

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Modalidade Bioquímica**

CAMILA MARINHO MANO

Proteção Antioxidante Promovida por Astaxantina Sobre
Citocromo *c*, Incorporado em Vesículas e Desafiado com
SIN-1

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
01/08/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CAMILA MARINHO MANO

Proteção Antioxidante Promovida por Astaxantina Sobre
Citocromo *c*, Incorporado em Vesículas e Desafiado com
SIN-1

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

São Paulo

2008

CAMILA MARINHO MANO

Proteção Antioxidante Promovida por Astaxantina Sobre Citocromo *c* incorporado em

Vesículas e Desafiado com SIN-1

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências (Modalidade
Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Ângela e João, meus primeiros professores, os quais me ensinaram que com amor e trabalho se obtêm conquistas e, mesmo que estas pareçam simples, podem ser bastante significativas;

Às minhas irmãs, Carina e Caroline, que me ensinam, diariamente, novas maneiras de ser alegre;

Aos meus padrinhos Olívia e Domingos, que me ensinaram o que é generosidade;

Aos meus primos, Vagner e Cristiane, que me ensinaram o que é ser irmão, mesmo quando não se nasce do mesmo ventre;

Aos meus priminhos Raphael e Gabriel, que me re-ensinaram a pular na cama, jogar travesseiros e observar com curiosidade para as coisas que acontecem durante a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Prof Dr. Etelvino J. H. Bechara, pela acolhida em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos, discussões, sugestões e principalmente, pela orientação que, ao mesmo tempo, é obstinada, mas permite que seus alunos explorem sua própria criatividade na formulação de hipóteses e experimentos, estimulando assim a formação de um pesquisador.

Ao Dr. Marcelo Paes de Barros, da Universidade Cruzeiro do Sul, onde realizei a graduação, por ser a primeira pessoa a me ensinar os passos para a realização de pesquisas científicas, pelo estímulo a continuar no trabalho acadêmico e pelas discussões e colaboração com este trabalho.

À Profa. Dra. Iseli Lourenço Nantes e suas alunas Priscila, Tatiane e Kátia, da Universidade de Mogi das Cruzes, pelo auxílio nos experimentos de EPR, valiosas informações, discussão e críticas feitas aos resultados obtidos.

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento, do Instituto de Física da USP – São Carlos, por auxiliar na realização dos experimentos de EPR e na análise dos resultados.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo por ceder, diversas vezes, o espaço em seu laboratório e também pelas sugestões feitas a esta pesquisa. A Dra. Karina Cardoso e Dra. Taís Guaratini por me ensinarem algumas técnicas utilizadas nesta pesquisa.

Aos colegas de laboratório Adriano, Caroline, Chrislaine, Débora, Douglas, Julio, Dr. Nilson Assunção, Rafael, Rita e Ms. Vanessa Eid, pelos trabalhos que foram realizados em conjunto, pela amizade e conversas, descontraídas ou sérias, que são essenciais para a pesquisa, nos momentos em que encontrar explicações para os resultados parece cansativo.

Ao Fábio Dyszy pela paciência ao me ensinar à usar o CD ao acompanhar alguns experimentos que realizei.

Ao Dr. Cássius Stevani e seus alunos de pós-graduação, Olívia, Anderson e Luis Fernando, pelos ensinamentos, críticas e momentos de pouca seriedade.

À técnica Adriana pela paciência e atenção com que atendeu aos meus questionamentos e pedidos, e à técnica Dóris, pela dedicação com a qual organiza e cuida do laboratório.

Aos professores, Dra. Alicia Kowaltowski, Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, Dr. Bayardo Baptista Torres, Dra. Iolanda Midea Coccovia, Dr. Mário José Politi, Dr. Robert Ivan Schumacher e Dra. Shiley Schreier pela oportunidade de aprender com eles, nos momentos em que questionei sobre algumas técnicas ou resultados.

Aos colegas do Instituto de Química, André, Ariel, Débora, Fábio, Fernanda, Graciele, Heloísa, Julio, Lúcio e Márcia pelas conversas de corredor.

Ao CNPq, à FAPESP e à *International Foundation for Science* pelo apoio financeiro, sem o qual esta pesquisa jamais poderia ser realizada.

“Tudo o que acontece, acontece.
Tudo o que, ao acontecer, faz com que outra
coisa aconteça, faz com que outra coisa
aconteça.

Tudo o que, ao acontecer, faz com que ela
mesma aconteça de novo, acontece de novo.
Isso, contudo, não acontece necessariamente
em ordem cronológica.”

Douglas Adams

RESUMO

Mano, C.M. **Proteção Antioxidante Promovida por Astaxantina Sobre Citocromo *c* Incorporado em Vesículas e Desafiado com SIN-1** 2008. 66 p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A astaxantina (AST) é um carotenóide derivado do β -caroteno produzido por algas e cianobactérias, mas que também pode ser encontrada em animais marinhos. Em animais, é reportada como interceptadora de radicais de oxigênio mais eficiente que o β -caroteno. O objetivo central dessa dissertação foi avaliar a capacidade antioxidante da AST em lipossomos enriquecidos com citocromo *c* (cit *c*) desafiados com 3-morfolinossidnonimina (SIN-1), um doador de óxido nítrico, em diferentes microambientes (pH e composição das vesículas). Diferenças na interação destas vesículas com o cit *c* periférico, com reflexos na atividade antioxidante da AST também foram avaliadas. O SIN-1 gera, por termólise, quantidades equimolares de radical superóxido e óxido nítrico, quando há oxigênio no meio. Vesículas unilamelares de fosfatidilcolina (PC), PC contendo 5% ou 10% de fosfatidilglicerol (PG), com ou sem AST, foram incubadas com SIN-1 e/ou cit *c*. Medidas do índice de lipoperoxidação pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) revelaram que SIN-1 não causa aumento de TBARS, enquanto o cit *c* foi capaz de aumentar significativamente este índice. Este fato pode ser explicado pela atividade peroxidásica do cit *c*. Apenas em vesículas de PCPG10%, ao realizar a incubação do cit *c* concomitantemente com SIN-1, o índice de TBARS foi maior ao observado em vesículas incubadas apenas com cit *c*. É conhecido que a interação entre cit *c* e membranas aniônicas pode alterar a conformação da proteína, aumentando sua atividade peroxidásica. A presença da AST fez com que os índices de lipoperoxidação chegassem a valores próximos aos do controle. A alteração no pH do meio revelou que a AST possui ação antioxidante mais pronunciada em pHs 7,4 e 8,0, em comparação com pHs levemente ácidos. A presença de PG evidenciou ainda mais esta tendência e em pH 6,2, a AST apresentou inclusive pequena atividade pró-oxidante. Estes resultados podem ser discutidos à luz de alterações da permeabilidade da membrana e da reatividade de espécies reativas induzidas por mudanças da fluidez e de pH. O efeito dos produtos gerados por SIN-1 sobre o cit *c* foi estudado em condições de normóxia e hipóxia. Resultados de EPR e de fluorescência demonstram que a presença do radical superóxido previne lesões oxidativas causada por peróxido orgânico (t-butOOH) tanto no cit *c*

quanto nas membranas, pois é capaz de reduzir o ferro hemínico do cit *c*. Através de CD e espectrofotometria UV-Vis e EPR, foi observado que a incubação com SIN-1 promove alterações estruturais no cit *c* causando ruptura na sexta coordenação do ferro hemínico, levando à geração de uma espécie de cit *c* com rombicidade menor em comparação ao cit *c* nativo e que apresenta maior atividade peroxidásica. Este trabalho contribui com informações para entendimento do mecanismo antioxidante da AST em diferentes microambientes, além de demonstrar o efeito paradoxal do superóxido que é capaz de proteger o cit *c*, através da redução do ferro hemínico, mas também pode expor a proteína à oxidação promovida por peroxinitrito.

