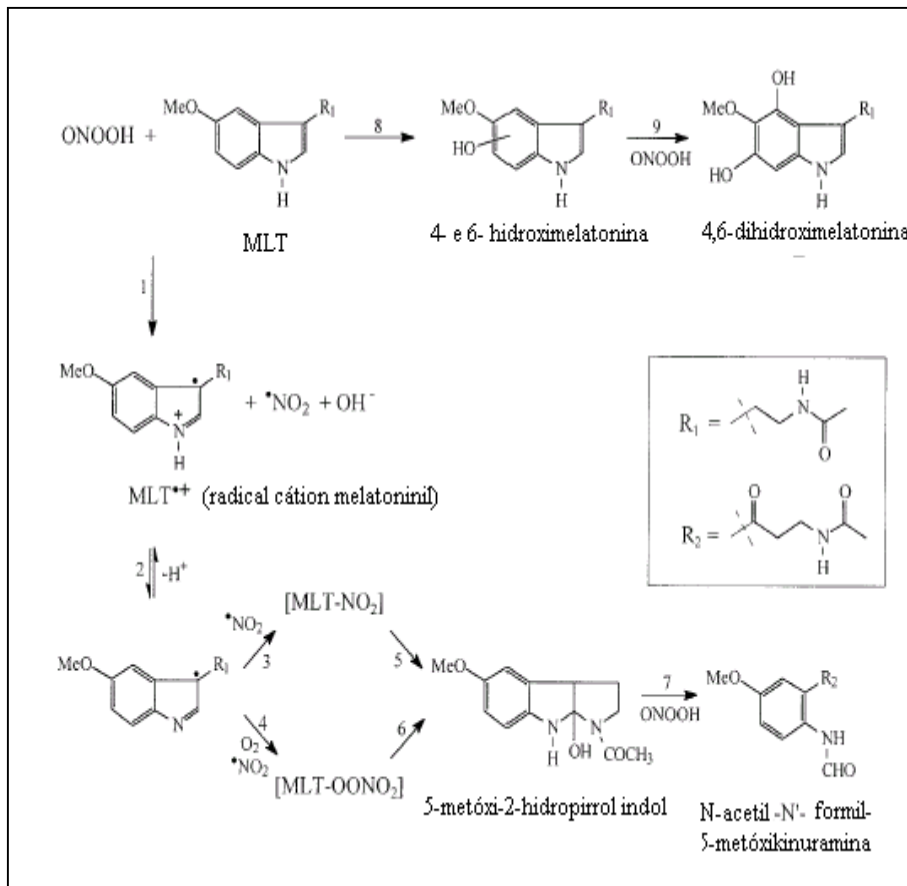


Figura 30- Reações entre melatonina e ácido peroxinitroso

209.

O grupo denominado vitamina B₆ é composta por piridoxina, piridoxamina e piridoxal fosfato, interconversíveis a nível celular ²¹¹. Estudos anteriores sugerem que a vitamina B₆ previne a formação do radical ânion superóxido e de peróxidos lipídicos ³⁰.

O mecanismo químico no qual os compostos de vitamina B₆ inibem as reações de lipoperoxidação ainda não foi documentado na literatura ²¹². Porém, o grupo é constituído por compostos fenólicos (figura 31), que possuem alta reatividade sobre os radicais peroxil. Tal reatividade é determinada por: i) energias de dissociação de ligações; ii) estabilização por ressonância do radical resultante; iii) potencial redox; iv) impedimento estérico para abstração do hidrogênio pertencente ao grupo hidroxila ou à amina por radicais peroxil ²¹¹. Os substituintes hidroxil e amina no anel piridina da vitamina B₆ possuem propriedades seqüestrantes de radicais de oxigênio ^{211,212}.

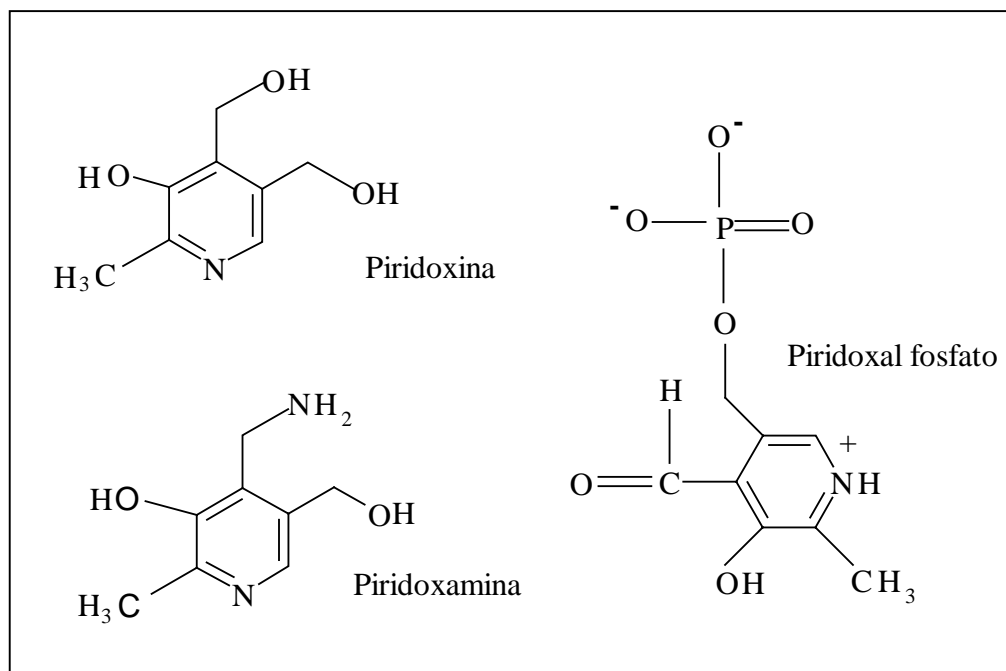


Figura 31- Estrutura dos componentes do grupo vitamina B₆: piridoxina, piridoxamina e piridoxal fosfato ²¹³.

A vitamina B₆ também pode atuar de forma indireta, visto que sua deficiência no organismo limita a disponibilidade de cisteína, inibindo a função da metionina na biossíntese de glutatona reduzida (GSH)²¹⁴.

2.4. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAR MEMBRANAS FOSFOLIPÍDICAS E SUAS INTERAÇÕES COM ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

A caracterização de membranas e suas interações com espécies reativas e antioxidantes podem ser investigadas por diversas técnicas instrumentais. Dentre estas, estão incluídas a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de absorção UV-visível, ressonância paramagnética eletrônica (EPR), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e ressonância magnética nuclear (RMN)^{20,35,40,215,216}.

A espectroscopia de fluorescência baseia-se na absorção molecular de um fóton, cuja energia é correspondente a diferença entre o estado eletrônico fundamental e um dos estados eletrônicos excitados da molécula. Após sofrer um período de termalização, os elétrons retornam do primeiro estado de excitação ao seu estado fundamental, emitindo energia em forma de luz²¹⁷. A intensidade de emissão pode ser detectada em função de comprimentos de onda fixos, através de fluorímetros ou espectrofluorímetros²¹⁸. O grau de fluidez de membranas, após sua interação com espécies reativas ou antioxidantes, pode ser monitorado através da análise da anisotropia da emissão de fluorescência. Por esta análise, o grau de fluidez da membrana pode ser detectado a partir da mobilidade de uma sonda, inserida em determinado local da bicamada^{111,197,219}.

A espectroscopia de absorção em UV-visível está baseada em medidas de absorbância ou de transmitância de luz por soluções, em cubetas transparentes que contêm um caminho óptico de

comprimento determinado. Através desta técnica, pode-se determinar a concentração de um soluto a partir de seus coeficientes de absorção molar e do comprimento do caminho óptico da cubeta, através da representação matemática da lei de Beer. Esta lei relaciona de forma linear as medidas de absorbância, caminho óptico e concentração do analito²¹⁸. Níveis de lipoperoxidação em membranas podem ser avaliados ao determinar-se a concentração de complexos formados entre os produtos gerados neste processo oxidativo e ácido tiobarbitúrico^{220,221}. Detalhes sobre este método estão descritos no item “Materiais e Métodos” deste trabalho. A técnica de UV-visível ainda pode ser utilizada para a detecção de modificações no estado da fase lipídica e nas propriedades elétricas de superfície das membranas. Estas alterações podem ser caracterizadas através da análise do comportamento de sondas espectroscópicas, como a merocianina-540, após interação com a bicamada lipídica. Espectros de absorção de monômeros de merocianina-540 indicam que a forma da banda de $\lambda_{\text{máx}}$ é sensível a polaridade do ambiente. A formação de dímeros de merocianina-540 em membranas correlaciona-se com a densidade do arranjo da cadeias alquílicas próximas aos grupos polares do fosfolípido e com a curvatura da vesícula^{216,222}.

Os princípios da ressonância paramagnética eletrônica (EPR) fundamentam-se na orientação de elétrons desemparelhados em um campo magnético. Pelo fato de existir pouca incidência de moléculas biológicas que possuem elétrons desemparelhados, sondas como 1-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e N-oxil-4'-4'-dimetiloxazolidina (DOXIL) é bastante usado em estudos de caracterização de membranas e efeitos causados nas mesmas após interações com antioxidantes^{20,219}. Métodos de “spin-trapping” podem ser utilizados em estudos de lipoperoxidação em membranas. Estes métodos caracterizam-se pela formação de adutos estáveis a partir da reação entre um radical livre, como o radical hidroxil, e uma segunda espécie, como o

óxido de 5,5,-dimetilpirrolina (DMPO). Os adutos formados podem ser medidos diretamente por EPR ²²³.

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) foram aplicadas neste trabalho, justificando uma revisão mais detalhada sobre estas técnicas, descrita a seguir.

2.4.1. CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL APLICADA AO ESTUDO DE MEMBRANAS

A aplicação da técnica de calorimetria de varredura diferencial (Differential Scanning Calorimetry - DSC), para o estudo da transição da fase gel para líquido-cristalina em bicamadas lipídicas, está bem documentada na literatura ^{5,100,224,225}.

Do ponto de vista experimental, a técnica DSC propicia medidas de trocas de calor no interior de uma célula calorimétrica entre dois recipientes (normalmente painéis de alumínio) contendo a amostra a ser investigada e uma referência (em geral a panela vazia), em função da temperatura ou do tempo. Um experimento de DSC em função da temperatura consiste em aquecer a amostra e a referência, com uma taxa de aquecimento fixa. Inicialmente, a diferença de temperatura (ΔT) entre os dois recipientes é nula. Porém, caso a amostra sofra alguma modificação em sua estrutura atômica, devido ao efeito da temperatura, ΔT será diferente de zero, pelas variações na distribuição do estado energético do sistema amostra-referência ^{100,226}. Esta variação na distribuição do estado energético do sistema amostra-referência é traduzida através de picos no espectro DSC, os quais podem ser de dois tipos: (i) exotérmico, ocorre quando a amostra se encontra em um estado mais energético e transita para um estado energético mais estável ou de menor energia, liberando calor. Um exemplo é a relaxação estrutural e, (ii)

endotérmico, ocorre quando a amostra realiza uma transição de fase ou fusão. Nesse caso, a amostra absorve calor para vencer a barreira de energia que separa os dois estados energéticos²²⁷.

Os aparelhos de DSC podem ser classificados de acordo com os princípios operacionais como: i) calorímetros de varredura diferencial por fluxo de calor (usado nessa dissertação), e, ii) calorímetros de varredura diferencial por compensação de calor. O aparelho DSC usando fluxo de calor, utiliza recurso termo-elétrico para medir ΔT entre os dois recipientes contendo a amostra investigada e a referência. Os dois recipientes são aquecidos por uma única fonte e, caso a amostra sofra alguma modificação estrutural, o sinal correspondente à medida de ΔT é obtido como uma diferença de potencial elétrico, fornecida em unidades de potência (Watts, W)^{35,100,228,229}. A Figura 32 mostra o arranjo experimental presente no aparelho DSC usando fluxo de calor.

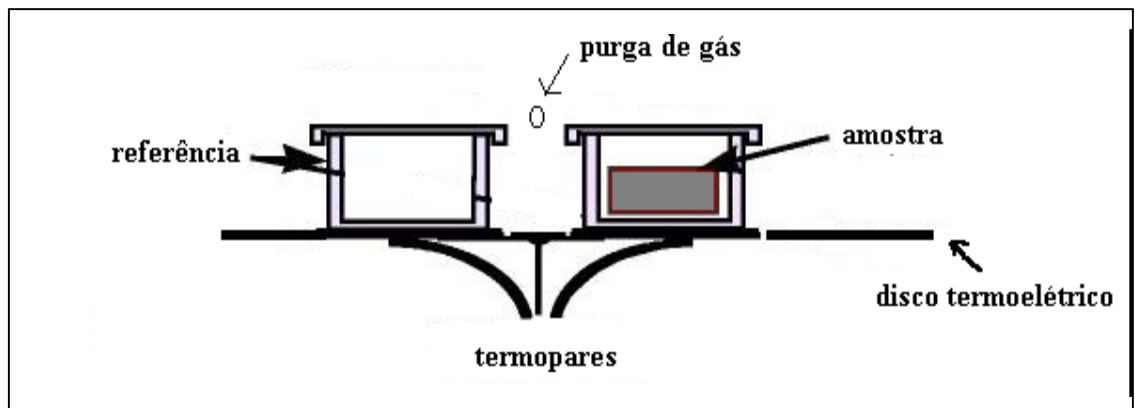


Figura 32- Arranjo experimental de calorimetria de varredura diferencial por fluxo de calor²³⁰.

Curva de DSC relaciona a taxa de fluxo de calor (W) contra temperatura. Desta curva podemos obter a variação de entalpia (ΔH) associada aos processos exotérmico e endotérmico

ocorrendo na amostra investigada. O valor de ΔH para cada evento é obtido através da integração da área sob o pico correspondente.

Esta relação pode ser explicada pela equação básica envolvendo o calor liberado ou absorvido pela amostra durante a transição por unidade de tempo (dH/dt)

$$dH/dt = -dq/dt + (C_s - C_r) dT_p/dt - RC_s d^2q/dt^2 \quad \text{(Equação 10),}$$

onde dq/dt é o fluxo de energia registrado pelo aparelho de DSC, C_s é soma das capacidades caloríficas referentes à amostra e a referência, C_r é a capacidade calorífica da referência, T_p é a temperatura do disco termoeletrico do aparelho expressa por unidade de tempo, e R é a resistência térmica. A área sobre o pico da curva é $\Delta q = -\Delta H$ ²³¹.

O aparelho de DSC por compensação de calor diferencia-se daquele que opera por fluxo de calor, por utilizar fontes separadas para aquecer os recipientes contendo a amostra e referência. Caso a amostra sofra alguma modificação estrutural devido ao efeito da temperatura, provocando assim uma variação em ΔT , ajustes potenciométricos nos dois aquecedores compensarão a diferença na distribuição energética entre a amostra e a referência, fornecendo mais ou menos energia para o sistema de forma a manter ΔT nula^{100,226,229}.

Dentre os diversos trabalhos que envolvem o comportamento termodinâmico de membranas biológicas e modelos de membrana, analisados por DSC, podem ser citados investigações sobre a miscibilidade de fosfolipídios compostos por diferentes ácidos graxos. A heterogeneidade da mistura fosfolipídica provoca um grande alargamento dos picos nas curvas calorimétricas^{64,226}, conforme representado na figura 33, em curvas de DSC referentes a misturas de dimiristoil ácido fosfatídico (DMPA) e dipalmitoil ácido fosfatídico (DPPA)²³².

Outros trabalhos em que podem ser utilizadas medidas de DSC estão relacionados a investigação de mudanças na organização de bicamadas lipídicas, resultantes do estresse oxidativo induzido por espécies reativas e de interações com antioxidantes^{233,234}.

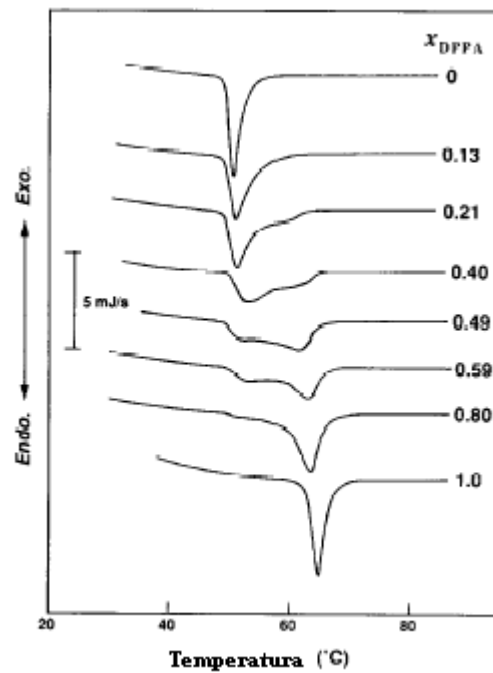


Figura 33- Curvas de DSC para misturas de DMPA/DPPA em diferentes frações molares. O alargamento dos picos é observado à medida que as frações molares (x) de DPPA aumentam nas misturas lipídicas²³².

2.4.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR APLICADA AO ESTUDO DE MEMBRANAS

As interações magnéticas anisotrópicas das membranas biológicas podem ser detectadas através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN), desde que em condições nas quais a velocidade do movimento molecular seja compatível com a escala de tempo do aparelho usado²⁵.

Os fundamentos teóricos da técnica de RMN baseiam-se no princípio de que, em um campo magnético externo aplicado (B_0), núcleos que possuem momentos magnéticos podem absorver uma radiação eletromagnética em determinada região de radio-freqüência. Tal freqüência é determinada através da equação 11:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad \text{(Equação 11),}$$

em que γ é a razão magnetogírica do núcleo, B_0 é o campo aplicado e σ , a constante de blindagem.

Os núcleos mais analisados em amostras de fosfolipídios são ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{31}P , ^{14}N e ^{15}N ^{235,236}. A quantidade de radiação eletromagnética que os núcleos absorvem é dependente da interação entre o campo magnético externo e o campo magnético provocado pelo giro dos elétrons ao longo do eixo nuclear^{235,237,238}.

Os espectrômetros de RMN mais utilizados atualmente são os denominados aparelhos de pulso com transformada de Fourier (figura 34). Nestes aparelhos, um núcleo submetido a um forte campo magnético externo recebe e absorve numerosos pulsos de radiação de radio-freqüência. O tempo de duração destes pulsos, τ , costuma ser menor que 10 μs , e a freqüência de radiação, na ordem de 10^2 a 10^3 MHz. O intervalo entre os pulsos, T , costuma durar de um a

vários segundos. Durante este intervalo, um sinal de radio-freqüência de domínio temporal, denominado decaimento de indução livre (FID), é emitido a partir da relaxação do núcleo excitado. Este sinal é detectado por uma bobina receptora de radio-freqüência, e armazenado em um computador para tratamento de dados. Por aplicação da transformada de Fourier, o FID é convertido em um sinal de domínio de freqüência, que é apresentado no espectro de RMN (figura 35).