Palavras-chave: Astaxantina; Citocromo *c*; Fosfatidilcolina; Fosfatidilglicerol; Peroxinitrito; Superóxido; Antioxidante.

ABSTRACT

Mano, C.M. **Antioxidant Protection Promoted by Astaxanthin over Cytochrome *c* Incorporated in Vesicles and Challenged with SIN-1**. 2008. 66p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Astaxanthin (AST) is a β -carotene derived carotenoid, produced by algae and cyanobacteria, but can also be found in marine animals. In phytoplankton it has the function to absorb light radiation for photosynthesis occurrence. In animals AST acts as a scavenger of oxygen free radicals, even more efficiently than β -carotene itself. The main objective of this work is to evaluate the antioxidant capacity of AST over cytochrome *c* (cyt *c*) incorporated in liposomes and challenged with 3-morpholininosidnonimine (SIN-1), a nitric oxide donor, under different experimental conditions, namely vesicles composition and pH. Distinct interactions between cyt *c* and vesicles affecting the AST antioxidant activity were also evaluated. SIN-1 spontaneously generates equal amount of nitric oxide and superoxide anion when oxygen is present. Unilamellar vesicles made from phosphatidylcholine (PC) or PC with 5% or 10% of phosphatidylglycerol (PG), with or without AST, were incubated with SIN-1 and/or cyt *c*. The extent of lipid peroxidation was evaluated by the classical method of thiobarbituric reactive substances (TBARS). Control experiments with SIN-1 alone showed no increase in TBARS content, whereas cyt *c* significantly increased TBARS. Concomitant addition of cyt *c*, SIN-1 to PCPG10% vesicles led to lipid peroxidation indices even higher than those found when cyt *c* was incubated with PCPG10% vesicles. A peroxidase activity of cyt *c* resulting from the interaction between this protein and anionic membranes can explain this result. In this system, the presence of AST inhibited formation of TBARS, whose levels were near the control values. Astaxanthin was found to exhibit a more effective antioxidant capacity under basic pH (7.4 and 8.0), in comparison with pH 6.2 and 6.8. In the presence of PG, this trend became more evident. Interestingly, at pH 6.2, AST showed a slight pro-oxidant activity. These results can be explained by differences in membrane permeability and reactivity of reactive species, caused by pH and membrane fluidity alterations. The effects of products of SIN-1 decomposition on cyt *c* structure and its peroxidase activity were investigated under hypoxia and normoxia. EPR and fluorescence experiments revealed that superoxide anion radical, due to its ability to reduce heme iron, prevents oxidative damage of cyt *c* and membrane lipids by peroxide-derived free radicals. By means of CD and UV-Visible spectroscopy, we have found that concomitant incubation of SIN-1 and cyt *c* promoted structural alterations in the protein

which changes the iron's sixth axial coordination, leading to generation of a less rhombic cytochrome *c*, which is reportedly a better peroxidase than native cytochrome *c*. This work contributes with information aiming to better understand the antioxidant mechanism of AST under different membrane microenvironments and unveil a paradoxical effect of superoxide ion, which can protect cytochrome *c* from oxidative lesions by transferring electron to ferricytochrome *c*, but can also expose cytochrome *c* to oxidation by peroxynitrite.

Keywords: Astaxanthin; Cytochrome *c*; Phosphatidylcholine; Phosphatidylglycerol; Peroxynitrite; Superoxide; Antioxidant.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1 – Fator de Ativação de Protease Apoptótica 1

AST – Astaxantina

ATP – Adenosina Trifosfato

BHT - Butilhidroxitolueno

C₁₁-BODIPY^{581/591} - 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico

Cit c – Citocromo c

CuZnSOD – Superóxido Dismutase Dependente de Cobre e Zinco

DAF-FM – 4-Amino-5-Metilamino-2',7'-Difluorofluoresceína

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPR – Ressonância Paramagnética Eletrônica

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

HO[•] – Radical Hidroxil

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MDA – Malondialdeído

MeOH – Metanol

Met80 – Metionina Situada na Posição 80 do Citocromo c

NOS – Óxido Nítrico Sintetase

PC – Fosfatidilcolina

PG – Fosfatidilglicerol

R[•] – Radical Alquenil

RO[•] – Radical Alcoxil

ROO[•] – Radical Peroxil

SIN-1 - 3-Morfolinosidnonimina-*N*-etilcarbamida

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TBARS – Teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

t-butOOH - *tert*-butil-hidroperóxido

UV – Ultravioleta

Vis – Visível

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos Gerais.....	1
1.2 Estrutura e Biossíntese da Astaxantina.....	2
1.3 Funções da Astaxantina.....	3
1.4 Astaxantina como Antioxidante.....	5
1.5 3-Morfolinosidnonimina- <i>N</i> -etilcarbamida.....	7
1.6 Lipídios e Lipoperoxidação.....	8
1.7 Hemeproteínas e Atividade Peroxidásica.....	10
1.8 Citocromo <i>c</i>	11
2. Objetivos.....	13
3. Materiais e Métodos.....	14
3.1 Preparação das Vesículas.....	14
3.2 Sistemas de Oxidação.....	14
3.3 Efeito do pH sobre a Atividade Antioxidante da Astaxantina.....	15
3.4 Medida de MDA por HPLC.....	16
3.5 Espectrofotometria UV-Visível.....	16
3.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	17
3.7 Dicroísmo Circular (CD).....	17
3.8 Espalhamento de Luz Dinâmico.....	17
3.9 Determinação de NO [•]	18
3.10 Determinação de Lipoperoxidação por Fluorescência.....	18
3.11 Análise Estatística.....	19
4. Resultados.....	20
4.1 Lipoperoxidação.....	20
4.2 Efeito da Alteração do Microambiente na Atividade Antioxidante da Astaxantina.....	21
4.3 Análises Espectrofotométrica UV-Visível.....	28
4.4 Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Cit <i>c</i> /SIN-1 em Baixa Temperatura (EPR).....	32
4.5 Espectros de Dicroísmo Circular.....	34
4.6 Espectroscopia UV-Vis do Cit <i>c</i> Incubado com SIN-1.....	36

4.7 Geração de NO•	39
4.8 Avaliação de Peroxidação na Interface Membrana/Água.....	40
4.9 Efeito da Astaxantina no Diâmetro das Vesículas.....	42
5. Discussão.....	43
6. Conclusões.....	56
7. Bibliografia.....	58
Lista de Anexos.....	65

1. Introdução

1.1 Aspectos Gerais

Compostos antioxidantes são largamente estudados em sistemas-modelo e em desordens genéticas ou adquiridas, por combaterem eficientemente a ação lesiva causada por Espécies Reativas de Oxigênio/Nitrogênio (EROs/ERNs). Durante os diferentes processos metabólicos em qualquer ser vivo, um diversificado repertório de EROs/ERNs é produzido e contrabalanceado por defesas antioxidantes de alcance e propriedades físico-químicas distintas.

Defesas antioxidantes podem ser produzidas pelo próprio organismo ou adquiridas através da dieta. Dentre os sistemas químicos antioxidantes, destacam-se os carotenóides, pigmentos capazes de inibir ou prevenir as ações nocivas das EROs/ERNs (TERAO, 1989). Os carotenóides são compostos produzidos por algas, plantas e microorganismo, nos quais cumprem as funções de absorver luz no complexo antena de cloroplastos, para a realização da fotossíntese, e de proteger estes organismos contra efeitos nocivos causados pelo excesso de radiação luminosa (MIKI, 1991). Em animais, a ingestão de carotenóides foi relacionada com a prevenção ou retardo de processos degenerativos tais como câncer, mal de Parkinson, Alzheimer, doenças cardiovasculares, úlcera infecciosa provocada pela bactéria *Helicobacter pylorii* e processos degenerativos como o envelhecimento (VOUTILAINEN *et al*, 2006).

Diversas pesquisas foram encetadas com a finalidade de explicar os efeitos benéficos do consumo de carotenóides (MAYNE, 1996). Ainda que estes efeitos não sejam totalmente compreendidos, a atividade antioxidante é apontada como uma das causas dos benefícios resultantes da ingestão daqueles pigmentos (BURTON; INGOLD, 1984; YOUNG; LOWE, 2000; VOUTILAINEN *et al*, 2006).

Dentre os carotenóides conhecidos, o melhor caracterizado é o β -caroteno, porém estudos demonstram que outros carotenóides tais como o licopeno podem apresentar atividade antioxidante mais eficiente (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989; RENGEL *et al*, 2000; BARROS *et al*, 2001). O β -caroteno, além de apresentar a função de absorver luz no complexo antena de cloroplastos, possui ação pró-vitamina A (retinol) em animais, já que sua clivagem entre os carbonos na posição 15, 15', realizada pela enzima β -caroteno-15, 15' oxigenase, forma duas moléculas daquela vitamina (MIKI, 1991). Em humanos, esta vitamina é essencial para o crescimento e diferenciação de células (por exemplo, células do epitélio pulmonar) e para a formação de pigmentos da retina (BIESALSKI; NOHR, 2004). Alguns

animais, por exemplo, o gato (*Felis catus*), não apresentam a enzima conversora de β -caroteno em vitamina A. Diante deste fato, estudos foram direcionados à caracterização de outras funções dos carotenóides. Pesquisas realizadas na década de 90 sugerem que a ingestão de alimentos ricos em carotenóides pode ter ação profilática contra doenças relacionadas a radicais livres, apontando assim a importância da atividade antioxidante exercida por esses polienos (BURTON; INGOLD, 1984; YOUNG; LOWE, 2000).

1.2 Estrutura e Biossíntese da AST

Os carotenóides apresentam, tipicamente, uma longa estrutura alifática, com alternância de ligações duplas e simples. Por causa da conjugação presente em sua estrutura, estes compostos apresentam capacidade de absorver luz visível. Os carotenóides são diferenciados pelas suas extremidades. Uma delas, ou ambas, pode ser cíclica (por exemplo, o β -caroteno) ou apresentar grupos funcionais de oxigênio (carbonila, hidroxila, carboxila) e, neste último caso, os compostos são conhecidos como xantofilas. As xantofilas são bastante difundidas entre os animais, plantas e bactérias, apresentando diversas funções, dentre elas, uma atividade antioxidante (RENGEL *et alli*, 2000).

A astaxantina (AST) (Figura 1), *all trans*-3,3'-di-hidroxi-4,4'-diceto- β -caroteno, é uma xantofila extremamente distribuída entre os organismos marinhos, incluindo algas (*Haematococcus pluvialis*), bactérias (*Agrobacterium auranticum*) e animais, tais como crustáceos e peixes, (*Salmo salar*) (YUAN; CHEN, 2000; MIKI, 1991).

A biossíntese da AST, iniciada pelo isopentenil pirofosfato, estende-se a partir da formação do β -caroteno. Após a geração deste, devido à ação das enzimas β -caroteno hidroxilase e β -caroteno oxigenase, os grupos hidroxila e carboxila são adicionados aos anéis do carotenóide (Figura 2) (EONSEON; LEE; POLLE, 2006). Apesar de ser encontrada em diversos animais, principalmente marinhos, a AST não é sintetizada por estes seres e deve, portanto, ser adquirida através da dieta. (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). Atualmente, a AST é comercializada como suplemento alimentar, principalmente na aquicultura de salmão (*Salmo salar*) e crustáceos (camarões e lagostas). A AST pode ser adquirida comercialmente na forma de extrato da alga verde unicelular *Haematococcus pluvialis* (YUAN; CHEN, 2000).

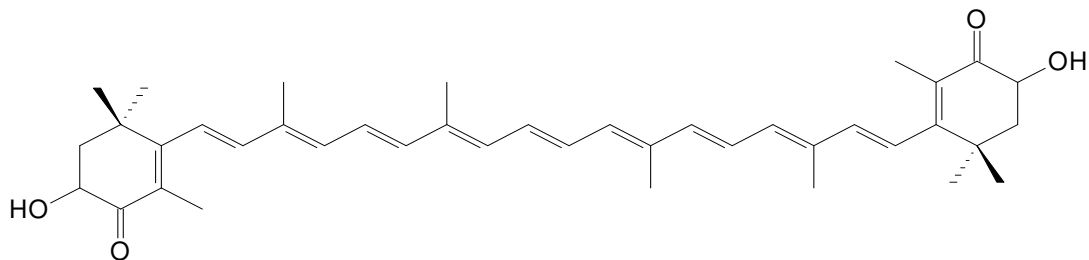


Figura 1 – Estrutura química da AST. Nota-se dois grupamentos hidroxila e dois grupos carbonila, ausentes nos anéis β do β caroteno.