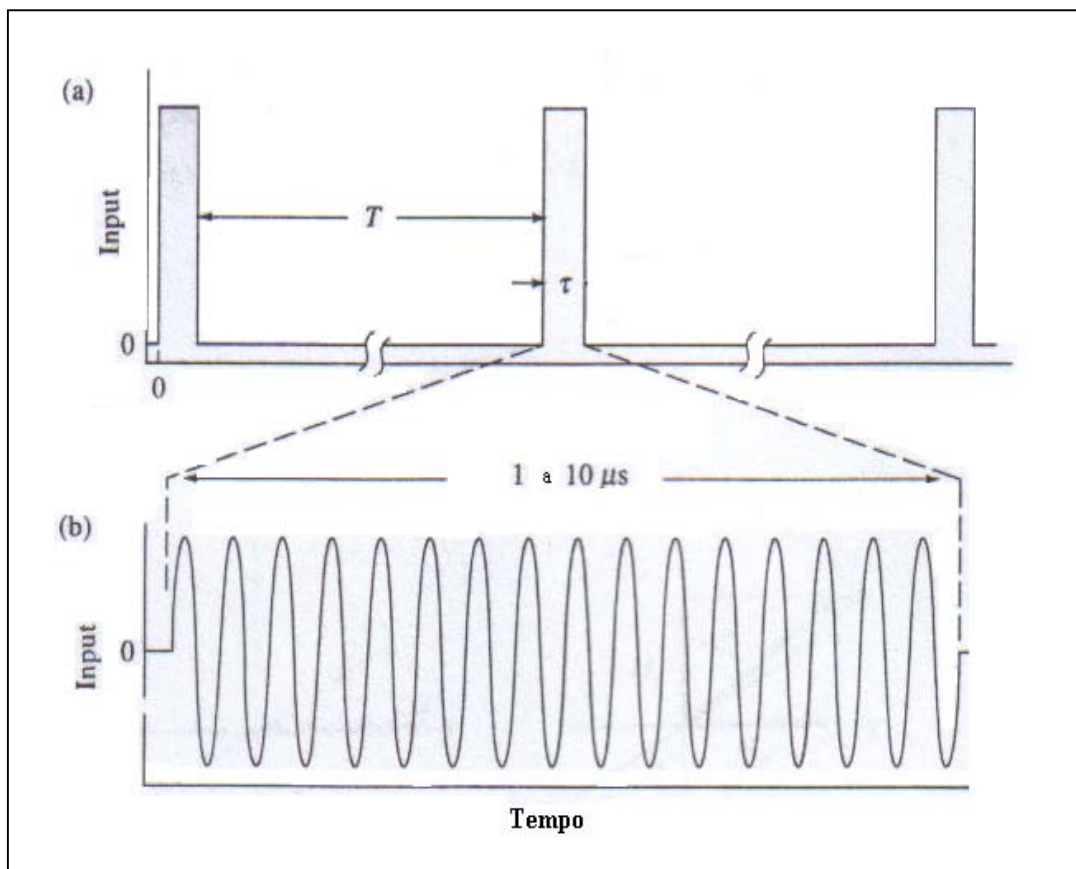


Figura 34- Esquema representando o RMN de pulso: (a) seqüência de pulso; (b) ampliação do pulso de radio-freqüência ²¹⁸

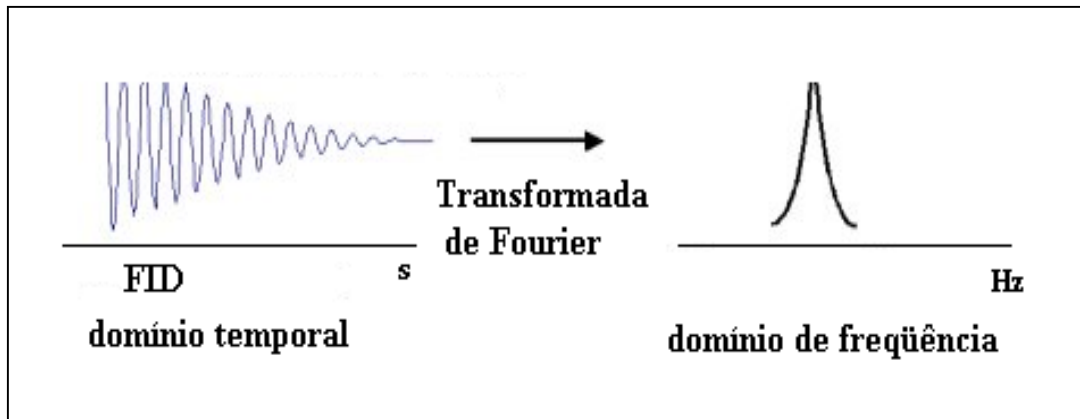


Figura 35- Sinal de FID e sinal de domínio de frequência obtido após transformada de Fourier²¹⁸.

O comportamento do núcleo durante os procedimentos sucedidos na técnica de RMN de pulso pode ser representado através de coordenadas cartesianas com o auxílio de vetores (figura 36). Antes de serem submetidos aos pulsos de radio-freqüência, os momentos magnéticos nucleares (M) estão alinhados com o campo magnético externo, B_0 (figura 36 a). A emissão de um pulso de radiofreqüência no sistema (no caso da figura, um pulso de 90°), gera um segundo campo magnético (representado como B_1 na figura 36 b, atravessando o eixo x) que desvia o alinhamento do vetor M com o eixo z , proporcionando a rotação do vetor em torno do eixo x e do plano y - z (figura 36 c e d). Este desvio caracteriza o estado de ressonância do núcleo, definido como uma condição de transferência de energia, em que uma pequena perturbação periódica (neste caso, B_1) produz uma mudança considerável em algum parâmetro do sistema analisado (como ocorre na orientação de M). Quando a emissão do pulso cessa, o núcleo tende a relaxar e retornar a sua posição alinhada, emitindo o sinal de FID²¹⁸.

Neste processo, deve-se considerar o fato de que os núcleos apresentam-se blindados por uma nuvem eletrônica, cuja densidade varia em função do seu ambiente químico. Esta nuvem de

elétrons gera um campo magnético intrínseco responsável pelo efeito de blindagem no núcleo que, somado ao campo externo, resulta no campo efetivo. Esta blindagem é diretamente proporcional à densidade da nuvem eletrônica presente em torno do núcleo, e altera a frequência de absorção do mesmo em relação à frequência de absorção de um núcleo usado como referência interna. A diferença entre as posições espectrais de um núcleo em particular e de outro núcleo usado como referência, causada pelo grau de blindagem ou desblindagem (o segundo é resultante de interações entre o núcleo e o seu ambiente químico, que reduzem a densidade da sua nuvem eletrônica) do primeiro, é denominada deslocamento químico (δ).

O δ pode ser quantificado em unidades de frequência (Hz) ou em unidades adimensionais, caso seu valor em Hz seja dividido pela frequência aplicada no núcleo e multiplicado por 10^6 . As unidades adimensionais do δ são expressas no espectro de RMN como partes por milhão (ppm)²³⁸. No espectro de RMN o δ pode estar direcionado para regiões espectrais mais blindadas, conhecidas como “campo alto”, ou para regiões menos blindadas, denominadas “campo baixo”, sendo que o campo magnético aumenta da esquerda para direita^{218,238}.

Adicionalmente ao grau de blindagem, outros fatores podem influenciar o δ de um núcleo, como o solvente utilizado durante o experimento, o pH, temperatura do meio no qual a amostra se encontra, concentração e sua interação com reagentes de deslocamento.

A troca de um solvente clorado (como CDCl_3) utilizado para dissolver uma amostra de metil-acetileno em um experimento de RMN de ^1H , por um solvente aromático (como C_6D_6) pode alterar a posição e aparência de sinais referentes aos grupos metila e alquino no espectro ($\Delta\delta$ entre os dois grupos de 0,4 ppm)²³⁸.

A influência da temperatura sobre o δ pode ser exemplificada através de observações descritas em outros estudos, de que o aquecimento de amostras de fosfatidilcolina de ovo pode

provocar um deslocamento do sinal respectivo aos hidrogênios metilênicos ligados à colina ($-\text{CH}_2\text{N}^+$) para um campo mais alto em relação ao mesmo experimento realizado a temperatura ambiente (25 °C) ²³⁹.

Reagentes de deslocamento são complexos de coordenação, geralmente paramagnéticos, que, ao interagir com o núcleo, alteram a sua densidade eletrônica. Apresentam-se como centros compostos por metais ou lantanídeos coordenados a ligantes orgânicos. São exemplos de reagentes de deslocamento paramagnéticos os sais de európio, de praseodímio, e de ferricianeto ^{27,238,240}. Complexos diamagnéticos, como cobalto (III)- octaetilporfirinas, também são considerados reagentes de deslocamento úteis para experimentos de RMN de ¹H que envolvem aminas ²⁴¹.

Os reagentes de deslocamento são comumente utilizados em investigações que envolvem a assimetria transbicamada presente em lipossomas de composição heterogênea, podendo elucidar aspectos topográficos de uma bicamada lipídica, como por exemplo, a distribuição dos lipídios na monocamada externa e interna de vesículas ^{27,28,240,242,243,244}.

Bicamadas compostas por fosfatidilcolina são relativamente impermeáveis a ferricianeto de potássio, propiciando a interação do ânion ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ apenas com o grupo amônio da colina presente na monocamada externa ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{EXT}$) ^{27,28}, modificando assim o grau de blindagem dos hidrogênios ligados a este álcool, em relação ao dos núcleos associados à colina pertencente à monocamada interna da membrana ($-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{INT}$) ²⁷. O ânion ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, paramagnético, pode modificar o δ dos núcleos da membrana de PC através do mecanismo de deslocamento por contato, ou de Fermi, no qual o elétron desemparelhado do íon metálico forma uma ligação química com o grupo amônio presente na colina ^{245,246}. A figura 37 apresenta o espectro de RMN de ¹H de lipossomas de fosfatidilcolina

após interação com 150 mM de ferrocianeto de potássio. A interação eletrostática entre $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT ($\delta=3,26$) com o ânion ferricianeto direciona o δ do sinal dos hidrogênios ligados ao álcool fosfolipídico para um campo de aproximadamente 0,3 ppm mais blindado em relação ao sinal dos hidrogênios ligados a $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$ INT²⁷.

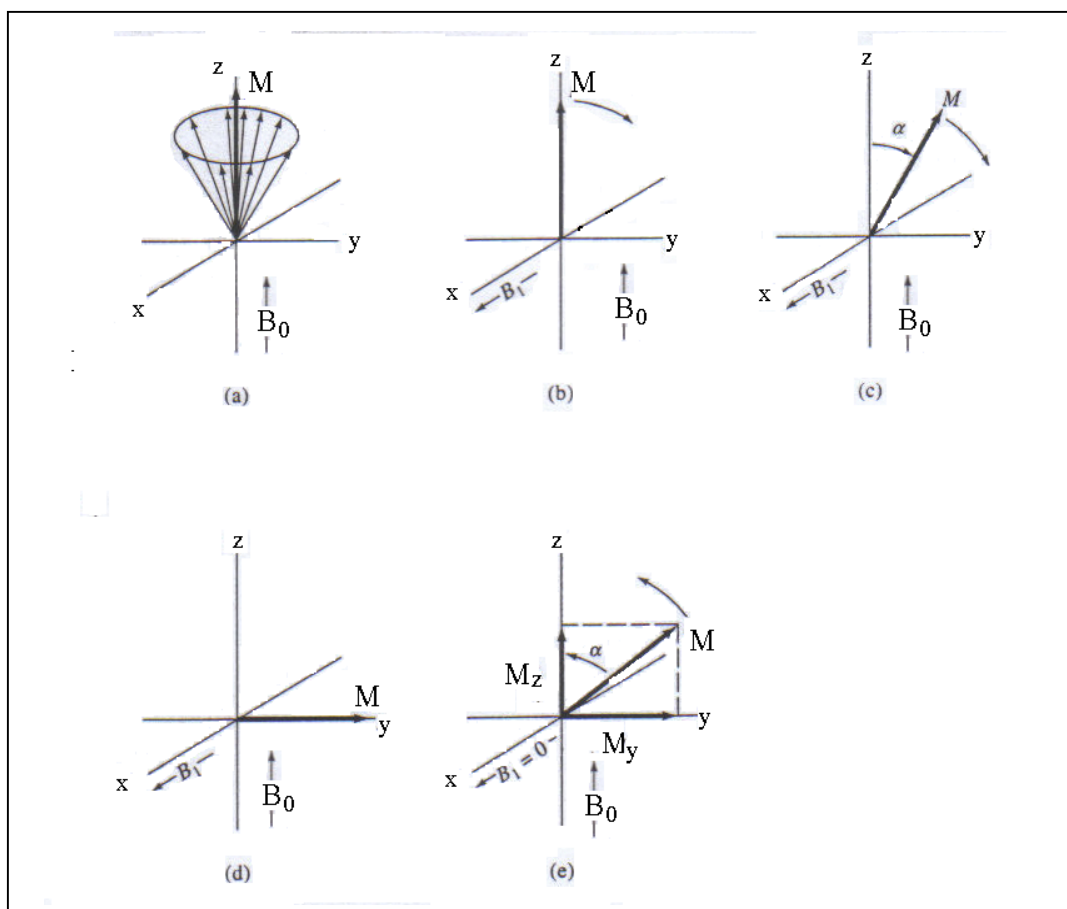


Figura 36- Comportamento da magnetização resultante de um conjunto de núcleos em um experimento de pulso de 90 °: (a) precessão dos núcleos com magnetização resultante (M) na direção do campo magnético externo (B₀); (b), (c) e (d) rotação do vetor M durante o tempo de duração do pulso; (e) relaxação após o término do pulso^{218,238}.

Em espectros de RMN de ^1H , a integral de determinado sinal de domínio de frequência, correspondente à área sob a curva do mesmo, pode ser usada para calcular o número de prótons correspondentes ao sinal obtido ^{218,238}. Em membranas compostas por misturas binárias de fosfolipídios, sendo fosfatidilcolina um de seus compostos, a distribuição do segundo fosfolipídio pode ser investigada comparando-se os valores das integrais dos picos correspondentes aos hidrogênios ligados à $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT e aos ligados à $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ INT ²⁴⁷. BERDEN e colaboradores ²⁷ determinaram a localização preferencial de AF, PE e fosfatidilserina em lipossomas de PC, como sendo a monocamada interna da vesícula.

Outros estudos relacionados às membranas biológicas e modelos de membrana e efetuados através da técnica de RMN, estão associados à elucidação estrutural, velocidade e tipos de movimentos conformacionais e translacionais dos lipídios, ordem e reorientação molecular e polimorfismo ^{25,26}.

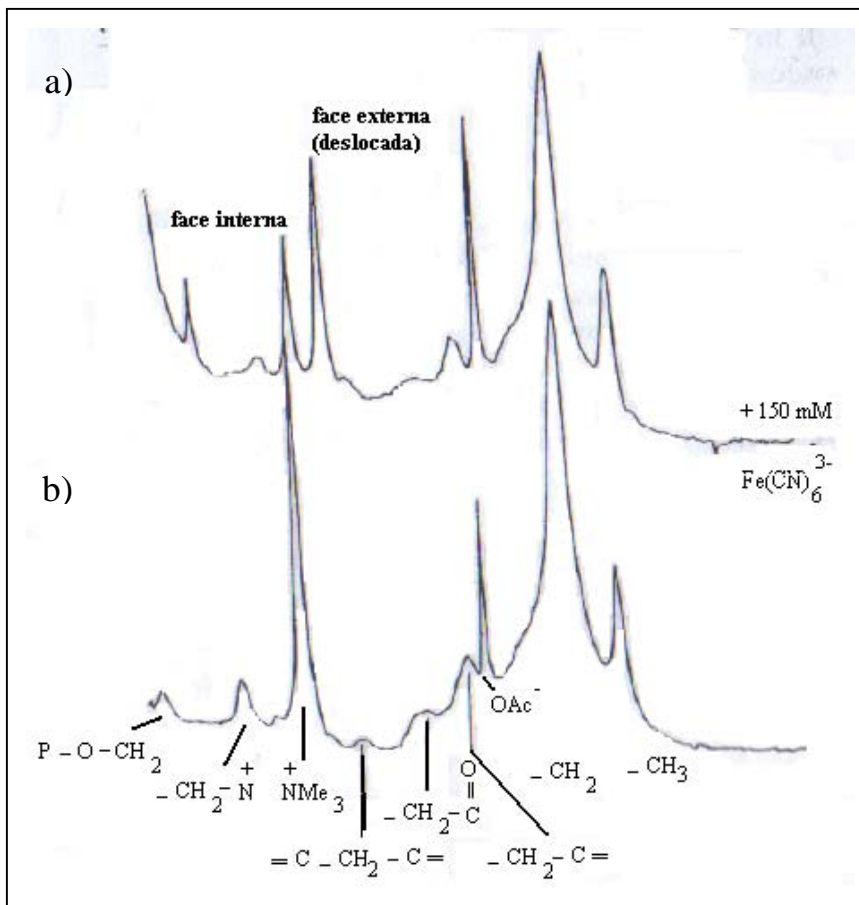


Figura 37- Espectro de RMN de ^1H , 270 MHz de vesículas de PC na presença (a) e na ausência (b) de Fe(CN)_6^{3-} em D_2O ²⁷.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho visa contribuir para uma visão singular e mais completa sobre o processo de lipoperoxidação induzida não somente por espécies reativas de oxigênio, como também por espécies reativas de nitrogênio, em membranas de diferentes constituições. Desta forma, pretende-se investigar os efeitos propiciados por características intrínsecas de fosfolipídios e ácidos graxos, espécies reativas, bem como de antioxidantes naturais, sobre o favorecimento ou inibição do processo lipoperoxidativo. Desde que uma ampla variedade de processos patológicos está associada a lipoperoxidação induzida por espécies reativas, este estudo pode ser útil para prevenção e terapia desses distúrbios.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Realizar um estudo comparativo dos índices de lipoperoxidação induzida pelas espécies reativas radical hidroxil, radical ascorbil e por peroxinitrito em modelos de membrana de diferentes constituições. Os modelos de membrana utilizados consistem de lipossomas, compostos por: i) asolecitina de soja; ii) fosfatidilcolina de ovo fresco; iii) uma mistura de fosfatidilcolina e concentrações crescentes de ácido fosfatídico; e iv) microssomas de fígado de rato.
- ❖ Avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais quercetina, melatonina e vitamina B₆ contra o processo lipoperoxidativo nos sistemas mencionados acima.

- ❖ Investigar o comportamento termodinâmico de lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, através de medidas de ΔH , obtidas por calorimetria de varredura diferencial;
- ❖ Realizar um estudo comparativo da distribuição fosfolipídica em membranas de diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, através de estudos de ressonância magnética nuclear de próton, RMN de 1H .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES UTILIZADOS NO TRABALHO: todos os reagentes utilizados neste trabalho possuem grau de pureza analítica. Consistem em: L- α -fosfatidilcolina de ovo fresco, L- α - ácido fosfatídico de ovo fresco (1,2-diacil-sn-glicero-fosfato), ácido ascórbico, soroalbumina bovina, reagente de Folin, quercetina e ácido tiobarbitúrico (SIGMA, E.U.A.), peróxido de hidrogênio, tampão fosfato de potássio, tris (tris-hidroximetil-aminometano), ácido clorídrico, hidróxido de sódio (NaOH), ácido tricloroacético, ácido 2,2,3,3-*d*₄-3-trimetilsililpropiónico (TSP), sacarose, fosfato de sódio, cloreto de ferro, sulfato de ferro, cloreto de potássio (MERCK, Alemanha), melatonina (ALDRICH, EUA), asolecitina (FLUKA), desoxicolato de sódio (BOEHRINGER MANNHEIM, Alemanha), colato de sódio (SERVA, Alemanha), água deuterada 99,9% (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES INC.), ferricianeto de potássio (RIEDEL-DE HAËN, Alemanha), ferrocianeto de potássio (MALLINKRODT, E.U.A.), cloreto de magnésio (FLUKA, Alemanha), tricina (APPLICHEM, Alemanha), vitamina B₆ (GALENA, Brasil), cloreto de cálcio (NUCLEAR, Brasil), nitrito de sódio (NUCLEAR, Brasil), Glicerol (REAGEN, Brasil).

4.2. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS: os lipídios utilizados na preparação de lipossomas foram fosfatidilcolina, asolecitina e diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, 65,78 mM. Os lipídios foram previamente solubilizados em um tampão contendo 10 mM de tricina, 45 mM de colato de sódio e 25 mM de desoxicolato de sódio, pH 8,0 e submetidos ao método de diálise. Tal método propicia a remoção dos surfactantes colato e desoxicolato de sódio, para subsequente coalescência das micelas formadas e rearranjo lipídico para uma configuração em bicamada¹¹⁹. A diálise foi efetuada a 30 °C, utilizando-se uma membrana com poros de diâmetro estimado em 1-2 nm, contra um volume de dois litros de tampão, constituído de 10 mM de tricina e 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), pH 8,0^{121,122,248,249}. O esquema da preparação de lipossomas através do método de diálise está representado na figura 38.

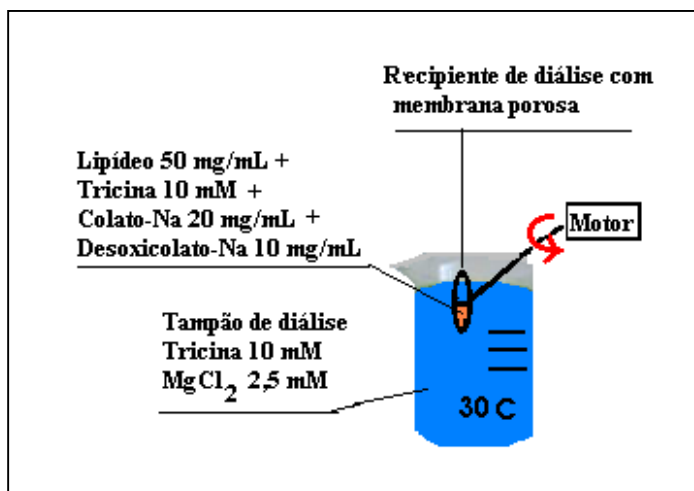


Figura 38- Esquema de diálise para preparação de lipossomas^{121,122,248,249}.

As misturas de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina foram preparadas nas seguintes razões: 1:0,025, 1:0,05 e 1:0,125.

4.3. PREPARAÇÃO DE MICROSSOMAS DE FÍGADO DE RATO: os microssomas são provenientes de fígados de ratos machos Wistar adultos, com 55-60 dias, pesando de 160-190 g. Os animais utilizados foram mantidos a temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*, de acordo com as recomendações éticas. Estes animais foram fornecidos pelo laboratório da prof. Dra. Fátima R.M. da Silva, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

Os microssomas foram então obtidos a partir da técnica de centrifugação diferencial através da agregação com cálcio. Os fígados foram homogeneizados em tampão tris-sacarose 10 mM pH 7,4 e centrifugados a 600g (= 600xg= força centrífuga) por 5 minutos em temperatura de 4°C, isolando-se o sobrenadante. A fração mitocondrial foi obtida a partir de uma nova centrifugação do sobrenadante, a 12000g por 10 minutos. Após esta centrifugação, o precipitado (contendo a fração mitocondrial) foi separado do sobrenadante, e neste foi adicionado cloreto de cálcio 80 mM, para precipitação da fração microssomal. O precipitado foi lavado com 15 mM de cloreto de potássio / 10 mM de tampão tris-HCl pH 7,4 e centrifugado a 25000 g por 15 minutos. Depois de lavados, os microssomas foram ressuspensos em 20% de glicerol em tampão fosfato de sódio 0,1 M. A fração microssomal foi então congelada a -70 °C em nitrogênio líquido para posterior análise e determinação da concentração de proteínas^{250,251,252}.

4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA: o método de Lowry²⁵² foi utilizado para determinar a concentração total de proteínas nos microssomas. O método consiste no tratamento de uma amostra com Cu²⁺ alcalino e reagente de Folin. A cor azulada, resultante da

complexação de Cu^{2+} com aminoácidos e da redução provocada no fosfomolibdato (presente no reagente de Folin) ao interagir com o complexo, pode ser detectada espectrofotometricamente a 660 nm. As medidas de absorvância são proporcionais à quantidade de proteína presente na amostra. Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se como padrão soroalbumina bovina.

4.5. SÍNTESE DE RADICAL HIDROXIL: o radical hidroxil foi obtido a partir da reação entre 2,8 mM de H_2O_2 , 0,02 mM de FeCl_3 e 0,1 mM de ácido ascórbico. O ácido ascórbico foi utilizado como agente redutor de Fe^{+3} , recuperando Fe^{+2} para continuar o ciclo de formação do radical. O método de obtenção de $\cdot\text{OH}$ foi adaptado de Halliwell, Gutteridge e Aruoma²⁵³.

4.6. SÍNTESE DE RADICAL ASCORBIL : o radical ascorbil foi produzido através da reação entre 0,025 mM de FeSO_4 e 0,50 mM de ácido ascórbico¹⁶⁶.

4.7. SÍNTESE DE PEROXINITRITO: o peroxinitrito foi sintetizado pelo método “quenched-flow”, proposto por Koppenol e colaboradores (figura 39)¹⁶⁹. Um sistema a vácuo de erlenmeyers conectados por um T de vidro foi utilizado para misturar soluções de 0,6 M de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 0,7 M de ácido clorídrico (HCl), 0,6 M de nitrito de sódio (NaNO_2) e 1,5 M de hidróxido de sódio (NaOH), previamente resfriadas a 0°C , em uma vazão de 10 mL/s (figura 40). Durante a síntese, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo e o produto final foi coletado após um descarte dos primeiros mililitros em um frasco de Kitasato (de forma a estabelecer o fluxo de mistura das soluções) e armazenado a -80°C até sua utilização nos experimentos. Dados de literatura afirmam que o peroxinitrito sintetizado por este método e armazenado nas condições descritas permanece estável até, no máximo, 15 dias. Experimentalmente, a estabilidade do peroxinitrito perdura até 5 dias após sua preparação.

A concentração do peroxinitrito obtido foi determinada através de medidas espectrofotométricas de absorção no UV a 302 nm (coeficiente de extinção molar, $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)²⁵⁴. A concentração utilizada nos ensaios de lipoperoxidação (ver adiante) foi de 2,64 mM.

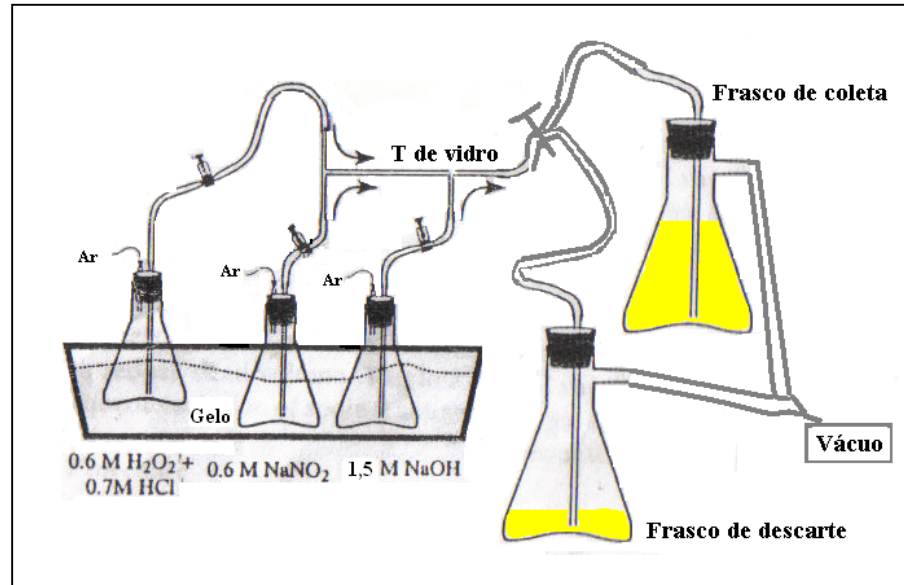


Figura 39- Sistema utilizado para síntese de peroxinitrito (adaptado de Koppenol e colaboradores¹⁶⁹).

4.8. LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR ESPÉCIES REATIVAS: a lipoperoxidação foi induzida por radical hidroxil, radical ascorbil ou peroxinitrito, através da geração ou adição destas espécies em um meio reacional contendo lipossomas (12,5 mg/mL de fosfolipídios) ou microsomas de fígado de rato (contendo 1 mg/mL de proteínas), e antioxidantes (no caso dos ensaios para obtenção das curvas dose-resposta), pH 7,4. As soluções tampão adicionadas no meio eram compostas por 10 mM de tampão fosfato de potássio, para ensaios com radical hidroxil, e 100 mM de Tris- HCl para testes com radical ascorbil e peroxinitrito.

Dois tipos de experimentos controle foram realizados, para eliminação de interferentes nas leituras espectrofotométricas. Um dos controles apresentou em seu meio reacional todos os

componentes descritos anteriormente, com exceção das membranas lipídicas. Os valores de leituras espectrofotométricas obtidos com estes controles foram subtraídos dos valores detectados com os modelos de membrana, para tratamento dos dados. O segundo controle foi realizado na ausência de espécies oxidantes no meio de reação, para detecção de valores de absorvância relativos a peroxidação basal, induzida pelo o oxigênio do ar. Este valor também foi descontado dos valores obtidos com as amostras contendo membranas lipídicas e as espécies reativas testadas neste trabalho.

As amostras e os controles foram incubados durante 30 minutos a 37°C e a extensão do dano por lipoperoxidação nas membranas foi detectada através do método do ácido tiobarbitúrico^{220,221}. Este método caracteriza-se pela formação de um aduto de coloração rósea a partir da reação entre malonildialdeído (MDA), produto majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA) (figura 40). A reação ocorre em pH ácido, propiciado pela adição de ácido tricloroacético no meio⁸. Esta reação foi acelerada através de incubação a 100°C^{220,221}. O tempo médio desta incubação foi de 30 minutos.

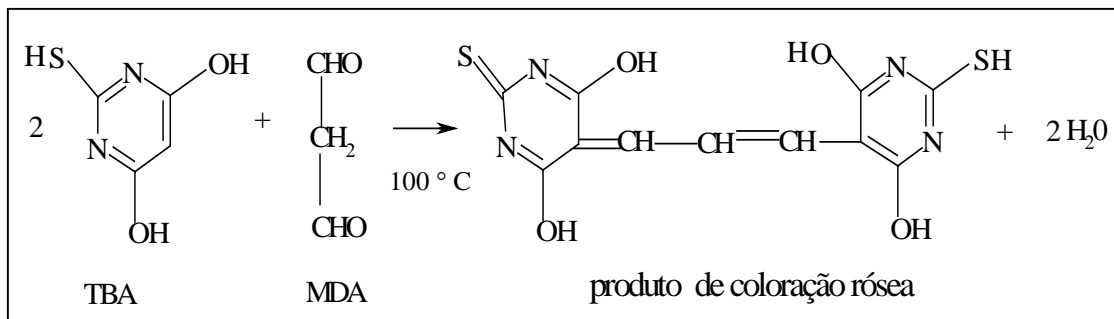


Figura 40- Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressa em μmol de TBARS/ mg de lipídio (no caso de lipossomas) ou de proteína (no caso de microsomas)

foi determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 535 nm, e calculada usando um coeficiente de absorvidade molar, ϵ , de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁸

4.9. EXPERIMENTOS COM CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL:

lipossomas compostos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina em um recipiente de alumínio selado (20 mg) foram submetidos a uma varredura na velocidade de $5^\circ\text{C} / \text{min}$, em uma faixa de temperatura de -50 a 30°C . Utilizou-se como referência um recipiente selado vazio. O fluxo de nitrogênio usado foi de 50/50 mL/min. A calibração do aparelho, no que diz respeito à temperatura e calorimetria, foi realizada com índio.

4.10. EXPERIMENTOS COM RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H :

os experimentos com ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H foram realizados com amostras de lipossomas contendo diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, diluídas para uma concentração de fosfatidilcolina a 30 mM, em 0,2 mM de ferricianeto de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, preparado em água deuterada²⁷. Realizou-se testes paralelos com ferrocianeto de potássio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, nas mesmas condições. As medidas foram efetuadas em temperatura de 310 K, utilizando como referência interna o ácido 2,2,3,3-*d*₄-3-trimetilsililpropiónico (TSP). A análise da distribuição lipídica nos lipossomas foi realizada a partir da comparação entre os valores de integrais dos picos espectrais referentes aos hidrogênios ligados à porção colina localizada na face externa e interna da bicamada^{27,247}.

4.11. ANTIOXIDANTES: a solução estoque de melatonina foi preparada a partir de uma solubilização prévia do antioxidante em etanol 1% e diluição para a concentração desejada nos tampões respectivos aos ensaios de lipoperoxidação²⁵⁵. As soluções estoque de quercetina e a

vitamina B₆ foram preparadas com água milli-Q. Melatonina e vitamina B₆ foram estocadas em ausência de luz e calor^{12,256}.

4.12. INSTRUMENTAÇÃO: a preparação de lipossomas pelo processo de diálise, bem como a incubação do meio reacional durante os ensaios de lipoperoxidação, foram realizados em banho-maria Fabbe-Primar 169.

As leituras espectrofotométricas dos ensaios relativos aos níveis de lipoperoxidação e dosagens de proteínas microssomais e de peroxinitrito foram efetuadas em aparelho UV-vis. Pharmacia LKB Ultrospec III.

As medidas de calorimetria de varredura diferencial dos lipossomas foram realizadas em célula DSC 2010 TA e os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em espectrômetro Bruker AC 200F .

4.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA: os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de triplicatas de experimentos independentes. Cada experimento foi repetido de três a quatro vezes (n=3-4). Quando necessário, o tratamento de dados foi efetuado através da análise de testes de variação Kruskal-Wallis, utilizando-se um programa GraphPad Prism 3.0. Os valores de *p* menores que 0,05 (**p* < 0,05) foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR RADICAL HIDROXIL, RADICAL ASCORBIL E PEROXINITRITO EM LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA E ASOLECITINA E EM MICROSSOMAS DE FÍGADO DE RATO

Os índices de lipoperoxidação total induzida por radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical ascorbil ($\cdot\text{Asc}$) e peroxinitrito (ONOO^-) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e em microsomas de fígado de rato (MC) estão representados na figura 41 e na tabela 8. Na figura 41, os valores de lipoperoxidação total estão comparados aos valores relativos a peroxidação basal nas membranas.

O potencial oxidante das espécies reativas testadas em lipossomas de fosfatidilcolina apresentou-se na ordem: radical hidroxil \approx radical ascorbil $>$ peroxinitrito. Em lipossomas de asolecitina, tal ordem apresentou-se como: ascorbil $>$ hidroxil \approx peroxinitrito. Em microsomas, o menor índice de lipoperoxidação foi observado em testes com peroxinitrito, enquanto que os potenciais oxidativos referentes a radical hidroxil e ascorbil, nas condições estabelecidas, apresentaram valores semelhantes entre si.

As variáveis determinantes dos diferentes índices de lipoperoxidação obtidos neste ensaio parecem estar relacionadas com o conteúdo fosfolipídico das membranas e com as características intrínsecas das espécies reativas testadas^{29,180,181,256}.

A influência do conteúdo fosfolipídico das membranas utilizadas neste trabalho sobre os índices lipoperoxidativos parece estar relacionada a dois fatores importantes: o favorecimento energético existente para a abstração de hidrogênios metilênicos bis- α lícicos, presentes em

cadeias poliinsaturadas dos ácidos graxos ^{180,181}, por espécies reativas, e a presença de cargas nas membranas ²⁹.