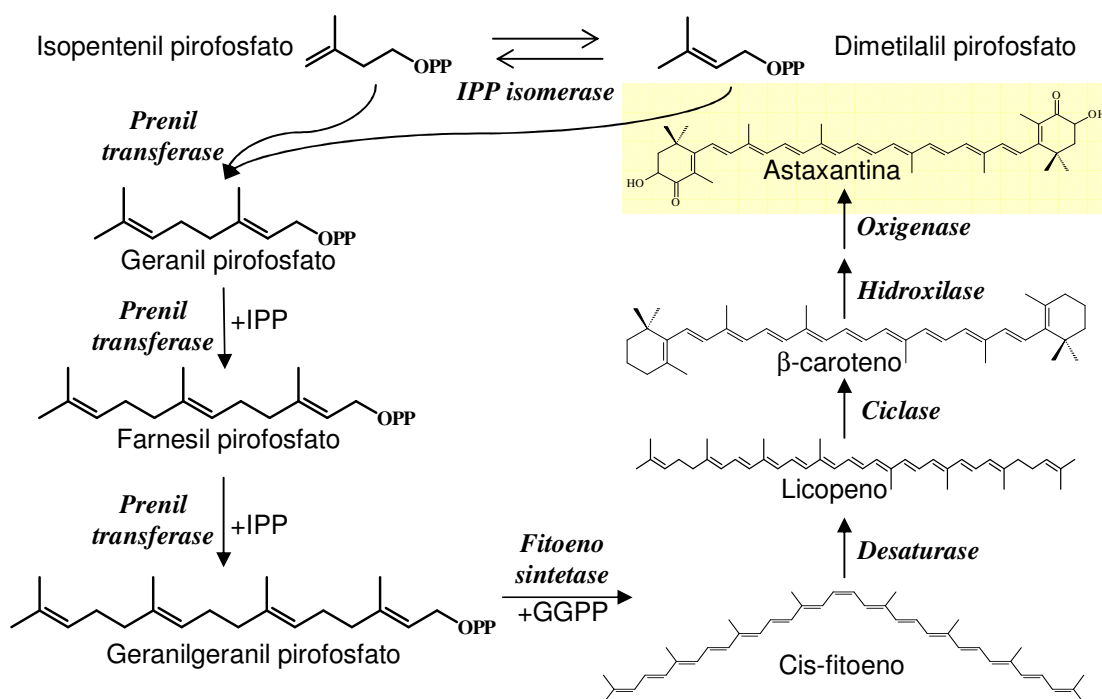


Figura 2 – Esquema da biossíntese da AST, destacando as principais enzimas e seus produtos. Adaptado de BOSHALL; BERNSTEIN, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 2005.

1.3 Funções da AST

Como os demais carotenóides, a AST pode prover fotoproteção às membranas onde se encontra associada ao captar o excesso de radiação, dissipá-la na forma de calor e, assim, evitar danos peroxidativos a biomoléculas (DNA, açúcares, proteínas, lipídios) (MIKI, 1991). Do mesmo modo, em organismos fotossintetizantes, carotenóides apresentam a importante

função de captar radiação luminosa e transferir essa energia para clorofila, participando assim da fase clara da fotossíntese (CUNNINGHAM; GANTT, 1998). Apesar de poder participar da fotossíntese, a AST é um carotenóide secundário, ou seja, não é essencial para a realização do processo fotossintético, diferentemente, por exemplo, do β -caroteno. Além disso, a AST também é um importante pigmento para coloração de algumas plantas e algas (CUNNINGHAM; GANTT, 1998).

A importância da AST no metabolismo de animais pode ser apreciada por estudos da síndrome M74, uma ictiopatologia que diminui a fertilidade de salmões adultos e reduz substancialmente a sobrevivência de alevinos eclodidos de ovos de salmões do Mar Báltico. Os peixes acometidos pela síndrome são caracterizados bioquimicamente pela despigmentação e redução no conteúdo de tiamina (vitamina B1) do tecido muscular esquelético e, em decorrência desta deficiência, apresentam menor resistência muscular frente aos desafios oxidativos impostos pela marcha “contra a corrente” para a deposição de ovos na cabeceira dos rios que escoam para o Mar Báltico. Os alevinos acometidos desta ovitaminose, além da baixa pigmentação, apresentam disfunções neurológicas e hepáticas (com hemorragias internas) e executam movimentos natatórios irregulares e atípicos, tornando-se alvos mais fáceis de predadores (KARLSSON *et al*, 1999; PETTERSSON; LIGNELL, 1999). É importante ressaltar que, devido às hidroxilas e carbonilas presentes nos anéis β , animais não geram vitamina A a partir da AST, portanto, sua necessidade em animais é atribuída a outras funções (UCHIYAMA; YAMAGUCHI, 2005).

A capacidade antioxidante da AST é obviamente determinada pela sua estrutura química. Nos anéis β da AST, estão dispostos dois grupamentos hidroxilas (posições 3 e 3') e dois grupamentos carbonila (posições 4 e 4'), que lhe conferem características mais hidrofílicas se comparada com outros carotenóides típicos. Em termos de disposição espacial em membranas, a AST se distribui de uma forma quase perpendicular em relação à superfície da membrana (Figura 3), com as duas extremidades em contato com a água. A AST pode interceptar diretamente ERO/ERNs, através de reações de transferência de elétrons ou de hidrogênio em duplas ligações (YOUNG; LOWE, 2000; RENGEL *et al*, 2000; SHIBATA *et al*, 2001; SOCACIU *et al*, 2002).

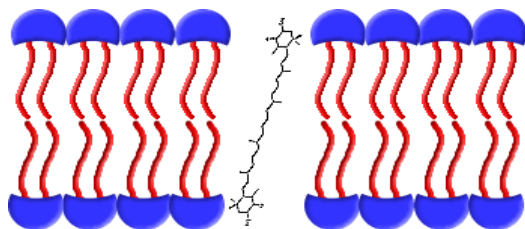


Figura 3 – Esquema ilustrando a disposição espacial da AST na bicamada lipídica.

1.4 Astaxantina como Antioxidante

Conforme anteriormente citado, EROs/ERNs são intermediários comuns do metabolismo aeróbico. O oxigênio está presente em concentrações elevadas na mitocôndria, onde atua como acceptor final de elétrons provenientes da oxidação do NADH e do FADH₂. Eventuais escapes de elétrons da cadeia podem acarretar a redução monoelétrica do oxigênio ao ânion radical superóxido (O₂^{•-}). Este é uma das primeiras EROs geradas durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, especialmente no complexo I, por ocorrência de uma reversão na cadeia de transporte de elétrons (LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002) e no complexo III, pelo escape de elétrons da semiubiquinona (MULLER; LIU; VAN REMMEN, 2004).

O O₂^{•-} é o principal precursor de outras EROs, como o radical hidroxil (HO[•]), cuja constante de velocidade de reação com biomoléculas chega a ~10⁻⁹ M⁻¹s⁻¹ e é considerado um dos mais potentes agentes oxidantes (E^o = 2,31 V) (Figura 4).



Figura 4- Reduções univalentes geradoras de EROs.

Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são também produzidas no metabolismo, especialmente o óxido nítrico (NO[•]), o qual é gerado pela oxidação de L-arginina e NADPH por O₂, catalisada pela óxido nítrico sintase. O NO[•] é sinalizador chave da vasodilatação e desencadeamento de resposta imunológica (KLEIN, 2002). A reação direta entre o NO[•] e o radical O₂^{•-} forma o peroxinitrito (ONOO⁻), com constante de velocidade controlada por difusão (k₂ ~ 10⁹ M⁻¹s⁻¹) (CASSINA *et al*, 2000).