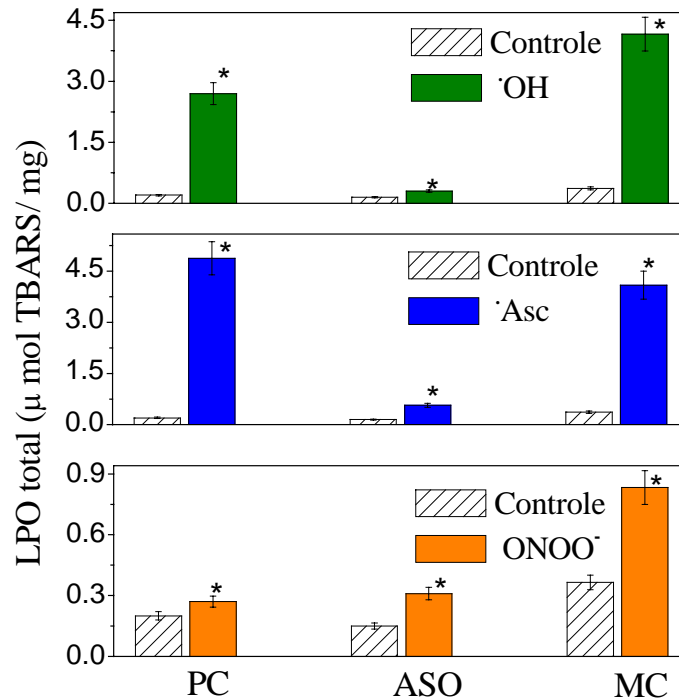


Figura 41- Índices de lipoperoxidação (LPO) total induzida por radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), radical ascorbil ($\cdot\text{Asc}$) e peroxinitrito (ONOO^-) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e microsomas de fígado de rato (MC), expressa em μmol de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg de lipídio (no caso de lipossomas) ou proteína (no caso de microsomas). Os dados foram tratados estatisticamente através da análise de testes de variação Kruskal-Wallis. Os valores de p menores que 0,05 ($*p < 0,05$) foram considerados significativos, quando comparados com seus respectivos controles.

LPO TOTAL INDUZIDA POR ESPÉCIES REATIVAS EM MEMBRANAS (%)			
ESPÉCIES REATIVAS	PC	ASO	MC
$\bullet\text{OH}$	92	49	91
$\bullet\text{Asc}$	96	74	91
ONOO^-	26	52	56

Tabela 8- Percentagens relativas aos índices de lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) e peroxinitrito (ONOO^-) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e em microsomas de fígado de rato (MC), obtidos a partir dos resultados apresentados na figura 41. Os valores de percentagens obtidos com as amostras foram descontados dos obtidos com seus respectivos controles.

O conteúdo de ácidos graxos que compõem a fosfatidilcolina de ovo fresco e a fosfatidilcolina de soja foi descrito anteriormente na tabela 3. Desta forma, a composição de ácidos graxos insaturados presentes em fosfatidilcolina de ovo fresco inclui o ácido oleico (C 18:1, 32 %), linoleico (C 18:2, 18%), palmitoleico (C 16:1, 2%) e aracdônico (20:4, 3%)¹¹. Membranas de microsomas de fígado de rato possuem uma composição de ácidos graxos semelhante à de fosfatidilcolina de ovo, diferindo apenas pela presença minoritária de ácido docohexanóico (C 22:6, 4,3 %) ¹⁶⁶. O conteúdo de ácidos graxos de microsomas e fosfatidilcolina poderia justificar a similaridade obtida nos índices de lipoperoxidação, induzida por radical hidroxil e radical ascorbil, nestas duas membranas. Asolecitina de soja é composta por uma mistura de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol ³¹. Os fosfolipídios

presentes em asolecitina contêm os seguintes ácidos graxos insaturados: ácido oleico (C 18:1, 13% em fosfatidilcolina, 7% em fosfatidiletanolamina e 5% em fosfatidilinositol), linoleico (C 18:2, 59% em fosfatidilcolina, 60 % em fosfatidiletanolamina e 16% em fosfatidilinositol), e linolênico (C 18:3, 5% em fosfatidilcolina, 6 % em fosfatidiletanolamina e 7% em fosfatidilinositol) ¹¹. A composição de ácidos graxos insaturados nos modelos de membrana está apresentada na tabela 9, para fins comparativos.

Esperava-se que, por conter mais hidrogênios bis-alílicos em sua estrutura, as membranas de asolecitina apresentariam maior susceptibilidade a lipoperoxidação induzida pelas espécies reativas, quando comparadas às membranas de fosfatidilcolina. Os resultados obtidos indicaram que, nas condições utilizadas, a presença de hidrogênios bis-alílicos nas cadeias apolares dos fosfolípidios não poderia ser o único fator determinante da susceptibilidade das membranas à ação de espécies reativas.

Já foi estabelecido que a presença de cargas nas membranas modifica a velocidade de interação entre lipídios, radicais e antioxidantes, afetando as colisões entre os mesmos ^{29,256}. Este princípio foi aplicado por Barclay e Vinqvist ²⁹ ao demonstrarem que a força de repulsão entre a superfície da membrana e Trolox (vitamina E solúvel) possui papel importante na eficiência do antioxidante como seqüestrador de radicais peroxil.

A cabeça polar da fosfatidilcolina possui uma carga positiva e outra negativa, que podem estar direcionadas para o interior ou exterior da membrana, dependendo do pH e dos contra-íons presentes no meio reacional ²⁵⁷. Em pH neutro ou básico, a carga positiva presente na colina pode estar orientada em direção ao meio reacional, propiciando a atração de compostos negativamente carregados, como o peroxinitrito. Tal força atrativa poderia influenciar os valores relativos aos níveis de lipoperoxidação em fosfatidilcolina induzidos por peroxinitrito e seus produtos de decomposição. Entretanto, os resultados obtidos mostraram uma menor susceptibilidade de

lipossomas de fosfatidilcolina a lipoperoxidação induzida pela espécie reativa, quando comparada a lipossomas de asolecitina. Tal fato pode ser discutido com base em um estudo realizado por Khairutdinov e colaboradores ²⁵⁸ que demonstrou a impermeabilidade de fosfatidilcolinas sintéticas às espécies aniônicas peroxinitrito e carbonato (CO_3^-), e a sua rápida permeação pelas espécies neutras ácido peroxinitroso e radical dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet).

Composição de ácidos graxos insaturados nos modelos de membrana

PC de ovo		MC		ASO de soja					
Ac. Graxo	%	Ac. Graxo	%	Ac. Graxo	%	Ac. Graxo	%	Ac. Graxo	%
Oleico (18:1)	32	Oleico (18:1)	9,7	Oleico (18:1)	13	Oleico (18:1)	7	Oleico (18:1)	5
Linoleico (18:2)	18	Linoleico (18:2)	12,8	Linoleico (18:2)	59	Linoleico (18:2)	60	Linoleico (18:2)	16
Palmitoleico (16:1)	2	Palmitoleico (16:1)	2,1	Linolênico (18:3)	5	Linolênico (18:3)	6	Linolênico (18:3)	7
Aracdônico (20:4)	3	Aracdônico (20:4)	27,2						
		Docohexanóico (22:6)	4,3						

Tabela 9- Percentagem de ácidos graxos insaturados em fosfatidilcolina (PC) de ovo, microssomas de fígado de rato (MC) e em asolecitina (ASO) de soja.

A carga negativa propiciada pelo fosfatidilinositol em lipossomas de asolecitina, pode formar uma barreira elétrica, na qual espécies reativas e antioxidantes podem também estar negativamente carregadas, aumentando a forças de repulsão dentro do sistema ³¹.

Neste trabalho, os efeitos causados pela densidade de cargas, presentes na superfície de membranas, nos índices de lipoperoxidação induzida por espécies reativas foram investigados. Com esta finalidade, lipossomas contendo diferentes concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina foram utilizados como modelo de membrana, visto que, tal como o fosfatidilinositol, o ácido fosfatídico é um agente indutor de carga negativa em membranas.

5.2. EFEITOS DA INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO FOSFATÍDICO EM LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA NA LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR RADICAL HIDROXIL, RADICAL ASCORBIL E PEROXINITRITO

Os lipossomas de fosfatidilcolina constituem um modelo de membrana simples e eficiente para o estudo do efeito da densidade de carga de superfície nos níveis de lipoperoxidação induzida por espécies reativas. O ácido fosfatídico foi utilizado como agente indutor de carga negativa nos lipossomas de fosfatidilcolina, em diferentes razões molares.

As percentagens de lipoperoxidação induzida por radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) e peroxinitrito (ONOO^-) em lipossomas contendo diferentes razões entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC) estão apresentadas na figura 42.

O aumento gradual da razão entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina resultou em uma redução do percentual de lipoperoxidação induzido pelas três espécies reativas testadas. A incorporação de 0,125 M de ácido fosfatídico nos lipossomas de fosfatidilcolina

acarretou em uma queda de aproximadamente 58%, 85% e 87% nos índices de lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito, respectivamente.

Outros estudos, realizados com vesículas de dipalmitoilfosfatidilcolina e dipalmitoil ácido fosfatídico, sugerem que, em pH neutro, interações entre ácido fosfatídico e a forma dissociada do ácido aracdônico originam complexos polianiônicos. Estes complexos podem ligar-se de forma eficiente a íons ferrosos, inibindo desta forma a lipoperoxidação induzida por ferro²⁵⁹. Neste trabalho, o sistema gerador dos radicais hidroxil e ascorbil envolve reações com íons ferrosos (ver no item Materiais e Métodos). A interação dos mesmos com o ácido aracdônico, presente em fosfatidilcolina de ovo fresco, poderia acarretar em uma menor disponibilidade de Fe²⁺ para a produção dos radicais e, conseqüentemente, em uma redução nos índices lipoperoxidativos em membranas.

A inibição do dano oxidativo induzido por peroxinitrito poderia estar associada às concentrações decrescentes de fosfatidilcolina contidas nas membranas, à medida que a razão entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina aumenta. A reação entre fosfatidilcolina e peroxinitrito é de primeira ordem em fosfatidilcolina, o que estabelece uma relação direta entre a sua concentração no ensaio e o rendimento de malonildialdeído obtido como produto da lipoperoxidação, em condições nas quais a concentração de peroxinitrito é fixa²⁵⁸.

A partir destas informações, esperar-se-ia observar uma inibição linear do processo de lipoperoxidação induzido pelas três espécies reativas testadas, com a incorporação de quantidades crescentes de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina. Entretanto, as percentagens de inibição do processo lipoperoxidativo alcançadas excedem os valores típicos associados a uma relação linear com as quantidades crescentes de ácido fosfatídico. Na razão máxima entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC máx), utilizada neste trabalho, a

quantidade de ácido fosfatídico não é maior que 10 % da concentração total de fosfatidilcolina e, neste modelo, os índices de lipoperoxidação alcançaram o zero.

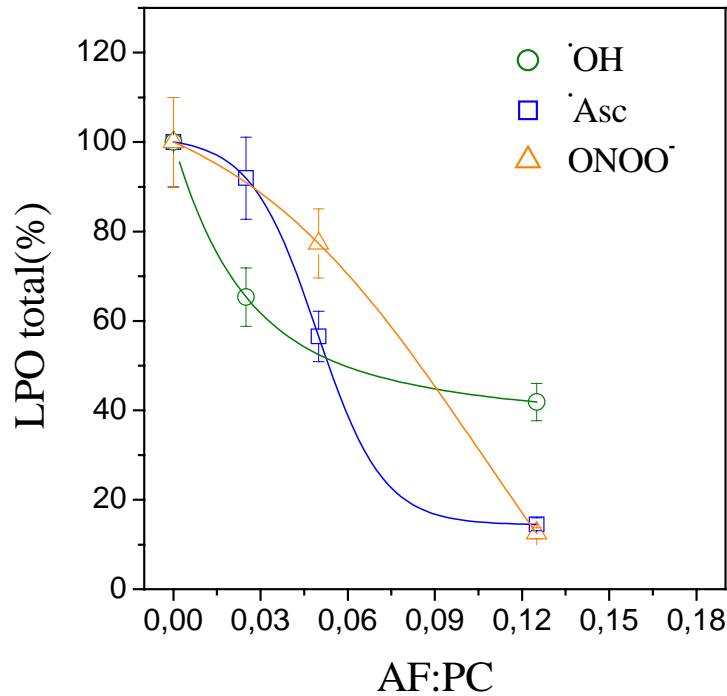


Figura 42- Índices de lipoperoxidação (LPO) total induzida por radical hidroxil, $\bullet\text{OH}$ (círculos verdes), radical ascorbil, $\bullet\text{Asc}$ (quadrados azuis) e peroxinitrito, ONOO^- (triângulos laranjas) em função de lipossomas contendo diferentes razões entre concentrações de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC).

Os resultados demonstraram uma probabilidade considerável de que outras interações, diferentes das eletrostáticas, envolvendo ácido fosfatídico, poderiam estar influenciando as interações entre oxidantes e fosfolipídios de membrana. Por esta razão, o estudo foi direcionado para análises do efeito da incorporação de ácido fosfatídico no comportamento de

fase termotrópica de lipossomas de fosfatidilcolina, através de medidas de calorimetria de varredura diferencial, discutido a seguir.

5.3. EFEITOS DA INCORPORAÇÃO DE ÁCIDO FOSFÁTICO NO COMPORTAMENTO TERMODINÂMICO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA, ANALISADOS POR CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL

O efeito da incorporação de ácido fosfático no comportamento de fase termodinâmica de lipossomas de fosfatidilcolina foi avaliado a partir da ΔH , obtida a partir de medidas de calorimetria de varredura diferencial (DSC), de sistemas contendo as seguintes razões molares entre ácido fosfático e fosfatidilcolina: i) 0,00; ii) 0,05 e iii) 0,125. Todas as curvas obtidas apresentaram um comportamento exotérmico, como pode ser observado na figura 43.

Ácidos graxos insaturados costumam apresentar transições em faixas negativas de temperatura, quando hidratados ¹¹². A curva de DSC obtida nos ensaios com lipossomas constituídos por ácido fosfático e fosfatidilcolina igual a zero (AF:PC = 0,00) apresentou um comportamento exotérmico cujo ponto médio foi detectado em $-17,78^{\circ}\text{C}$, valor que coincide com a temperatura de transição de fase do ácido oleico, -18°C ¹¹³. Em estudos anteriores, Tirosh e colaboradores ²³³ observaram, em ensaios com bicamadas de fosfatidilcolina de ovo, uma transição larga em -8°C . O alargamento das curvas relativas a transições presentes em lipossomas de fosfatidilcolina de ovo fresco pode estar associado à composição diversificada de ácidos graxos presentes neste fosfolípido ²³².

A incorporação de concentrações crescentes de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina causou uma redução nos valores de ΔH do sistema analisado, como pode ser observado nos valores descritos na tabela 10.

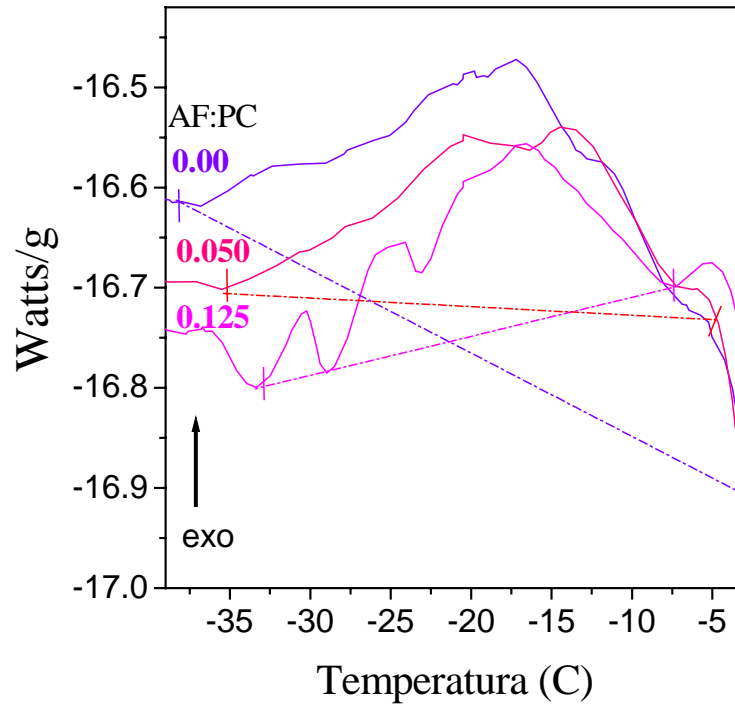


Figura 43- Curvas de DSC de lipossomas constituídos por diferentes razões molares de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC).

As curvas exotérmicas, bem como os valores de entalpia obtidos, sugerem uma transição da amostra para um estado menos energético. Assim sendo, os resultados obtidos sugerem um ordenamento progressivo dos lipídios, à medida que a concentração de ácido fosfatídico aumenta no sistema. A incorporação de extensas cadeias alquílicas, presentes no ácido fosfatídico, em vesículas de PC, pode preencher “lacunas” originadas pelo empacotamento característico de suas

cadeias polares, reduzindo o efeito desestabilizante provocado pelo arranjo inicial do fosfolipídio e aumentando a intensidade das forças de van der Waals em sua região apolar²⁶⁰⁻²⁶². Um arranjo lipídico mais ordenado proporciona uma redução da permeabilidade da bicamada a espécies reativas. Isto altera a difusão transmembrana das espécies oxidantes, reduzindo a velocidade das reações associadas a estas e, conseqüentemente, a extensão do dano lipoperoxidativo induzido pelas mesmas^{197,258}.

ΔH EM LIPOSSOMAS CONSTITUÍDOS	
POR AF E PC	
AF : PC	ΔH (J/g)
0,0	2.079
0,05	1.552
0,125	1.354

Tabela 10- Variações de entalpia (ΔH) de lipossomas constituídos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, em diferentes razões entre concentrações lipídicas (AF:PC), obtidas das curvas de DSC apresentadas na figura 44.

5.4. DISTRIBUIÇÃO LIPÍDICA EM LIPOSSOMAS CONSTITUÍDOS POR ÁCIDO FOSFATÍDICO E FOSFATIDILCOLINA, DETECTADA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ^1H

A interação entre os lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina (AF:PC, nas razões molares 0,00, 0,05 e 0,125) e ânion ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, provocou um desdobramento no sinal referente aos hidrogênios ligados a porção colina da monocamada externa do lipossoma, $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{ EXT}$, apenas para a primeira razão molar estudada (AF:PC 0,00), que não envolve a presença do ácido fosfatídico no lipossoma (figura 44)

Berden e colaboradores ²⁷ realizaram este ensaio com lipossomas constituídos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina nas razões molares de 0,3 e 1,0, nos quais foi considerada uma assimetria na bicamada lipídica, baseada na evidência da localização preferencial do ácido fosfatídico na monocamada interna da membrana. Entretanto, resultados obtidos por Koter e colaboradores ⁶⁵ demonstraram uma distribuição aleatória e uma organização simétrica de fosfatidilcolina e ácido fosfatídico na bicamada, em uma grande faixa de razões molares. De qualquer forma, nas duas possibilidades de distribuição lipídica citadas para lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina em diferentes razões molares, a interação de ânion ferricianeto com $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{ EXT}$, propiciaria o desdobramento dos sinais de hidrogênio ligados a colina em um espectro de um ^1H -RMN. O não-desdobramento de tais sinais, observado nos espectros de lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, nas razões molares estudadas neste trabalho, poderia sugerir uma terceira interação entre os dois fosfolipídios que, de alguma forma, não permite a ligação do reagente de deslocamento com a $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{ EXT}$.

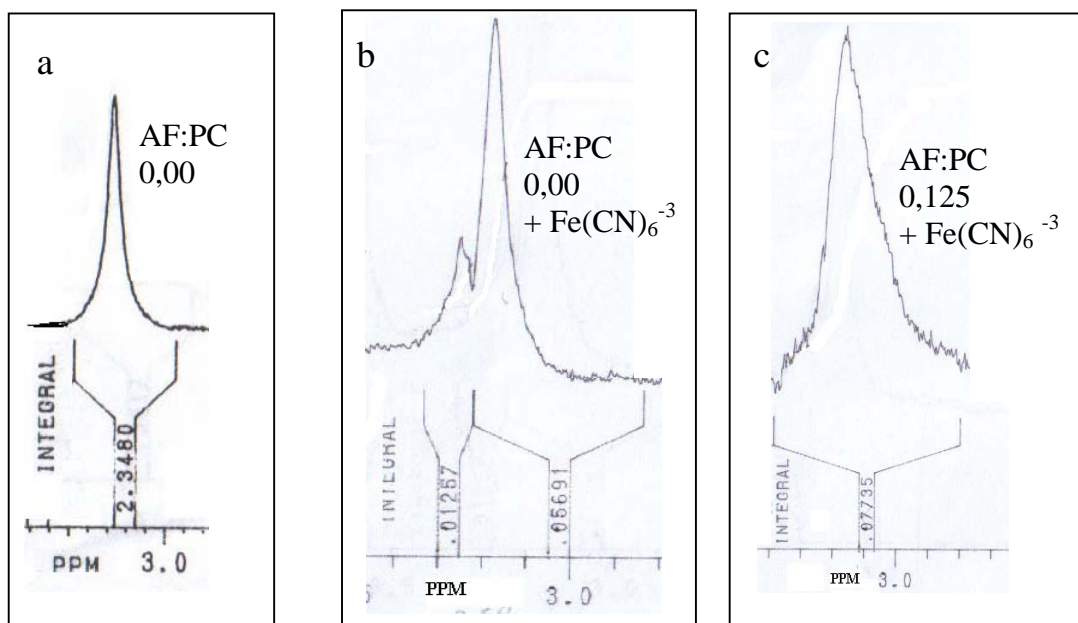


Figura 44- Sinais de RMN de ^1H (200 MHz, em água deuterada) dos hidrogênios ligados a $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT de lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina de razão molar igual a zero, na ausência (a) e na presença (b) de ânion ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, e de lipossomas compostos por ácido fosfático e fosfatidilcolina de razão molar igual a 0,125 (c) na presença do reagente de deslocamento.

Trabalhos anteriores demonstraram que complexos com centros metálicos diamagnéticos são reagentes de deslocamento úteis para ensaios de RMN de ^1H com aminas ²⁴¹. Deste modo, ensaios paralelos aos efetuados com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ foram realizados com o seu análogo diamagnético, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$. Observou-se, a partir da análise dos resultados, um desdobramento dos sinais de hidrogênios ligados à $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$, deslocando o sinal dos hidrogênios ligados à $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT para um campo mais baixo ($\Delta\delta = 0,3$) (figura 45).

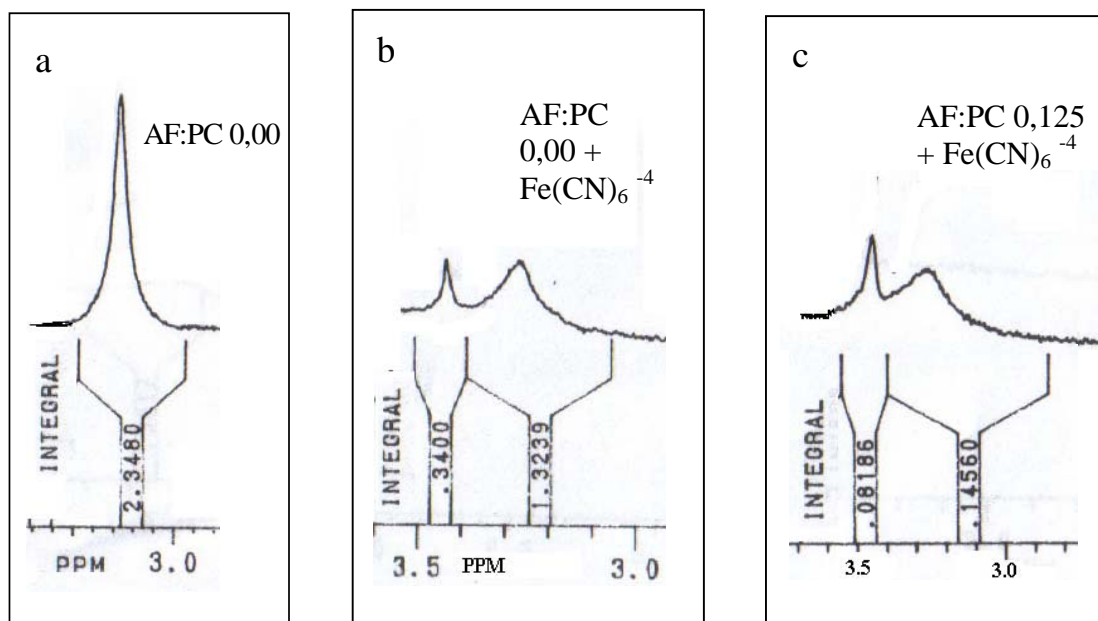


Figura 45- Sinais de RMN de ^1H (200 MHz, em água deuterada) dos hidrogênios ligados a $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT de lipossomas compostos por ácido fosfático e fosfatidilcolina de razão molar igual a zero, na ausência (a) e na presença (b) de ânion ferrocianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ e de lipossomas compostos por ácido fosfático e fosfatidilcolina de razão molar igual a 0,125 (c) na presença do reagente de deslocamento.

O efeito de desblindagem dos picos de hidrogênio ligados à $\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT já foi observado em ensaios com ânion ferricianeto, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$, em colinas presentes em apolipoproteínas B, demonstrando uma versatilidade na orientação do deslocamento (para campo alto ou baixo) provocado por estes reagentes^{263,264}.

As razões entre integrais calculadas a partir dos picos referentes aos hidrogênios ligados à porção colina presente na monocamada externa e interna ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ EXT/ $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ INT) de lipossomas compostos por ácido fosfático e fosfatidilcolina em diferentes razões molares, desdobrados por interação com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$, estão demonstradas na tabela 11.

DISTRIBUIÇÃO DE PC EM LIPOSSOMAS DE AF:PC	
AF:PC	$N^+(CH_3)_3$ EXT/ $N^+(CH_3)_3$ INT
0,00	3,9
0,05	1,89
0,125	1,78

Tabela 11- Razão entre integrais calculadas a partir dos picos de RMN de 1H (200 MHz, em água deuterada) referentes aos hidrogênios ligados à porção colina presente na monocamada externa e interna ($N^+(CH_3)_3$ EXT/ $N^+(CH_3)_3$ INT) de lipossomas compostos por ácido fosfático e fosfatidilcolina em diferentes razões molares (AF:PC), desdobrados por interação com ânion ferrocianeto, $Fe(CN)_6^{-4}$.

Considerando as razões apresentadas na tabela 11, as moléculas de ácido fosfatídico parecem estar localizadas preferencialmente na monocamada interna da vesícula lipídica, resultados que condizem com os apresentados por Berden e colaboradores²⁷. Os resultados obtidos a partir do uso de sais de ferrocianeto nos ensaios de distribuição lipídica em bicamadas, sugerem a viabilidade da utilização desta espécie diamagnética como reagente de deslocamento em ensaios de 1H -RMN que envolvem bicamadas lipídicas.

O mecanismo de interação dos reagentes de deslocamento $Fe(CN)_6^{-3}$ e $Fe(CN)_6^{-4}$ sobre as bicamadas compostas por ácido fosfatídicos e fosfatidilcolinas em diferentes razões molares requer futuras investigações, as quais envolvem estudos sistemáticos de RMN de 1H a diferentes concentrações de reagentes de deslocamento.

5.5. ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ANTIOXIDANTES NATURAIS CONTRA A LIPOPEROXIDAÇÃO INDUZIDA POR RADICAL HIDROXIL, RADICAL ASCORBIL E PEROXINITRITO EM MEMBRANAS

As atividades inibitórias de quercetina, melatonina e vitamina B₆ contra a lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) e por peroxinitrito (ONOO^\bullet) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC), asolecitina (ASO) e em microssomas de fígado de rato (MC) estão apresentadas sob forma de curvas dose-resposta e tabela referente à concentração de antioxidantes que inibe em 50% (IC_{50}) o processo peroxidativo.

O potencial antioxidante da quercetina (figura 46 e tabela 12) apresentou-se decrescente contra a lipoperoxidação induzida por espécies reativas na seguinte ordem: ascorbil > hidroxil > peroxinitrito, em lipossomas compostos de fosfatidilcolina e de asolecitina. Em microssomas de fígado de rato, uma ordem decrescente foi observada para lipoperoxidação induzida por hidroxil > ascorbil > peroxinitrito. Em todas as membranas estudadas, o menor potencial antioxidante do flavonóide foi obtido contra a lipoperoxidação induzida por peroxinitrito.

Estudos realizados com flavonóides demonstraram um mecanismo antioxidante adicional ao seqüestro de espécies reativas durante a lipoperoxidação¹⁹⁷. Este mecanismo refere-se à modificação causada por estas espécies antioxidantes no ordenamento lipídico e fluidez da membrana. ARORA e colaboradores¹⁹⁷ sugeriram que os flavonóides localizam-se preferencialmente no centro hidrofóbico de membranas compostas por fosfolipídios de cadeias apolares insaturadas, o que propicia um aumento na ordem estrutural lipídica e rigidez. Como citado anteriormente, este efeito pode prevenir a lipoperoxidação ao dificultar a difusão de espécies oxidantes nas membranas, diminuindo a velocidade das reações que estão associadas às mesmas na bicamada. Apesar do desfavorecimento energético existente na localização das

cabeças polares em um ambiente hidrofóbico, deve-se considerar que a conformação final dos flavonóides na bicamada pode ser influenciada por diversos fatores, como a força das interações hidrofóbicas entre estes compostos e os fosfolipídios, bem como suas habilidades de formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares ¹⁹⁷.

A interação de quercetina com a bicamada lipídica pode ser mediada pela distribuição de cabeças polares carregadas e não-carregadas na face hidrofílica da membrana, bem como a extensão de suas cadeias apolares e o grau de insaturação em seu centro hidrofóbico ²⁶⁵. Os resultados obtidos com o uso da quercetina como antioxidante demonstraram valores similares de IC₅₀ em lipossomas de asolecitina e fosfatidilcolina, cuja composição é diferenciada no que diz respeito ao grau de insaturação. Isto sugere que o efeito protetor do flavonóide contra a lipoperoxidação é resultado de um balanceamento entre seu potencial sequestrador de espécies reativas e sua capacidade de modificar o grau de fluidez da membrana.

A ação de melatonina promoveu os maiores índices de inibição contra os processos lipoperoxidativos induzidos por radical hidroxil em todas as membranas investigadas neste trabalho. Em lipossomas de fosfatidilcolina, a melatonina foi mais eficiente contra a ação das espécies reativas na ordem radical hidroxil > radical ascorbil > peroxinitrito. Em lipossomas de asolecitina e em microsomas de fígado de rato, tal ordem apresentou-se como radical hidroxil > peroxinitrito > radical ascorbil (figura 48).

As concentrações de melatonina necessárias para inibir em 50% os danos lipoperoxidativos nas membranas testadas (IC₅₀) apresentaram as maiores diferenças, em função do tipo de espécie reativa e da composição das membranas (tabela 12).

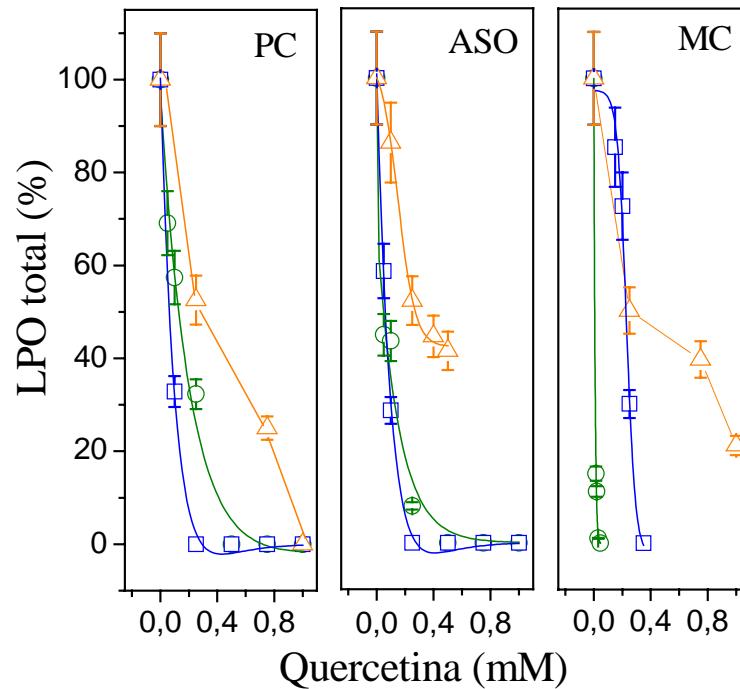


Figura 46 -Atividade inibitória da quercetina contra a lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil, $\bullet\text{OH}$ (círculos verdes), radical ascorbil, $\bullet\text{Asc}$ (quadrados azuis) e peroxinitrito, ONOO^- (triângulos laranjas) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e em microsomas de fígado de rato (MC).

Estudos anteriores com membranas de dimiristoilfosfatidilcolina sugerem que a melatonina localiza-se preferencialmente na região próxima a interface membrana-meio aquoso. Entretanto, o antioxidante possui a habilidade de expandir-se para quase todas as regiões da membrana²⁰. A melatonina parece apresentar uma função estabilizante da membrana, regulando o seu grau de fluidez de forma a prevenir o enrijecimento da bicamada ocasionado por lipoperoxidação induzida por espécies reativas^{9,15}.

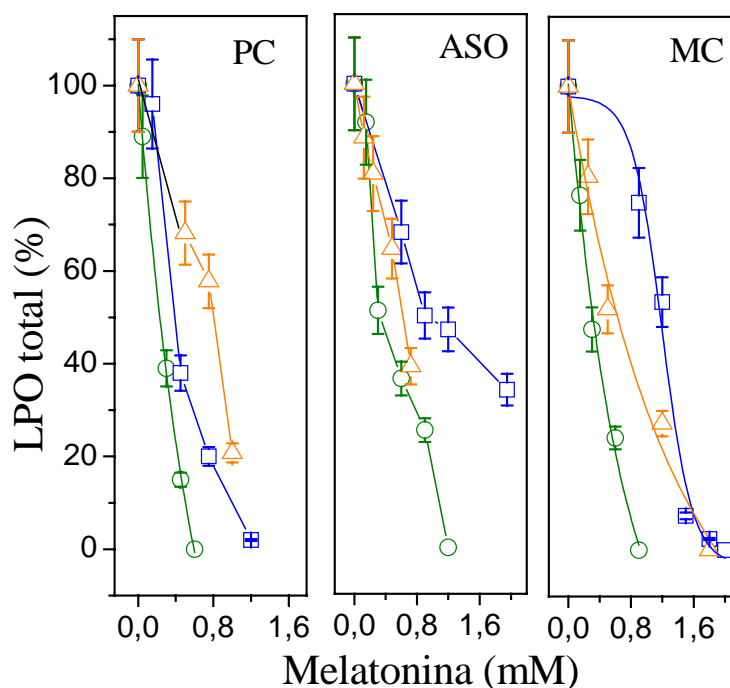


Figura 47 - Atividade inibitória da melatonina contra a lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil, $\bullet\text{OH}$ (círculos verdes), radical ascorbil, $\bullet\text{Asc}$ (quadrados azuis) e peroxinitrito, ONOO^- (triângulos laranjas) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e em microsomas de fígado de rato (MC).

O grau de proteção antioxidante propiciado pela melatonina em membranas é influenciado pelas mudanças estruturais que o neurohormônio pode sofrer por ação da bicamada lipídica, pelo seu perfil de distribuição através da membrana, bem como por seu coeficiente de partição hidrofílico/ hidrofóbico²⁰.

As percentagens de lipoperoxidação (LPO) induzida por ação de radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), radical ascorbil ($\bullet\text{Asc}$) e peroxinitrito (ONOO^-), em lipossomas de fosfatidilcolina (PC),

asolecitina (ASO) e microssomas de fígado de rato (MC) tratados com vitamina B₆ estão apresentadas na figura 48, e os valores de IC₅₀ da vitamina, descritos na tabela 12.

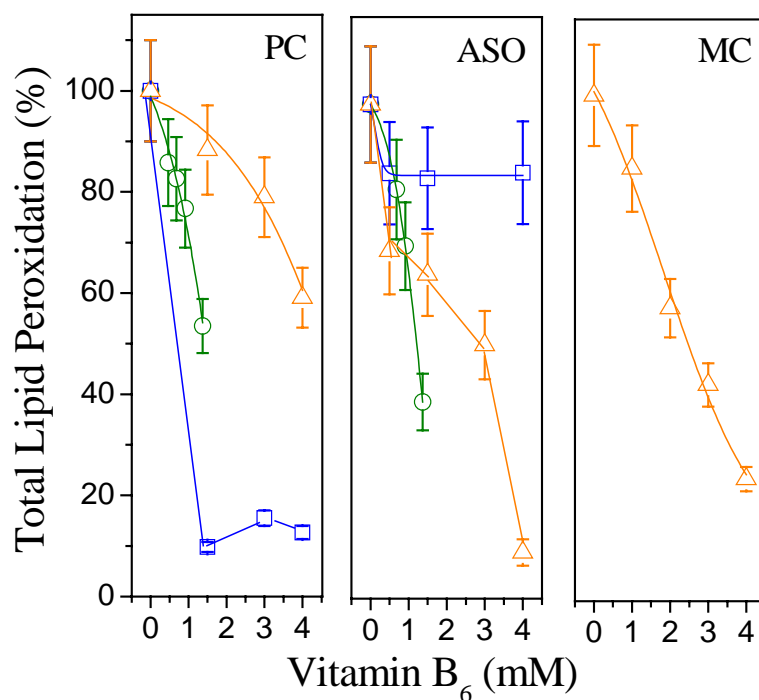


Figura 48 - Atividade inibitória da vitamina B₆ contra a lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil, •OH (círculos verdes), radical ascorbil, •Asc (quadrados azuis) e peroxinitrito, ONOO⁻ (triângulos laranjas) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC) e asolecitina (ASO) e em microssomas de fígado de rato (MC). 1 mM de vitamina B₆ = 0,17 mg/mL; 2 mM de vitamina B₆ = 0,34 mg/mL; 3 mM de vitamina B₆ = 0,51 mg/mL; 4 mM de vitamina B₆ = 0,68 mg/mL.