Biomoléculas são alvos potenciais da ação deletéria de EROs/ERNs uma vez que estas espécies adquirem estabilidade eletrônica ao abstrair elétrons das biomoléculas. Assim, novos radicais são formados acarretando na degradação destas biomoléculas e de estruturas celulares a elas associadas: membranas biológicas, complexos enzimáticos, estruturas citoesqueléticas e cromatina (BURTON; INGOLD, 1984; PALOZZA *et al*, 2008). Do mesmo modo, reações radicalares em cadeia induzem alterações químicas em seqüências de nucleotídeos do DNA, incluindo adições, desaminações, hidroxilações, rearranjos, etc. Consequentemente, as EROs/ERNs podem induzir mutações ou tumores em função dos genes afetados, em associação à degeneração de diversos componentes celulares e tecidos (RODRIGUEZ *et al*, 1995). Estes são exemplos de mecanismos moleculares/celulares associados a diversas patologias correlacionadas a desequilíbrios no metabolismo de EROs/ERNs.

Diversos estudos foram elaborados para testar a relação entre o consumo de frutas e verduras, ricos em carotenóides, e o risco de doenças associadas à produção descompensada de espécies reativas. Os resultados mostraram que grupos de pessoas consumidoras de grande quantidade de vegetais apresentam altas taxas de carotenóides no plasma sanguíneo e menor risco de desenvolverem tais doenças (MAYNE, 1996; RAO; RAO, 2007). Diante disso, realizaram-se diversas pesquisas para elucidar a maneira pela qual os carotenóides podem prevenir as lesões em biomoléculas causadas pelas EROs/ERNs (Burton; Ingold, 1984; Di Mascio; Kaiser; Sies, 1989; Guerin; Huntley; Olaizola, 2003).

Carotenóides com características mais polares, como a AST, ao se associarem com bicamadas lipídicas através de interações hidrofóbicas do tipo London presentes entre a cadeia poliênica da AST e de grupos acila dos ácidos graxos constituintes das membranas e interações dipolo-dipolo entre a região polar do fosfolipídio e o carotenóide, diminuem a fluidez da bicamada lipídica, limitando a difusão de moléculas para o espaço interno delimitado pela membrana (YOUNG; LOWE, 2000). A associação da AST com membranas biológicas pode resultar em substancial inibição da difusão de algumas EROs/ERNs para o espaço aquoso interno celular (citosol nas células). Isso confere ao carotenóide uma ação antioxidante paralela à capacidade interceptadora de radicais já formados (*scavenger*), a de prevenir lipoperoxidação por diminuir a difusão de espécies reativas para o *core* da membrana (RENGEL *et al*, 2000).

A AST tem sido reportada como um eficiente interceptador de radicais peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet), intermediários regulares do processo de lipoperoxidação de

membranas naturais ou sistemas biomiméticos lipídicos (lipossomos, micelas, etc.) (BARROS *et al*, 2001; PANASENKO *et al*, 2000). Curiosamente, a AST é descrita como um antioxidante mais eficiente que, seu precursor, o β -Caroteno e também a Cantaxantina e a Zeaxantina, que diferem da primeira exclusivamente pela ausência nos grupamentos hidroxila e cetona, respectivamente (MIKI, 1991; WOODALL; BRITTON; JACKSON, 1997).

A constante de *quenching* de oxigênio singlete [$O_2(^1\Delta_g)$] por AST é muito alta ($2,4 \cdot 10^{10} M^{-1}s^{-1}$). Comparando-se este valor ao de outros antioxidantes já conhecidos – o licopeno ($3,1 \cdot 10^{10} M^{-1}.s^{-1}$) e o α -tocoferol, ($1,4 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$) – confirma-se a alta eficiência da AST na prevenção (ou retardamento) da degradação oxidativa provocada por oxigênio singlete, principalmente em bicamadas lipídicas (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989). O oxigênio singlete é um dos estados excitados do oxigênio molecular, alcançado pela absorção de 22,4 kcal/mol, em processos fotofísicos, químicos ou enzimáticos, necessárias para a inversão do spin de um elétron e subsequente formação de um par eletrônico compartilhado em um único orbital molecular anti-ligante π_x^* . Esta distribuição eletrônica confere maior reatividade ao oxigênio molecular com cadeias insaturadas, principalmente aquelas de ácidos graxos poli-insaturados de membranas biológicas e também com sulfetos, tióis e aminas.

Recentes estudos ressaltam a importância dos carotenóides para os organismos, caracterizando suas diversas funções, inclusive sua atividade antioxidante (MCNULTY, JACOB, MASON, 2008; PASHKOW, WATUMULL, CAMPBELL, 2008). Diversos trabalhos verificaram a efetividade dos carotenóides como antioxidantes em sistemas miméticos de membrana e informaram que as xantofilas, com grupos cetona ou hidroxila, são mais eficientes que carotenóides sem características polares (WOODALL; BRITTON; JACKSON, 1997). Porém, estudos que caracterizam as xantofilas como antioxidantes em microambientes diferenciados, envolvendo alterações no pH ou interação entre fosfolipídios e proteínas, são poucos discutidos na literatura. Tais estudos são relevantes pois, *in vivo*, xantofilas raramente são encontradas em solução, estando normalmente associadas a proteínas ou lipídios. Além disso, a interação entre carotenóides e bicamada lipídica pode afetar a eficiência antioxidante do pigmento (MIKI, 1991).

1.5 3-morfolinossidnonimina-N-etilcarbamida

A 3-morfolinossidnonimina-N-etilcarbamida (SIN-1) (Figura 5) sofre hidrólise espontânea a 37 °C, formando um intermediário (SIN-1A) que então perde um elétron e lentamente libera NO^* , mimetizando as condições encontradas *in vivo* (MARTIN-ROMERO

et al, 2003). O elétron doado pelo SIN-1 pode reduzir o O_2 dissolvido no meio gerando também $O_2^{\cdot-}$ (SINGH *et alli*, 1999), Em sistemas biológicos, o SIN-1 normalmente é utilizado para vasodilatação mas, *in vitro*, gera $O_2^{\cdot-}$ o qual reage com NO^{\cdot} produzindo $ONOO^{\cdot}$.

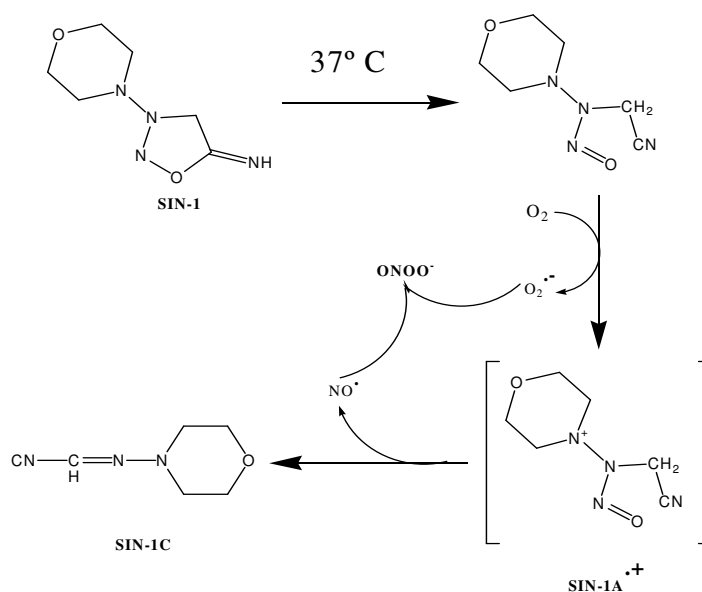


Figura 5 – Termólise da 3-morfolinosidnonimina (SIN-1). Esquema adaptado de Singh *et al*, *Arch. Biochem. Biophys.* **361**, 1999.