A vitamina B₆ apresentou um potencial antioxidante considerável contra a lipoperoxidação induzida por radical ascorbil em lipossomas de fosfatidilcolina. Porém, em

lipossomas de asolecitina, a IC_{50} do antioxidante não foi alcançada em ensaios de inibição da lipoperoxidação induzida por radical ascorbil nas concentrações testadas.

Um efeito pró-oxidante (dados não apresentados) foi observado em ensaios de inibição por vitamina B₆ da lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, ascorbil e microsomas de fígado de rato. O efeito pró-oxidante da vitamina em microsomas de fígado de rato tratados com estas espécies reativas parece ter sido causado por ação da piridoxina. Os metabólitos da piridoxina são formados pelo sistema microsomal citocromo P₄₅₀, e podem propiciar a lipoperoxidação ao reduzir, complexar e/ou liberar íons de ferro^{266,267}. Ao complexar-se com íons de ferro, a piridoxina os torna mais catalíticos ou ativos em reações redox, propiciando um efeito lipoperoxidativo na membrana²⁶⁸. Nos experimentos efetuados neste trabalho, estes íons podem ter sido originados do sistema de geração de radical hidroxil e radical ascorbil (ver seção de Materiais e Métodos), ou liberados a partir da ferritina presente em microsomas de fígado de rato preparados por centrifugação diferencial²⁶⁹.

A vitamina B₆ demonstrou uma atividade antioxidante eficaz contra os danos oxidativos induzidos por peroxinitrito em lipossomas de asolecitina e em microsomas de fígado de rato na faixa de concentração de 0,17 a 0,68 mg/mL. Entretanto, isto não foi observado em ensaios análogos contra a lipoperoxidação induzida por peroxinitrito em lipossomas de fosfatidilcolina. Comparando-se os resultados aqui obtidos com os dados documentados na literatura, observou-se que, em condições similares, a vitamina B₆ apresenta efeito antioxidante menos potente em relação ao da vitamina E²⁷⁰. Entretanto, as dosagens de vitamina B₆ são inferiores a dose diária recomendada de piridoxina em humanos adultos (2 mg)²⁷¹, o que indica a viabilidade funcional da vitamina contra a espécie reativa de nitrogênio em questão.

De acordo com pesquisas efetuadas na literatura científica, o efeito protetor da vitamina B₆ contra a lipoperoxidação induzida por espécies reativas de nitrogênio parece não ter sido caracterizado, indicando este trabalho como pioneiro nesta observação.

A tabela 12 descreve os valores de IC₅₀ referentes a quercetina, melatonina e vitamina B₆ contra a lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil (\bullet OH), radical ascorbil (\bullet Asc) e peroxinitrito (ONOO⁻) nos modelos de membrana testados.

IC₅₀ (mM) DE ANTIOXIDANTES CONTRA A LPO INDUZIDA POR ESPÉCIES REATIVAS				
Membrana	Espécie Reativa	Quercetina	Melatonina	Vitamina B₆
PC	\bullet OH	0,15 ± 0,02	0,25 ± 0,02	1,40 ± 0,01
	\bullet Asc	0,08 ± 0,01	0,45 ± 0,04	1,00 ± 0,01
	ONOO ⁻	0,30 ± 0,03	0,90 ± 0,09	-
ASO	\bullet OH	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,03	1,50 ± 0,02
	\bullet Asc	0,08 ± 0,01	1,08 ± 0,11	-
	ONOO ⁻	0,30 ± 0,03	0,68 ± 0,07	3,40 ± 0,03
MC	\bullet OH	0,61 ± 0,06 (x10 ⁻²)	0,40 ± 0,04	PO
	\bullet Asc	0,24 ± 0,02	1,30 ± 0,13	PO
	ONOO ⁻	0,27 ± 0,03	0,72 ± 0,07	2,80 ± 0,03

Tabela 12- Valores de IC₅₀ de quercetina, melatonina e vitamina B₆ contra lipoperoxidação (LPO) induzida por radical hidroxil (\bullet OH), radical ascorbil (\bullet Asc) e peroxinitrito (ONOO⁻) em lipossomas de fosfatidilcolina (PC), asolecitina (ASO) e em microssomas de fígado de rato (MC). Estes valores foram obtidos a partir dos resultados descritos nas figuras 47, 48 e 49. PO= efeito pró-oxidante.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho propicia uma visão ampla sobre a dinâmica que envolve a composição das membranas e as características intrínsecas das espécies reativas e dos antioxidantes presentes no meio, e determina diferentes níveis de lipoperoxidação nas bicamadas lipídicas. Este entendimento pode contribuir para a resolução de questionamentos que abordam os diversos graus de susceptibilidade tecidual a espécies reativas, influenciando desta forma o desenvolvimento ou agravamento de eventos patológicos no organismo. O trabalho também pode contribuir para uma nova consciência no que diz respeito a processos preventivos contra as doenças associadas a lipoperoxidação induzida por espécies reativas.

Os resultados apresentados neste trabalho envolvem interações lipídio-lipídio (como em lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina), bem como espécies reativas-membranas-antioxidantes:

- ❖ Os níveis de lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e por peroxinitrito em lipossomas e microsomas de fígado de rato diferiram em função do tipo de espécies reativas testadas e da composição das membranas. Esta variação indica influências de interações eletrostáticas, propiciadas pela presença de cargas nos fosfolípidos de membranas, favorecendo ou inibindo o processo lipoperoxidativo no sistema. O conteúdo de hidrogênios metilênicos bis-alílicos parece estar relacionado com a similaridade dos índices de lipoperoxidação, induzidos por radical hidroxil e ascorbil, em lipossomas de fosfatidilcolina e em microsomas de fígado de rato.
- ❖ A presença de concentrações crescentes de ácido fosfatídico, utilizado como agente indutor de cargas negativas, em lipossomas de fosfatidilcolina, propiciou uma redução não linear do percentual de lipoperoxidação induzida pelas três espécies reativas. Isto

indica que outras interações, diferentes das eletrostáticas e relacionadas a composição do sistema estudado, podem influenciar as interações entre as espécies oxidantes e os fosfolipídios de membrana.

- ❖ Experimentos com calorimetria de varredura diferencial em lipossomas compostos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, mostraram reduções graduais nos valores de ΔH à medida que a concentração de ácido fosfatídico aumentava no sistema. Isto sugere que a presença de ácido fosfatídico em lipossomas de fosfatidilcolina induz a um rearranjo lipídico para uma conformação mais ordenada e estável das cadeias alquílicas nas bicamadas.
- ❖ A interação entre lipossomas constituídos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina e ferricianeto sugeriu uma distribuição lipídica na membrana que, de algum modo, não permite a formação de uma ligação química entre o grupo amônio quaternário da colina e o reagente de deslocamento. Estudos paralelos com ferrocianeto revelaram uma interação entre esta espécie diamagnética e os lipossomas compostos ácido fosfatídico e fosfatidilcolina. Os experimentos com ferrocianeto indicaram uma distribuição de ácido fosfatídico preferencialmente na monocamada interna da membrana. Os resultados estão de acordo com os obtidos em estudos anteriores com ferricianeto em lipossomas de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, em razões molares superiores as estudadas neste trabalho. Isto indica a viabilidade do uso de sais de ferrocianeto como reagentes de deslocamento em experimentos de RMN de ^1H com membranas biológicas.
- ❖ O potencial antioxidante da quercetina contra a lipoperoxidação induzida por radical hidroxil, radical ascorbil e peroxinitrito diferiu em função do tipo de membrana (lipossomas ou microsomas) e de espécies reativas presentes no sistema.

- ❖ As concentrações de melatonina necessárias para inibir em 50% os danos lipoperoxidativos, nas membranas testadas, apresentaram as maiores diferenças em função do tipo de espécie reativa e da composição das membranas.
- ❖ A vitamina B₆ apresentou comportamento antioxidante contra a lipoperoxidação induzida pelas espécies reativas em lipossomas, e um efeito pró-oxidante em microsomas de fígado de rato tratados com radical hidroxil e radical ascorbil.
- ❖ Os resultados obtidos envolvendo o potencial antioxidante de vitamina B₆ contra a lipoperoxidação induzida por peroxinitrito permitem uma caracterização pioneira do efeito protetor desta vitamina contra o dano oxidativo ocasionado por espécies reativas de nitrogênio.

Os resultados apresentados neste trabalho podem ser relevantes para um maior esclarecimento sobre as interações que influenciam a liberação prolongada de fármacos em lipossomas. Deste modo, tal compreensão pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia de doenças e processos patológicos associados a lipoperoxidação por espécies reativas^{272,273}.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho proporcionaram novos questionamentos, que direcionaram as perspectivas para pesquisas envolvendo: i) caracterizações físico-químicas de membranas após sua interação com melatonina; ii) estudos do potencial antioxidante de vitamina B₆ com outras espécies reativas de nitrogênio; iii) investigações mais aprofundadas sobre as transições envolvidas em lipossomas compostos por misturas binárias de ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, e iv) a interação dos mesmos com os reagentes de deslocamento ânion

ferricianeto e ferrocianeto. Desta forma, podem ser citadas como perspectivas para um trabalho próximo:

- ❖ Investigações envolvendo modificações na ordem e dinâmica de fosfatidilcolina em bicamadas na presença de melatonina na forma adicionada e incorporada, através de medidas de RMN de ^1H , ^{31}P , ^{13}C e ^{15}N ;
- ❖ Acompanhamento de alterações topológicas em modelos de membranas, provocadas por sua interação com o antioxidante, através de análises envolvendo microscopia de força atômica (AFM);
- ❖ Avaliação do efeito da melatonina no estado da fase lipídica nas propriedades elétricas de superfície da bicamada, através de estudos espectroscópicos com sondas ópticas e fluorescentes, como a merocianina-540;
- ❖ Investigações sobre o potencial antioxidante da melatonina contra lipoperoxidação induzida por espécies reativas, quando incorporada em lipossomas.
- ❖ Caracterização do potencial antioxidante de vitamina B₆ contra a lipoperoxidação de outras espécies reativas de nitrogênio, tal como o monóxido de nitrogênio, realizada de forma a contribuir na elucidação do mecanismo de ação antioxidante da vitamina.
- ❖ Aperfeiçoamento do estudo envolvendo os efeitos causados pela incorporação de ácido fosfatídico no comportamento termodinâmico de lipossomas de fosfatidilcolina, através da técnica de microcalorimetria.
- ❖ Estudos sistemáticos de RMN de ^1H envolvendo lipossomas constituídos por ácido fosfatídico e fosfatidilcolina, em diferentes razões molares, submetidos a diferentes concentrações de ânion ferricianeto e ânion ferrocianeto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YEAGLE, P. L. **The membranes of cells**. California: Academic Press, 1993.
2. KINNUNEN, P.K.J.; KÔIV, A.; LEHTONEN, J.Y.A.; RYTÖMAA, M.; MUSTONEN, P.
Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membranes surfaces. **Chem. Phys. Lipids**, v. 73, p. 181-207, 1994.
3. HORAN, K.L.; LUTZKE, B.S; CAZERS, A.R.; MCCALL, J.M.; EPPS, D.E. Kinetic evaluation of lipophilic inhibitors of lipid peroxidation in DLPC liposomes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 587-596, 1994.
4. AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin Exp Immunol.**, v.131, p. 398-404, 2003.
5. CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers, **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 135-141, 1997.
6. YIN, J.J.; SMITH, M.J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.M.; SPHON, J.A. Effects of Fumosisin B₁ on lipid peroxidation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1371, p. 134-142, 1998.
7. OHYASHIKI, T.; NUNOMURA, M. A marked stimulation of Fe³⁺-dependent lipid peroxidation in phospholipids liposomes under acidic conditions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1484, p. 241-250, 2000.
8. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.
9. REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progr. Neurobiol.**, v. 56, p. 359-384, 1998.

10. YEGIN, A.; AKBAS, S.H.; ÖZBEN, T.; KORGUN, D.K. Secretory phospholipase A₂ and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. **Acta Neurol Scand.**, v. 106, p. 258-262, 2002.
11. AVANTI POLAR LIPIDS, Inc. Disponível em : www.avantilipids.com
12. TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin protects against pro oxidant enzymes and reduces LPO in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 262-268, 2003.
13. PINCHUK, I.; LICHTENBERG, D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, p. 279-314, 2002.
14. POEGGELER, B.; PAPPOLLA, M.A.; HARDELAND, R.; RASSOULPOUR, A.; HODGKINS, P.S.; GUIDETTI, P.; SCHWARCZ, R. Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. **Brain Res.**, v. 815, p. 382-388, 1999.
15. GARCÍA, J.J.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; ESCAMES, G.; YU, B.P.; OH, C.S.; MUÑOS-HOYOS, A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. **FEBS Letters**, v. 408, p. 297-300, 1997.
16. RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 933-956, 1996.
17. GUTIÉRREZ, M.E.; GARCÍA, A.F.; AFRICA de MARIAGA, M.; SAGRISTA, M.L.; CASADÓ, F.J.; MORA, M. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. **Life Sci.**, v. 72, p. 2337-2360, 2003.

18. SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 481-486, 1995.
19. ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 102-109, 2000.
20. COSTA, E.J.; SHIDA, C.S.; BIAGGI, M.H.; ITO, A.S.; LAMY-FREUND, M.T. How melatonin interacts with lipid bilayers: a study by fluorescence and ESR spectroscopies. **FEBS Lett.**, v. 416, p. 103-106, 1997.
21. FENSKE, D.B.; JARRELL, H.C. Phosphorus-31 two-dimensional solid-state exchange NMR. Application to model membrane and biological systems. **Biophys. J.**, v. 59, p.55-69, 1991.
22. INOUE, T.; NIBU, Y. Phase behavior of hydrated lipid bilayer composed of binary mixture of phospholipids with different head groups. **Chem. Phys. Lipids**, v. 100, p. 139-150, 1999.
23. SEYDEL, J.K. Nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry as tools for studying drug membrane interactions. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 368-370, 1991.
24. BUDAI, M.; SZABÓ, Z.S.; SZÖGYI, M.; GRÓF, P. Molecular interactions between DPPC and morphine derivatives: a DSC and EPR study. **Int. J. Pharm.**, v. 250, p. 239-250, 2003.
25. FENSKE, D.B. Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance. **Chem. Phys. Lipids**, v. 64, p. 143-162, 1993.
26. GRIFFIN, R.G. Solid state nuclear magnetic resonance of lipid bilayers. **Methods Enzymol.**, v. 72, p. 108-174, 1981.

27. BERDEN, J.A.; BARKER, R.W.; RADDA, G.K. NMR studies on phospholipid bilayers some factors affecting lipid distribution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 375, p. 186-208, 1975.
28. MURPHREE, S.A.; MURPHY, D.; SARTORELLI, A.C.; TRITTON, T.R. A magnetic resonance study of the differential effects of cardiolipin on drug-induced fusion and permeability. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 691, p. 97-105, 1982.
29. BARCLAY, L.R.C.; VINQVIST, M.R. Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 779-788, 1994.
30. ZHOU, Y.C.; ZHENG, R.L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, p. 1177-1179, 1991.
31. MONTANARI, L.; FANTOZZI, P.; SNYDER, J.M.; KING, J.W. Selective extraction of phospholipids from soybeans with supercritical carbon dioxide and ethanol. **J. Supercrit. Fluids**, v. 14, p. 87-93, 1999.
32. COS, P.; CALOMME, M.; SINDABIWE, J.B.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Med.**, v. 67, p. 515-519, 2001.
33. KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, p. 21-48, 1993.
34. CURTIS, M.T.; GILFOR, D.; FARBER, J.L. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 235, p. 644-649, 1984.
35. BLOOM, M.; EVANS, E.; MOURITSEN, O.G. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. **Q. Ver. Biophys.**, v. 24, p.293-397, 1991.

36. BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p. 34-42, 2001.
37. MOURITSEN, O.G. Theoretical models of phospholipids phase transitions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, p. 179-194, 1991.
38. RAGGERS, R.J.; POMORSKI, T.; HOLTHUIS, J.C.; KALIN, N.; VAN MEER, G. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. **Traffic**, v. 1, p.226-234, 2000.
39. WELTI, R.; GLASER, M. Lipid domain in model and biological membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 73, p. 121-137, 1994.
40. KINNUNEN, P.K.J.; LAGGNER, P. Special Issue on Phospholipid Phase Transitions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, p. 109-408, 1991.
41. BARENHOLZ, Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to “rafts”. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, p. 1-5, 2002.
42. BEVERS, E.M.; COMFURIUS, P.; DEKKERS, D.W.C.; ZWAAL, R.F.A. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1439, p. 317-330, 1999.
43. FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptides vaccines. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 181-189, 1999.
44. GALILEO GALILEI- INSTITUTO TÉCNICO INDUSTRIALE STATALE-STRUTTURA DELLA MEMBRANA. Disponível em: [http:// digilander.libero.it/itisaltamura/arizona/lipidi. htm](http://digilander.libero.it/itisaltamura/arizona/lipidi.htm)
45. OHVO-REKILÄ, H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMÄKI, P.; SLOTTE, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, v.41, p. 66-97, 2002.

46. BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T.E. Sphingomyelin: biophysical aspects. **Chem. Phys. Lipids**, v. 102, p. 29-34, 1999.
47. ISRAELACHVILI, J.N.; MARCELJA, S.; HORN, R.G. Physical principles of membrane organization. **Q. Rev. Biophys.**, v. 13, p. 121-200, 1980.
48. ISRAELACHVILI, J.N. **Intermolecular and surface force**. London: Academic Press, 1992.
49. LEVINE, Y.K.; BIRDSALL, N.J.M.; LEE, A.G.; METCALFE, J.C. ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation measurements of synthetic lecithins and the effect of spin-labeled lipids. **Biochem.**, v. 11, p. 1416-1421, 1972.
50. BRETSCHER, M.S. Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cell and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. **J. Mol. Biol.**, v. 71, p. 523-528, 1972.
51. ROTHMAN, J.E.; LENARD, J. Membrane asymmetry. **Sci.**, v. 195, p. 743-753, 1977.
52. FIELDING, P.E.; FIELDING, C.J. Dynamics of lipoprotein transport in the human circulatory system. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. Amsterdam, 1996. p. 495-541.
53. EXTON, J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1212, p. 26-42, 1994.
54. BRINDLEY, D.N.; ABOUSALHAM, A.; KIKUCHI, Y.; WANG, C.N.; WAGGONER, D.W. "Cross talk" between the bioactive glycerolipids and sphingolipids in signal transduction. **Biochem. Cell Biol.**, v. 74, p. 469-476, 1996.
55. LAMBETH, J.D.; RYU, S.H. Glycerolipids in signal transduction. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. Amsterdam, 1996. p. 237-255.

56. SNYDER, F. Ether-linked lipids and their bioactive species: Occurrence, chemistry, metabolism, regulation, and function. In: VANCE, D.E.; VANCE, J.E. **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. Amsterdam, 1996. p.183-210.
57. EPAND, R.M. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1376, p. 353-368, 1998.
58. BEVERS, E.M.; COMFURIUS, P.; ZWAAL, R.F.A. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 736, p. 57-66, 1983.
59. TANAKA, Y.; SCHROIT, A.J. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 11335-11343, 1983.
60. DEVAUX, P.F. Static and dynamic lipid asymetry in cell membranes. **Biochem.**, v. 30, p. 1163-1173, 1991.
61. COCKCROFT, S.; De MATTEIS, M.A. Inositol lipids as spatial regulators of membrane traffic. **J. Membrane Biol.**, v. 180, p. 187-194, 2001.
62. OHKI, K.; SEKIYA, T.; YAMAUCHI, T.; NOZAWA, Y. Effect of phosphatidylinositol replacement by diacylglycerol on various physical properties of artificial membranes with respect to the role of phosphatidylinositol response. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 693, p. 341-350, 1982.
63. GAL, S.; PINCHUK, I.; LICHTENBERG, D. Peroxidation of liposomal palmitoyllinoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effects of surface charge on the oxidizability and on the potency of antioxidants. **Chem. Phys. Lipids**, v. 126, p. 95-110, 2003.

64. INOUE, T.; NIBU, Y. Miscibility of binary phospholipid mixtures under hydrated and non-hydrated conditions. III. Reinvestigation of phosphatidic acids with different acyl chain length. **Chem. Phys. Lipids**, v. 76, p. 171-179, 1995.
65. KOTER, M.; de KRUIJFF, B.; VAN DEENEN, L.L.M. Calcium-induced aggregation and fusion of mixed phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles as studied by ^{31}P -NMR. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 514, p. 255-263, 1978.
66. TOKUMURA, A. A family of phospholipids autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. **Prog. Lipid Res.**, v. 34, p. 151-184, 1995.
67. MORRÉ, D.J.; KARTENBECK, J.; FRANKE, W.W. Membrane flow and interconversions among endomembranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 559, p. 71-152, 1979.
68. TYSON, C.A.; ZANDE, H.V.; GREEN, D.E. Phospholipids as ionophores. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 1326-1332, 1976.
69. CARRIÓN, F.J.; DE LA MAZA, A.; PARRAT, J.L. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. **J. Colloid Interface Sci.**, v.164, p. 78-87, 1994.
70. CEVC, G. Membrane electrostatics. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1031, p. 311-382, 1990.
71. BROCKMAN, H. Dipole potential of lipid membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 73, p. 57-79, 1994.
72. BAZZI, M.D.; NELSESTUEN, G.L. Role of substrate in determining the phospholipid specificity of protein kinase C activation. **Biochem.**, v. 26, p. 5002-5008, 1987.
73. YEAGLE, P.L.; HUTTON, W.C.; HUANG, C.; MARTIN, R.B. Phospholipid head-group conformations; intermolecular interactions and cholesterol effects. **Biochem.**, v. 16, p. 4344-4349, 1977.

74. STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, p. 89-137, 1984.
75. GUNSTONE, F.D. **An introduction to the chemistry and biochemistry of fatty acids and their glycerides**. London: Chapman and Hall, 1967.
76. HAUSER, H.; PASCHER, I.; PEARSON, R.H.; SUNDELL, S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 650, p. 21-51, 1981.
77. SATURATED vs UNSATURATED FATS. Disponível em: www.bastnet.com/fatfacts/ff3.html
78. GHOSH, D.; WILLIAMS, M.A.; TINOCO, J. The influence of lecithin structure on their monolayer behavior and interactions with cholesterol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 291, p. 351-362, 1973.
79. GAWRISCH, K.; HOLTE, L.L. NMR investigations of non-lamellar phase promoters in the lamellar phase state. **Chem. Phys. Lipids**, v. 81, p. 105-116, 1996.
80. HERBETTE, L.G.; FAVREAU, C.; SEGALMAN, K.; NAPOLITANO, C.A.; WATRAS, J. Mechanisms of fatty acid effects on sarcoplasmic reticulum II. Structural changes induced by oleic and palmitic acids. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 1325-1335, 1984.
81. TEAGUE, W.E.; FULLER, N.L.; RAND, R.P.; GAWRISCH, K. Polyunsaturated lipids in membrane fusion events. **Cell Mol. Biol. Lett.**, v. 7, p. 262-264, 2002.
82. WETZKER, R.; KLINGER, R.; FRUNDER, H. Effects of fatty acids on activity and calmodulin binding of Ca^{+2} -ATPase of human erythrocyte membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.730, p. 196-200, 1983.

83. MUANGMAN, P.; SPENNY, M.L.; TAMURA, R.N.; GIBRAN, N.S. Fatty acids and glucose increase neutral endopeptidase activity in human microvascular endothelial cells. **Shock**, v. 19, p. 508-512, 2003.
84. HOOVER, R.A.; LYNCH, R.D.; KARNOVSKY, M.J. Decrease in adhesion of cells cultured in polyunsaturated fatty acids. **Cell**, v. 12, p. 295-300, 1977.
85. VERLENGIA, R.; GORJÃO, R.; KANUNFRE, C.C.; BORDIN, S.; MARTINS DE LIMA, T.; CURI, R. Effects of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells- A comparison with oleic acid. **Life Sci.**, v. 73, p. 2939-2951, 2003.
86. PHILIPSON, K.D.; WARD, P.R. Effects of fatty acids on Na^+ - Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} permeability of cardiac sarcolemmal vesicles. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 9666-9671, 1985.
87. EPAND, R.F.; MARTINOU, J.C.; MONTESSUIT, S.; EPAND, R.M. Fatty acids enhance membrane permeabilization by pro-apoptotic Bax. **Biochem. J.**, v. 377, p. 509-516, 2004.
88. KATES, M.; PUGH, E.L.; FERRANTE, G. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. **Biomembranes**, v. 12, p. 379-395, 1984.
89. COSSINS, A.R. **Temperature adaptation of biological membranes**. London: Portland Press, 1994.
90. MOURITSEN, O.G.; JØRGENSEN, K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. **Chem. Phys.Lipids**, v. 73, p. 3-25, 1994.
91. VAN MEER, G.; VAN GENDEREN, I.L. Physicochemical questions in lipid sorting. In: HILDESON, H.J.; RALSTON, G.B. **Physicochemical methods in the study of biomembranes**. New York, 1994.

92. GNIADOCKA, M.; NIELSEN, O.F.; CHRISTENSEN, D.H.; WULF, H.C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair and nail. **J. Invest. Dermatol.**, v. 110, p. 393-398, 1998.
93. SUSI, H.; BYLER, D.M.; DAMERT, W.C. Raman intensities of carbon-carbon stretching modes in a model membrane. **Chem Phys. Lipids**, v. 27, p. 337-344, 1980.
94. JOHN, K.; SCHREIBER, S.; KUBELT, J.; HERRMANN, A.; MÜLLER, P. Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes. **Biophys. J.**, v. 83, p. 3315-3323, 2002.
95. ZACHOWSKI, A. Phospholipids in animal eukariotic membranes: transverse asymmetry and movement. **Biochem. J.**, v. 294, p. 1-14, 1993.
96. CULLIS, P.R.; HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MADDEN, T.D.; MAYER, L.D.; FENSKE, D.B. Influence of pH gradients on the transbilayer transport of drugs, lipids, peptides and metal ions into large unilamellar vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1331, p. 187-211, 1997.
97. POMORSKI, T.; HRAFNSDÓTTIR, S.; DEVAUX, P.F.; van MEER, G. Lipid distribution and transport across cellular membranes. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 139-148, 2001.
98. MITAKU, S.; JIPPO, T.; KATAOKA, R. Thermodynamic properties of the lipid bilayer transition. Pseudocritical phenomena. **Biophys. J.**, v. 42, p. 137-144, 1983.
99. IPSEN, J.H.; JØRGENSEN, K.; MOURITSEN, O.G. Density fluctuations in saturated phospholipid bilayers increase as the acyl-chain length decreases. **Biophys. J.**, v. 58, p. 1099-1107, 1990.
100. McELHANEY, R.N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 30, p. 229-259, 1982.

101. BÓTA, A.; KRIECHBAUM, M. Prehistory in the pretransition range of dipalmitoylphosphatidylcholine/water system. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 141, p. 441-448, 1998.
102. LE BIHAN, T.; PÉZOLET, M. Study of the structure and phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine by infrared spectroscopy: characterization of the pretransition and subtransition. **Chem. Phys. Lipid**, v. 94, p. 13-33, 1998.
103. YANG, C.P.; NAGLE, J.F. Synchrotron x-ray study of the modulated lamellar phase P beta' in the lecithin-water system. **Phys. Rev. A**, v. 37, p. 3993-4000, 1988.
104. WACK, D.C.; WEBB, W.W. Phase transformations in lipids follow classical kinetics with small fractional dimensionalities. **Phys. Rev. A**, v. 40, p. 2712-2731, 1989.
105. CEVC, G. Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1062, p. 59-69, 1991.
106. CZAJKOWSKY, D.M.; HUANG, C.; SHAO, Z. Ripple phase in asymmetric unilamellar bilayers with saturated and un-saturated phospholipids. **Biochem.**, v. 34, p. 12501-12505, 1995.
107. OKHAMAFE, A.O.; YORK, P. Studies of interactions phenomena in aqueous-based film coatings containing soluble additives using thermal analysis techniques. **J. Pharm. Sci.**, v. 77, p. 438-443, 1988.
108. CAMERON, D.G.; CASAL, H.L.; MANTSCH, H.H. Characterization of the pretransition in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by Fourier transform infrared spectroscopy. **Biochem.**, v. 19, p. 3665-3672, 1980.

109. GABER, B.P.; YAGER, P.; PETICOLAS, W.L. Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. Nature of the endothermic transitions in phosphatidylcholines. **Biophys. J.**, v. 21, p. 161–176, 1978.
110. VIANI, P.; CERVATO, G.; FIORILLI, A.; RIGAMONTI, E.; CESTARO, B. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 253-258, 1991.
111. GHOSH, C.; DICK, R.M.; ALI, S.F. Iron / ascorbate-induced lipid peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor binding in rat frontal cortex. **Neurochem. Int.**, v. 23, p. 479-484, 1993.
112. ULRICH, A.S.; SAMI, M.; WATTS, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1191, p. 225-230, 1994.
113. LYNCH, D.V.; STEPONKUS, P.L. Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 984, p. 267-272, 1989.
114. CHRISTIE, W.W.; HOLMAN, R.T. Synthesis and characterization of the complete series of methylene-interrupted cis, cis- octadecadienoic acids. **Chem. Phys. Lipids**, v. 1, p. 407-423, 1967.
115. VERMA, S.P.; WALLACH, D.F.H.; SAKURA, J.D. Differential thermal analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-fatty acids mixtures. **Biochem.**, v. 20, p. 6818-6824, 1981.
116. SÖDERLUND, T. **Membrane interactions of small solutes**. Studies with drugs and osmolytes. 2003. 105 p. Dissertação (doutorado em biomedicina)- University of Helsinki, Finland.

117. SAMUNI, A.M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ, Y. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol- mediated dehydration. **Chem. Phys. Lipids**, v. 105, p. 121-134, 2000.
118. BARCLAY, L.R.C.; ANTUNES, F.; EGAWA, Y.; McALLISTER, K.L.; MUKAI, K.; ISHI, T.; VINQVIST, M.R. The efficiency of antioxidants delivered by liposomal transfer. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1328, p. 1-2, 1997.
119. HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, P.R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Phys. Lipids**, v. 40, p. 89-107, 1986.
120. WILSCHUT, J.; HOEKSTRA, D. Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. **Chem. Phys. Lipids**, v. 40, p. 145-166, 1986.
121. SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium. **J. Biochem.**, v. 81, p. 519-528, 1977.
122. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; POSSMAYER, F.E.; SCOFANO, H.M.; GRÄBER, P. Characterization of nucleotide binding sites of the isolated H⁺-ATPase from spinach chloroplasts CF₀F₁. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 376, p. 141-148, 2000.
123. DADAIRS-LIPOSOMES. Disponível em: www.dadairs.com/liposomes.htm
124. HAUSER, H. Some aspects of the phase behavior of charged lipids. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 772, p. 37-50, 1984.
125. CEVC, G. How membrane chain melting properties are regulated by the polar surface of the lipid bilayer. **Biochem.**, v. 26, p. 6305- 6310, 1987.

126. LEIKIN, A.I.; BRENNER, R.R. In vivo cholesterol removal from liver microsomes induces changes in fatty acid desaturase activities. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 963, p. 311-319, 1988.
127. GOURLEY, G.R.; MOGILEVSKY, W.; ODELL, G.B. Hepatic microsomal composition studies in the Gunn rats. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 750, p. 419-423, 1983.
128. RONSEN, G. Membrane composition, structure and function. In: ALOIA, R.C. **Membrane fluidity in biology**. New York, 1983. p. 235-285.
129. SHIRES, T.K.; EKREN, T.; HINDERAKER, P.; PITOT, H.C. Effect of ribosome removal on rough microsomal composition and polysome attachment in vitro: comparison of liver and kidney. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 374, p. 59-75, 1974.
130. BETZ, G.; MICHELS, D. Steroid 17, 20-lyase: the effect of detergents on enzymic activity and microsomal composition. **Steroids**, v. 21, p. 785-800, 1973.
131. SOCACIU, C.; JESSEL, R.; DIEHL, H.A. Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. **Spectrochim. Acta A**, v. 56, p. 2799-2809, 2000.
132. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, p. 1-14, 1984.
133. FLESCHEIN, S.; FLESCHEIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E. MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roum. Biotechnol. Lett.**, v. 5, p. 479-495, 2000.
134. KLEINVELD, H. A.; SWAAKA, J.G.; HACK, C.E. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. **Scand. J. of Rheumatol.**, v. 18, p. 341-52, 1989.

135. KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.
136. PATEL, R.P.; McANDREW, J.; SELLAKE, H.; WHITE, R.C.; JO, H.; FREEMAN, B.A.; DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 385-400, 1999.
137. MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.
138. CROW, J.P.; BECKMAN, J.S. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity: evidence for peroxynitrite-mediated injury. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 387, p. 147-161, 1996.
139. SUH, Y. A.; ARNOLD, R. S.; LASSEGUE, B.; SHI, J.; XU, X.; SORESCU, D.; CHUNG, A. B.; GRIENGLING, K. K.; LAMBETH, J. D. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox 1. **Nature**, v. 401, p.79–82, 1999.
140. BRAR, S. S.; KENNEDY, T. P.; WHORTON, A. R.; MURPHY, T. M.; CHITANO, P.; HOIDA, J. R. Requirement for reactive oxygen species in serum-induced and platelet-derived growth factor-induced growth of airway smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 20017–20026, 1999.
141. SUZUKI, Y.J.; FORMAN, H.J.; SEVANIAN, A. Oxidants as stimulator of signal transduction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p. 269-285, 1997.
142. FAVIER, A. Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker, **Ann. Biol. Clin.**, v. 55, p. 9-16, 1997.
143. LANE, N. **Oxygen: the molecule that made the world**. UK: Oxford University Press, 2003.

144. IM, H.; RASOULI, F.; HAJALIGOL, M. Formation of nitric oxide during tobacco oxidation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 7366-7372, 2003.
145. MADDEN, E.F. The role of combined metal interactions in metal interactions in metal carcinogenesis: a review. **Rev. Environ. Health**, v. 18, p. 91-109, 2003.
146. CHARI, S.; GUPTA, M. Status of blood antioxidant enzymes in alcoholic cirrhosis. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 47, p. 343-346, 2003.
147. STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Sci.**, v. 257, p. 1120-1124, 1992.
148. SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.
149. SALGO, M.G.; SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A. Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 215, p. 1111-1118, 1995.
150. SALGO, M.G.; BERMUDEZ, E.; SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A. Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 322, p. 500-505, 1995.
151. BONFOCO, E.; KRAINE, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis e necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/ superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.
152. NAIDU, B.V.; FRAGA, C.; SALZMAN, A.L.; SZABO, C.; VERRIER, E.D.; MULLIGAN, M.S. Critical role of reactive nitrogen species in lung ischemia-reperfusion injury. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 22, p. 784-793, 2003.
153. EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, p. 393-397, 1998.

154. KOPPENOL, W.H.; MORENO, J.J.; PRYOR, W.A.; ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by a nitric oxide and superoxide. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 834-842, 1992.
155. DUCROCQ, C.; DENDANE, M.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L.; DAS, B. C.; BOUCHEMAL-CHIBANI, N.; DOAN, B.; KARIM, A.; CARAYON, A.; PAYEN, D. Chemical modifications of the vasoconstrictor peptide angiotensin II by nitrogen oxides (NO, HNO₂, HOONO)- evaluation by mass spectrometry. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 146-153, 1998.
156. HERCE-PAGLIAI, C.; KOTECHA, S.; SHUKER, D.E.G. Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 324-336, 1998.
157. CROW, J.P.; ISCHIROPOULOS, H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: *in vivo* marker of peroxynitrite. **Meth. Enzymol.**, v. 269, p. 185-194, 1996.
158. PROCTOR, P.H. Free radicals and human disease. In: MIGUEL, J.; QUINTANILHA, A.T.; WEBER, H. **CRC handbook of free radicals and antioxidants**. Boca Raton, 1989. p. 209-221.
159. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. **FEBS Lett.**, v. 307, 108-112, 1992.
160. LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle- 70 years later: an alternative view. **Redox Rep.**, v. 7, p. 55-56, 2002.
161. KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle- 71 years later, **Redox Rep.**, v. 7, p. 59-60, 2002.
162. HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. London Ser. A.**, v. 147, p. 332-351, 1934.