1.6 Lipídios e a Lipoperoxidação

Os lipídios são biomoléculas com diversas funções celulares, dentre as quais se pode destacar a formação de bicamadas lipídicas (membranas), armazenamento de energia e compostos precursores de sinalizadores celulares (*p.e.* hormônios). Sofrem peroxidação iniciada pela ação de EROs/ERNs, gerando vários produtos, entre eles, hidroperóxidos, aldeídos, hidrocarbonetos, etc. Intermediários e produtos da lipoperoxidação, como os radicais ROO^{\cdot} e o malondialdeído, respectivamente, podem adicionar-se a outras biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos, modificando-as e alterando sua função. É reconhecido que a degradação de lipídios está associada a processos inflamatórios e necróticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Outro exemplo relevante é a degradação de lipídios do sistema nervoso. Lesões na bainha de mielina por EROs/ERNs são apontadas como causadoras de várias neuropatias associadas a ineficiente transmissão do impulso nervoso (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003).

A peroxidação lipídica é iniciada quando um átomo de hidrogênio é abstraído de um ácido graxo insaturado por um radical. O radical alquenil formado ($\bullet R$), estabilizado por ressonância, pode reagir com oxigênio molecular, formando o radical peroxil ($ROO\bullet$), o qual propaga a oxidação (BURTON; INGOLD, 1984). Um dos produtos mais bem caracterizados deste processo oxidativo é o malondialdeído (MDA), o qual é utilizado como indicador de peroxidação lipídica.

Testes de peroxidação lipídica realizados *in vitro* utilizam sistemas miméticos de membranas. A fosfatidilcolina (PC) é bastante utilizada (Figura 6) nestes testes, já que se trata de um fosfolipídio amplamente distribuído entre os seres vivos, desde organismos procariotos até eucariotos (DOWHAN, 1997).

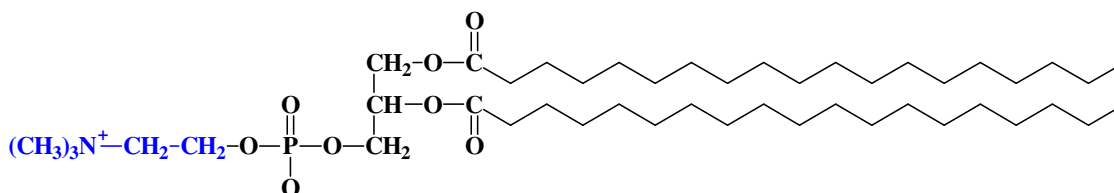


Figura 6: Estrutura química da fosfatidilcolina. A região em azul representa a alteração da “cabeça” polar da fosfatidilcolina e a região em preto representa a parte conservada de diferentes fosfolipídios. As duas cadeias alifáticas apresentadas podem possuir tamanhos variados ou até mesmo algumas insaturações, que são os principais alvos de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio.

Estudos demonstram que a maior parte das membranas biológicas é constituída de fosfolipídios zwitteriônicos em pH fisiológico, como a PC, e que menos de 30% destes lipídios são aniônicos (DOWHAN, 1997).

Diferentes características dos fosfolipídios, como insaturações e cargas elétricas, podem modular a fluidez das membranas, tornando-as mais ou menos permeáveis às moléculas, e a algumas EROs/ERNs (WATTS *et alli*, 1978; HOOK, 1984). Para mimetizar as características físico-químicas da membrana interna da mitocôndria em testes *in vitro*, o fosfolipídio normalmente utilizado é a cardiolipina que, diferentemente dos outros fosfolipídios, possui quatro ligações ésteres de ácido graxo na sua porção apolar e é um derivado do fosfatidilglicerol (PG) (Figura 7), sintetizado na própria mitocôndria. (MCMILLIN; DOWHAN, 2002).

A temperatura de transição de fase (de gel para líquido-cristalina) é diminuída quando há insaturações presentes nos ácidos graxos dos fosfolipídios, aumentando a fluidez da bicamada. Estudos demonstram que a presença de fosfolipídios aniônicos, como a

cardiolipina e o PG, aumentam também essa fluidez, deixando a membrana mais permeável a EROs/ERNs (WATTS *et alli*, 1978; HOOK, 1984). Além disso, algumas proteínas que possuem aminoácidos básicos em sua superfície, podem interagir com fosfolipídios aniônicos.

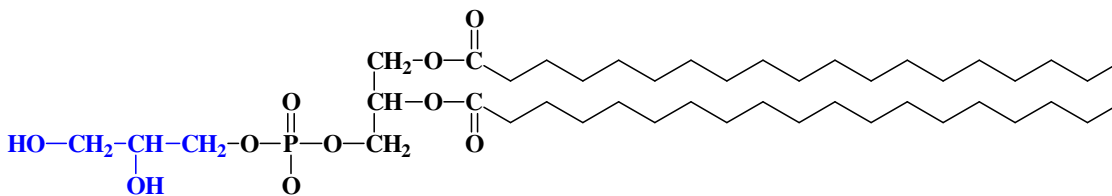


Figura 7: Estrutura química do fosfatidilglicerol. A região em preto representa a parte inalterada dos diferentes fosfolipídios e a região em azul é exclusiva da molécula de fosfatidilglicerol e faz parte da “cabeça” polar. As cadeias alifáticas podem apresentar tamanhos variados ou algumas insaturações.

Apesar de a cardiolipina ser o fosfolipídio aniônico costumeiramente utilizado em sistemas modelo, pesquisas demonstram que este fosfolipídio pode formar, além da bicamada lipídica, outro arranjo supramolecular, conhecido como fase hexagonal invertida (GONZALVEZ; GOTTLIEB, 2007). Esta fase poderia expor a região apolar do fosfolipídio às EROs/ERNs. Assim, o PG também pode ser usado para alterar as propriedades físico-químicas da bicamada e também afetar a interação entre proteína e lipídio.

1.7 Hemeproteínas e Atividade Peroxidásica

O grupo prostético “heme” de várias proteínas e enzimas é um anel porfirínico coordenado através dos quatro nitrogênios tetrapirrólicos a um íon de ferro. O quinto e sexto ponto de coordenação do ferro são perpendiculares ao plano do heme. No quinto, o ferro coordena o nitrogênio imidazólico de uma histidina na peroxidase de raiz forte, citocromo *c* oxidase e mioglobina, o grupo tiólico de uma cisteína do citocromo P450, ou ainda tirosina na catalase. Em algumas proteínas a sexta posição de coordenação pode estar ocupada pela cadeia lateral de aminoácido ou livre para interagir com pequenas moléculas. Nos casos da hemoglobina e mioglobina, a sexta coordenação se dá com oxigênio molecular, daí a sua função de transporte ou estocagem, respectivamente.

A atividade peroxidásica de uma enzima pode ser compreendida como sua capacidade de oxidar compostos, utilizando peróxidos como co-substrato. Hemeproteínas, como hemoglobina, mioglobina, HRP e catalase, comumente apresentam atividade peroxidásica. Salienta-se que as hemeproteínas nas quais o ferro coordena-se com cinco ligantes de campo forte e seu sexto ponto de coordenação está livre, por exemplo, a mioglobina e HRP,

apresentam alta atividade peroxidásica ($10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 7,0, respectivamente) (HERSLETH *et al*, 2006). Com o sexto ponto de coordenação livre, o peróxido pode interagir com o ferro hemínico, o qual pode, por sua vez, doar elétrons ao peróxido, através de intermediários de alta valência, como o Composto I [Porfirina⁺(Fe^{IV}=O)] e o Composto II [Porfirina(Fe^{IV}=O)].

1.8 Citocromo *c*

Citocromo *c* é uma heme proteína periférica, presente no espaço intermembranas da mitocôndria, bastante conhecida como transportadora de elétrons do complexo III para o complexo IV durante a fosforilação oxidativa. Diferentemente da hemoglobina e mioglobina, o cit *c*, em seu estado nativo, coordena-se axialmente com o enxofre da metionina 80 (Met80) na sexta posição de coordenação do ferro. Por este motivo, a atividade peroxidásica do cit *c* é normalmente muito baixa ($0,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em pH 7.0) (RADI; TURRENS; FREEMAN, 1991).

Alterações no microambiente podem acarretar em alteração estrutural do cit *c* e aumento de sua atividade peroxidásica. A presença de fosfolipídios aniônicos pode levar à ruptura da coordenação do ferro hemínico com a Met80, sendo ela substituída pela cadeia lateral de outros aminoácidos (NANTES *et al*, 2000). O cit *c* apresenta aminoácidos de caráter básico em sua superfície e interage eletrostaticamente com membranas contendo fosfolipídios aniônicos, e através da inversão de um dos ésteres de ácido graxo, o qual se insere no centro hidrofóbico da proteína (RYTÖMAA; MUSTONEN; KINNUINEN, 1992; OTT *et al*, 2002). Nestes casos, o cit *c* pode passar de baixo spin com simetria rômica (spin $1/2$ $g_{\parallel} = 3.07$ e $g_{\perp} = 2.23$) para uma proteína, ainda de baixo spin, cuja rombicidade é menor que no primeiro caso (spin $1/2$ $g_1 = 2.902$, $g_2 = 2.225$, and $g_3 = 1.510$), indicando assim alteração no ligante axial presente na sexta posição de coordenação (NANTES *et al*, 2001; MUGNOL *et al*, 2008).

Foram identificadas duas regiões de interação do cit *c* com membranas, conhecidas como sítios A e C. A interação eletrostática que ocorre no sítio A é atribuída à presença das lisinas Lys72 e Lys73. Através do sítio C, a proteína pode interagir com fosfolipídios aniônicos protonado, possivelmente por pontes de hidrogênio. Tal capacidade foi explicada pela presença de uma Asp na posição 52 (RYTÖMAA; KINNUNEN, 1995; KAWAI *et al*, 2005).

Além de sua função como proteína transportadora de elétrons e de apresentar atividade peroxidásica, o cit *c* ainda está relacionado com o processo apoptótico. Quando liberado para

o citosol, o cit *c* interage com a proteína APAF-1 e com d-ATP para formar o apoptossomo. Este complexo ativa a pro-caspase 9, iniciando a cadeia de caspases que culmina com a morte celular (LIU *et al*, 1996).

Segundo Kagan (KAGAN *et al*, 2005) e colaboradores a atividade peroxidásica e a sinalização do processo apoptótico estão correlacionadas. Tendo em vista as características estruturais do cit *c*, esta proteína, enquanto interage com a cardiolipina, não pode ser liberada para o citosol. Pesquisas demonstram que o cit *c* após interagir com a membrana aniônica tem sua atividade peroxidásica aumentada relacionada com a oxidação dos ácidos graxos da cardiolipina. Uma vez oxidada, a interação da cardiolipina com a proteína é diminuída e, além disso, colabora com a liberação de outros fatores pró apoptóticos.

No citoplasma, o cit *c* pode interagir com a fosfatidilserina da membrana plasmática, oxidando este fosfolípido, o qual passa da monocamada interna para a externa e serve como sinal para que macrófagos iniciem a limpeza dos corpos apoptóticos (WILLIAMSON; SCHLEGEL, 2002; KAGAN *et al*, 2004). Além dos peróxidos disponíveis no meio, os próprios peróxidos de ésteres de ácidos graxos também servem como substrato para a atividade peroxidásica do cit *c*.

A atividade peroxidásica do cit *c* também pode ser aumentada por oxidação de alguns resíduos de Tyr e Trp, por exemplo, por ONOO⁻ (CASSINA *et al*, 2000). O ONOO⁻ contribui para atividade peroxidásica do cit *c* através de oxidação do Fe²⁺ (CASSINA *et al*, 2000) e conversão do Fe³⁺ em Composto II, com geração de NO₂[•] (AUGUSTO *et al*, 2002)

Conforme citado anteriormente, a mitocôndria é um sítio de produção de EROs através de escape de elétrons principalmente da semiquinona e do complexo I, gerando o O₂^{•-}. Além disso, a mitocôndria contém a óxido nítrico sintase (mNOS). Como o NO[•] é um radical livre, ele reage rapidamente com outros radicais atuando como seqüestrador de radicais peroxila e alcóxila, e assim contribui para o estresse oxidativo/nitrosativo. Por outro lado, a geração concomitante de ONOO⁻ por uma reação difusional com o entre NO[•] e oxigênio molecular dispara processos de danos oxidativos e nitrosativos (BRUNORI *et al*, 2004).

Devido a estas características o cit *c* foi escolhido nesta dissertação como alvo das EROs/ERNs formadas pelo SIN-1 e gerador de peróxidos lipídicos, e assim verificar o efeito protetor de AST neste sistema. Pretende-se assim, contribuir com novas informações sobre a capacidade antioxidante do carotenóide com radicais livres.

2. Objetivos

Avaliar a capacidade antioxidante da AST, utilizando como alvos vesículas compostas por PC apenas ou contendo também uma fração molar de 5% ou 10 % de PG, com o que se pretende alterar o microambiente no qual a AST está inserida. As vesículas serão desafiadas com NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ gerados pelo SIN-1, promotores dos danos oxidativos.

Uma vez que o pH pode afetar a permeabilidade e reatividade de EROs/ERNs, decidiu-se monitorar os produtos de lipoperoxidação, para estudar a atividade antioxidante do carotenóide em vários pHs (6,2; 6,8; 7,4 e 8,0). Observar o efeito causado pela AST no diâmetro destas membranas sintéticas, possivelmente afetando também a permeabilidade à EROs/ERNs é outra meta deste trabalho.