163. CHEN, S.; SHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 260, p. 726-735, 1999.
164. HUBEL, C.A.; KAGAN, V.E.; KOSIN, E.R.; McLAUGHLIN, M.; ROBERTS, J.M. Increased ascorbate radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. **Photochem. Photobiol.**, v. 59, p. 1-4, 1997.
165. BORS, W.; BUETTNER, R. The vitamin C radical and its reactions. In: PACKER, L.; FUCHS, J. **Vitamin C in health and disease**. New York, 1997. p. 75-94.
166. CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, p. 137-149, 1996.
167. STANBRO, W.D. Modeling the interaction of peroxynitrite with low-density lipoproteins I: plasma levels of peroxynitrite. **J. Theor. Biol.**, v. 205, p. 457-464, 2000.
168. SARAN, M.; MICHEL, C.; BORS, W. Reaction of NO with $O_2^{\bullet-}$, implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **Free Rad. Res. Commun.**, v. 10, p. 221-226, 1990.
169. KOPPENOL, W.H.; KISSNER, R.; BECKMAN, J.S. Synthesis of peroxynitrite: To go with flow or on solid grounds?, **Methods Enzymol.**, v. 269, p. 296-302, 1996.
170. GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Formation of peroxynitrate for the reaction of peroxynitrite with CO_2 : evidence for carbonate radical production. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 3458-3463, 1998.
171. CODDINGTON, J.W.; HURST, J.K.; LYMAR, S.V. Hydroxyl radical formation during peroxynitrous acid decomposition. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 2438-2443, 1999.

172. KEITH, W.G.; POWELL, R.E. Kinetics of decomposition of peroxyxynitrous acid. **J. Chem. Soc. A**, v. 1969, p. 90-90, 1969.
173. RADI, R.; COSGROVE, T.P.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. **Biochem. J.**, v. 290, p. 51-57, 1993.
174. LYMAR, S.V.; HURST, J.K. Rapid reaction between peroxyxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 117, p. 8867-8868, 1995.
175. GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Viscosity effects on the reaction of peroxyxynitrite with CO₂: evidence for radical formation in a solvent cage. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 2444-2447, 1999.
176. HUIE, R.E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Rad. Res. Comm.**, v. 18, p. 195-199, 1993.
177. DENICOLA, A.; FREEMAN, B.A.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/ bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 333, p. 49-58, 1996.
178. MERENYI, G.; LIND, J. Thermodynamics of peroxyxynitrite and its CO₂ adduct. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 10, p. 1216-1220, 1997.
179. LIU, X.; MILLER, M.S.; JOSHI, M.S.; THOMAS, D.D.; LANCASTER JR., J.R. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p. 2175-2179, 1998.
180. GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 7, p.65-86, 1989.
181. KOPPENOL, W.H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Lett.**, v. 264, p. 165-167,1990.

182. WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochem.**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.
183. KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicol.**, v. 149, p. 43-50, 2000.
184. BYUNG, P.Y.U.; SUESCUN, E.A.; YANG, S.Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂: modulation by dietary restriction. **Mech. Ageing Dev.**, v. 65, p. 17-33, 1992.
185. KÖLLING, A.; MALDONADO, C.; OJEDA, F.; DIEHL, H.A. Membrane fluidity of microsomal and thymocyte membranes after X-ray and UV irradiation. **Radiat. Environ. Biophys.**, v. 33, p. 303-313, 1994.
186. HUANG, M.; LI, J.; TEOH, H.; MAN, R.Y.K. Low concentrations of 17 β -estradiol reduce oxidative modification of low-density lipoproteins in the presence of vitamin C and vitamin E. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 438-441, 1999.
187. RETSKY, K.L.; CHEN, K.; ZEIND, J.; FREI, B. Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 90-98, 1999.
188. RETSKY, K.L.; FREEMAN, M.W.; FREI, B. Ascorbic acid oxidation product (s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti-rather than prooxidant activity of vitamin C in the presence of transition metal ions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 1304-1309, 1993.

189. RETSKY, K.L.; FREI, B. Vitamin C prevents metal ion-dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low-density lipoprotein, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1257, p. 279-287, 1995.
190. GOSS, S.P.A.; HOGG, N.; KALVANARAMAN, B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 21647-21653, 1997.
191. COLLES, S.M.; CHISOLM, G.M. Lysophosphatidylcholine- induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 1188-1198, 2000.
192. KONTUSH, A.; MEYER, S.; FINCKH, B.; KOHLSCHUTTER, A.; BEISIEGEL, U. Alpha-tocopherol as a reductant for Cu (II) in human lipoproteins. Triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 11106-11112, 1996.
193. ROLAND, A.; PATTERSON, R.A.; LEAKE, D.S. Measurement of copper-binding sites on low-density lipoprotein. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 594-602, 2001.
194. AMIĆ, D.; DAVIDOVIĆ-AMIĆ, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIĆ, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croat. Chem. Acta**, v. 76, p. 55-61, 2003.
195. BORS, W.; MICHEL, C.; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 845-850, 1995.
196. VAN ACKER, S. A. B. E.; DE GROOT, M. J.; VAN DER BERG, D.; TROMP, M. N. J. L.; DEN KELDER, G. D.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p. 1305-1312, 1996.

197. ARORA, A.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 845–850, 1998.
198. CODY, V.; KOEHRLE, J.; AUFINKOLK, M.; ROLF-HESCH, H. Structure-activity relationships of flavonoid deiodinase inhibitors and enzyme active-site models. In: CODY, V.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. **Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships**. New York, 1986. p. 507-509.
199. BORS, W.; SÉLLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 343-355, 1990.
200. CHEN, Z.Y.; CHAN, P.T.; HO, K.Y.; FUNG, K.P.; WANG, J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by a number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chem. Phys. Lipids**, v. 79, p. 157-163, 1996.
201. BOMBARDELLI, E.; SPETTA, M. Phospholipid-polyphenol complexes: A new concept in skin care ingredients. **Cosmetics & Toiletries**, v. 106, p. 69-76, 1991.
202. REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v. 12, p. 151-180, 1991.
203. REITER, R.J. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. **Endocrine Rev.**, v. 1, p.109-131, 1980.
204. GUERRERO, J.M.; REITER, R.J. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. **Endocrine Res.**, v. 18, p. 91-113, 1992.

205. TAN, D.X.; REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; YAN, M.T.; EL-SAWI, M.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M.; HARDELAND, R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr. Med. Chem.**, v. 2, p. 181-197, 2002.
206. POEGGELER, B.; THUERMAN, S.; DOSE, A.; SCHOENKE, M.; BURKHARDT, S.; HARDELAND, R. Melatonin's unique radical scavenging properties- roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 20-30, 2002.
207. POEGGELER, B.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; CHEN, L.D.; MANCHESTER, L.C. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. **J. Pineal Res.**, v. 14, p. 151-168, 1993.
208. HUETHER, G.; REIMER, A.; SCHMIDT, F.; SCHUFF-WERNER, P.; BRUDNY, M.M. Oxidation of the indole nucleus of 5-hydroxytryptamine and formation of dimers in the presence of peroxidase and H₂O₂. **J. Neural Transm. Supplement**, v. 32, p. 249-257, 1990.
209. ZHANG, H.; SQUADRITO, G.L.; PRYOR, W.A. The reaction of melatonin with peroxyxynitrite: formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 251, p. 83-87, 1998.
210. PIERREFICHE, G.; TOPALL, G.; COURBAN, I.; HENRIET, H.; LABORIT, H. Antioxidant activity of melatonin in mice. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 80, p. 211-223, 1993.

211. JAIN, S.K.; LIM, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevent lipid peroxidation, protein glycosylation, and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, p. 232-237, 2001.
212. KANNAN, K.; JAIN, S.K. Effect of vitamin B₆ on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, p. 423-428, 2004.
213. NOMENCLATURE FOR VITAMINS B-6 AND RELATED COMPOUNDS. Disponível em: www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/B6.html
214. MCGOWAN, C. Influence of vitamin B₆ status on aspects of lead poisoning in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 47, p. 87-93, 1989.
215. CEVC, G.; MARSH, D. **Phospholipid bilayers: physical principles and models**. New York: John Wiley and Sons, 1987.
216. BERNIK, D.L.; DISALVO, E.A. Gel state surface properties of phosphatidylcholine liposomes as measured with merocyanine-540. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1146, p. 169-177, 1993.
217. CRONEY, J.C.; JAMESON, D.M.; LEARMONTH, R.P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 29, p. 60-65, 2001.
218. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. USA: Hartcourt Brace & Company, 1998.
219. GOÑI, F.M.; ALONSO, A. Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1508, p. 51-68, 2000.

220. OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.
221. BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 295-305, 1984.
222. KASCHNY, P.; GOÑI, F.M. The components of merocyanine-540 absorption spectra in aqueous, micellar and bilayers environments. **Eur. J. Biochem.**, v. 207, p. 1085-1091, 1992.
223. RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. **Techniques in free radical research**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991.
224. EXEROWA, D. Chain-melting phase transition and short-range molecular interactions in phospholipid foam bilayers. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 96, p. 75-100, 2002.
225. ZHAO, L.; FENG, S.S. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipids within model membranes. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 274, p. 55-68, 2004.
226. BILTONEN, R.L.; LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chem. Phys. Lipids**, v. 64, p. 129-142, 1993.
227. HÖHNE, G.W.H.; HEMMINGER, W.; FLAMMERSHEIM, H.-J. **Differential scanning calorimetry: an introduction for practitioners**. Germany: Springer, 1996.
228. ROSS, P.; GOLDBERG, R. A scanning microcalorimeter for thermally induced transitions in solution. **Thermochim. Acta**, v. 10, p. 143-151, 1974.
229. PRIVALOV, P.L.; PLOTNIKOV, V.V.; FILIMONOV, V.V. Precision scanning microcalorimeter for the study of liquids. **J. Chem. Thermodynamics**, v.7, p. 41-47, 1975.

230. NATIONAL PHYSICAL LABORATORY- DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY. Disponível em: www.npl.co.uk/ei/services/service_details.html
231. GRAY, A.P. A sample generalized theory for the analysis dynamic thermal measurements. In: PORTER, R.F.; JOHNSON, J.M. **Analytical Calorimetry**. New York, 1968.
232. INOUE, T.; TASAKA, T.; SHIMOZAWA, R. Miscibility of binary phospholipid mixtures under hydrated and unhydrated conditions. I. Phosphatidic acids with different acyl chain length. **Chem. Phys. Lipids**, v. 63, p. 203-212, 1992.
233. TIROSH, O.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; ALON, A.; BARENHOLZ, Y. Oxidative stress effect on the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. **Chem. Phys. Lipids**, v. 87, p. 17-22, 1997.
234. KOSTECKA-GUGALA, A.; LATOWSKI, D.; STRZALKA, K. Thermotropic phase behaviour of alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine multibilayers is influenced to various extents by carotenoids containing different structural features- evidence from differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1609, p. 193-202, 2003.
235. SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR spectroscopy: a guide for chemist**. New York: Oxford University Press, 1993.
236. SIMINOVITCH, D.J.; JEFFREY, K.R. Orientational order in the choline headgroup of shingomyelin: a ^{14}N -NMR study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 645, p. 270-278, 1981.
237. MILHAUD, J. New insights into water-phospholipid model membrane interactions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1663, p. 19-51, 2004.
238. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Singapore: John Wiley & Sons, 1991.

239. JENDRASIAK, G.L.; SMITH, R.; RIBEIRO, A.A. Chaotropic anion-phosphatidylcholine membrane interactions: an ultra high field NMR study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1145, p. 25-32, 1993.
240. RODRIGUES, C.; GAMEIRO, P.; PRIETO, M.; de CASTRO, B. Interaction of rifampicin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1620, p. 151-159, 2003.
241. ABRAHAM, R.J.; MARSDEN, I. NMR spectra of the porphyrins part 41. A molecular mechanics and NMR investigation of steric effects in ligand complexes. **Tetrahedron**, v. 48, p. 7489-7504, 1992.
242. TAUSKELA, J.S.; THOMPSON, M. A ^{31}P -NMR spin-lattice relaxation and ^{31}P [^1H] nuclear Overhauser effect study of sonicated small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1104, p. 137-146, 1992.
243. MIKKELSEN, R.B. In: CHAPMAN, D.; WALLACH, D.F.H. **Biological membranes**. London: Academic Press, 1976.
244. NORDLUND, J.R.; SCHMIDT, C.F.; THOMPSON, T.E. Transbilayer distribution in small unilamellar phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine vesicles. **Biochem.**, v. 20, p. 6415-6420, 1981.
245. SOHÁR, P. **Nuclear magnetic resonance spectroscopy**. Flórida: CRC Press, 1986.
246. SHAPIRO, I.U. E.; VIKTIROV, A.V.; BARSUKOV, L.I.; BERGEL'SON, L.D. Ferricyanide ion binding sites on the surface of lecithin liposomes. **Biofizika**, v. 23, p. 727-728, 1978.
247. BARSUKOV, L.I.; VICTOROV, A.V.; VASILENKO, I.A.; EVSTIGNEEVA, R.P.; BERGELSON, L.D. Investigation of the inside-outside distribution intermembrane

- exchange and transbilayer movement of phospholipids in sonicated vesicles by shift reagent NMR. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 598, p. 153-168, 1980.
248. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. **FEBS Lett.**, v. 350, p. 195-198, 1994.
249. CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P.; ALVES, E.W.; TEIXEIRA FERREIRA, A.; SCOFANO, H.M. Phosphatase activity of H⁺-ATPase from chloroplasts. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1320, p. 58-64, 1997.
250. SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 83-89, 1978.
251. BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.
252. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
253. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C.; ARUOMA, O.I. The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal. Biochem.**, v.165, p. 215-219, 1987.
254. RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls -the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.** v. 266, p. 4244-4250, 1991.
255. CANO, A.; ALCARAZO, O.; ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, p. 33-37, 2003.

256. LEDBETTER, J.W.; SCHAERTEL, S. Pyridinyl and ketyl radicals of pyridoxal-5'-phosphate on micellar and liposomal surfaces. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 47, p. 12-21, 1998.
257. SCHERER, P.G.; SEELING, J. Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. **Biochem.**, v. 28, p. 7720-7728, 1989.
258. KHAIRUTDINOV, R.F.; CODDINGTON, J.W.; HURST, J.K. Permeation of phospholipid membranes by peroxyxynitrite. **Biochem.**, v. 39, p. 14238-14249, 2000.
259. VIANI, P.; CERVATO, G.; FIORILLI, A.; RIGAMONTI, E.; CESTARO, B. Studies on peroxidation processes of model membranes and synaptosomes: role of phosphatidic acid. **Chem. Phys. Lipids**, v. 52, p. 49-55, 1990.
260. MABREY, S.; STURTEVANT, J.M. Incorporation of saturated fatty acids into phosphatidylcholine bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 486, p. 444-450, 1977.
261. McINTOSH, T.J. Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model. **Biophys. J.**, v. 29, p. 237-245, 1980.
262. PAULS, K. P.; MACKAY, A.L.; BLOOM, M. Deuterium nuclear magnetic resonance study of the effects of palmitic acid on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. **Biochem.**, v. 22, p. 6101-6109, 1983.
263. LUND-KATZ, S.; IBDAH, J.A.; LETIZIA, J.Y.; THOMAS, M.T.; PHILLIPS, M.C. A ¹³C NMR characterization of lysine residues in apolipoprotein B and their role in binding to the low density lipoprotein receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 13831-13838, 1988.

264. LUND-KATZ, S.; ZAIYOU, M.; WEHRLI, S.; DHANASEKARAN, P.; BALDWIN, F.; WEISGRABER, K.H.; PHILLIPS, M.C. Effects of lipid interaction on the lysine microenvironments in apolipoprotein E. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p.34459-34464, 2000.
265. MOVILEANU, L.; NEAGOE, I.; FLONTA, M.L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. **Int. J. Pharm.**, v. 205, p. 135-146, 2000.
266. ITOH, F.; MINAMIDE, Y.; HORIE, T.; AWAZU, S. Time dependent changes in rat liver microsomes upon lipid peroxidation. **Lipids**, v. 24, p. 905-908, 1989.
267. HU, M.L.; TAPPEL, A.L. GSH and antioxidants protect against LPO and protein damage. **Lipids**, v. 27, p. 42-45, 1992.
268. HU, M.L.; CHEN, Y.K.; LIN, Y.F. The antioxidant and prooxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. **Chem. Biol. Interact.**, v. 97, p. 63-73, 1995.
269. THOMAS, C.E.; AUST, S.D. Rat liver microsomal NADPH- dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 1, p. 293-300, 1985.
270. CHRISTEN, S.; WOODALL, A.A.; SHIGENAGA, M.K.; SOUTHWELL-KEELY, P.T.; DUNCAN, M.W.; AMES, B.N. γ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: physiological implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 3217-3222, 1997.
271. HENDERSON, J.M.; CODNER, M.A.; HOLLINS, B.; KUTNER, M.H.; MERRILL, A.H. The fasting B_6 vitamer profile and response to a piridoxine load in normal and cirrhotic subjects. **Hepatology**, v. 6, p. 464-471, 1986.
272. JUSTO, O.R.; MORAES, A.M. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. **Drug Deliv.**, v. 10, p. 201-207, 2003.

273. PARK, J.W. Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. **Breast Cancer Res.**, v. 4, p. 95-99, 2002.

9. ANEXOS

9.1. Artigo submetido e aceito para publicação na revista “Chemistry and Physics of Lipids”.

9.2. Artigo publicado na revista “Journal of Pineal Research”.

9.3. Lista dos trabalhos apresentados em eventos.

**9.1. ARTIGO SUBMETIDO E ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA
REVISTA “CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS”**

de LIMA, V.R.; MORFIM, M.P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants. *Chem. Phys. Lipids*, v. 132, p. 197-208, 2004.

9.2. ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “JOURNAL OF PINEAL RESEARCH”:

TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 262-268, 2003.

9.3. LISTA DOS TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

9.3. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

1. TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Action of melatonin against pro-oxidant enzymes and lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbil radicals and by peroxynitrite. In: **12 th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International SFFR Program and Abstracts**, 2004, Buenos Aires.
2. LIMA, V.R.; MORFIM, M.P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Correlações entre a ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, bicamadas lipídicas e antioxidantes. In: **XI Encontro de Química da Região Sul- A química e os novos desafios- Livro de Resumos**, 2003, p. QO-09, Pelotas-Rio Grande do Sul, Brasil.
3. ROSSO, R.; LIMA, V.R.; LEAL, P.C.; BOEK, P.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade de chalconas, acetofenonas e eugenóis obtidos sinteticamente. In: **XI Encontro de Química da Região Sul- A química e os novos desafios- Livro de Resumos**, 2003, p. QO-08, Pelotas-Rio Grande do Sul, Brasil.
4. TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin against pro oxidant enzymes and lipid peroxidation induced by hydroxyl and peroxynitrite. In: **XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2003, p. P-24, Caxambu-Minas Gerais, Brasil.