Verificar a atividade peroxidásica do cit *c* incorporado às vesículas, em função do efeito da composição da membrana e das espécies reativas sobre o cit *c*. Elucidar as alterações estruturais causadas no cit *c* e também das bicamadas lipídicas de diferentes composições pela exposição às espécies reativas produzidas pelo SIN-1.

Assim este trabalho visa contribuir com informações sobre o sistema oxidante formado pelo cit *c* incorporado a vesículas, na presença de EROs/ERNs geradas pelo SIN-1, já que este sistema mimetiza condições encontradas na membrana interna da mitocôndria e avaliar a eficiência antioxidante da AST quando submetida a diferentes condições de microambiente, já que *in vivo*, este carotenóide se encontra associado a membranas ou proteínas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação das Vesículas

Os lipossomos de fosfatidilcolina de gema de ovo (PC) (Sigma-Aldrich) foram preparados a partir de solução comercial deste fosfolípido, em clorofórmio. O solvente foi secado sob fluxo de nitrogênio e o filme de PC formado, mantido *overnight* sob vácuo para eliminar completamente o clorofórmio. Na preparação de lipossomos contendo Astaxantina (AST) (Sigma-Aldrich), antes de o clorofórmio ser evaporado, adicionou-se solução do pigmento também diluído em clorofórmio.

As quantidades de fosfolípido e carotenóide estipuladas foram tais que a preparação lipossomal final contivesse 7 mM de PC e 0,35 μ M de AST (0,5%). Os filmes foram hidratados com tampão fosfato 50 mM. O pH do tampão variou entre 6,2 e 8,0 com o intuito de se verificar o efeito do pH na estrutura da membrana e na interação com citocromo c (*cit c*) (Sigma-Aldrich) e AST. Nos demais experimentos, o pH do tampão foi fixado em 7,4.

Para formação de vesículas multilamelares, os frascos contendo o filme hidratado foram mantidos em banho de ultrassom, durante 15 min, à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão foi submetida ao processo de extrusão através de membranas de polycarbonato MilliPore 0,1 μ m, em um equipamento da Avanti Polar Lipids Inc..

Nos experimentos realizados para verificar o efeito de fosfolípidos aniônicos na atividade redox do sistema *cit c*/3-morfolinossidionimina-N-etilcarbamida (SIN-1) (Sigma-Aldrich), solução comercial de fosfatidilglicerol (PG) (Sigma-Aldrich) foi adicionada à de PC, para produzir filmes contendo os dois fosfolípidos, em concentrações finais de 0,35 e 0,7 mM de PG.

3.2 Sistemas Oxidantes

Lipossomos de todas as composições selecionadas (PC e PCPG), após serem preparados, foram incubados com *cit c* [Fe³⁺] e/ou SIN-1 por 82 min. Os volumes de SIN-1 e *cit c* foram ajustados de maneira que as concentrações finais de ambos fosse 150 μ M. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Os índices de lipoperoxidação foram avaliados através do teste clássico de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Após a incubação, finalizou-se a reação por adição de 20 μ L de solução de butil-hidroxitolueno (BHT) (Sigma-Aldrich) 2%, em etanol. Para

quantificar TBARS, as amostras foram incubadas a 100° C por 15 min, com uma solução 0.375% de ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma-Aldrich) em 0.25 M HCl (Merck) e 2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Após atingir a temperatura ambiente (aproximadamente 15 min), a absorbância da solução foi medida a 535 nm e interpolada numa curva-padrão constituída com o 1,1,2,2-tetraetóxiopropano como fonte de MDA (Sigma-Aldrich) (FRAGA; LEIBOVITZ; TAPPEL, 1988).

3.3 Efeito do pH sobre a atividade antioxidante da AST

Para observar o efeito do pH do meio sobre a capacidade antioxidante da AST, vesículas de composições selecionadas (PC e PCPG) foram submetidas a diferentes sistemas oxidativos/nitrosativos (cit *c*, SIN-1 e cit *c*/SIN-1). Os ensaios foram realizados nas cinco condições apresentadas na Tabela 1, utilizando as vesículas incubadas apenas com tampão, com KO₂ e superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) (ambos Sigma-Aldrich) como controles.

Os sistemas biomiméticos contendo cit *c*, SIN-1 e AST foram incubados durante 82 min a 37°C, em banho-maria, sendo neste período submetidos à incidência de luz apenas quando manipulados. As reações foram interrompidas por adição de uma solução 2% de BHT em etanol (BARROS *et al*, 2001). A lipoperoxidação foi estimada através da medida de TBARS, sendo que metade da alíquota foi separada previamente para medida de MDA por HPLC.

Tabela 1: Sistemas oxidantes nos ensaios de lipoperoxidação de lipossomos unilamelares PC (com ou sem PG) na presença (PC^{AST}) ou ausência (PC) de AST.

SISTEMAS	PC/PC ^{AST} (7 mM)	Tampão fosfato (50 mM) ^a	SIN-1 (1,75 mM)	Cit <i>c</i> (Fe ³⁺) (1,05 mM)	KO ₂ (14 mM) ^b	CuZnSOD (4,4 U/mL)
(1) Controle	500 µL	200 µL				
(2) SIN-1	500 µL	100 µL	100 µL			
(3) SIN-1 + cit.c[Fe ³⁺]	500 µL		100 µL	100 µL		
(4) KO ₂	500 µL	192 µL			8 µL	
(5) SIN-1 + SOD	500 µL		100 µL			100 µL
(6) KO ₂ + SOD	500 µL	92 µL			8 µL	100 µL
Concentrações Finais	PC = 5 mM	50 mM	SIN-1 = 150 µM	[cit <i>c</i> Fe ³⁺] = 150 µM	[KO ₂] = 0,15 µM	[SOD] = 0,6 U/mL

^aDiferentes ensaios foram realizados com tampões fosfato ajustados a quatro valores de pHs: 6,2; 6,8; 7,4 e 8,0.

^bSolução de KO₂ foi preparada em solução alcalina de NaOH 0,5 M e imediatamente adicionada à suspensão lipossomal.

3.4 Medida de MDA por HPLC

As análises de MDA por HPLC foram realizadas segundo Khoschorur *et alli* (2000). Resumidamente, o MDA produzido pela lipoperoxidação é derivatizado com TBA e o cromóforo-aduto é eluído isocraticamente através de uma coluna 0.39 x 30 cm μ Bondapack C₁₈ pela fase móvel composta pela mistura 65:35 de tampão fosfato 25 mM pH 6,5 e metanol 30% (grau cromatográfico) (Merck). Cerca de 50 μ L de amostra são necessários para a determinação. Esta alíquota foi misturada a 250 μ L de metanol 30% e mantidos por 15 min a 4° C em banho ultrassom para desagregação das vesículas e liberação do MDA gerado nos ensaios. Para a derivatização, foram adicionados 600 μ L de solução 0,4% de TBA (solubilizado em HCl 0,2 M) e 100 μ L de solução de BHT 0,5% (para interromper as subsequentes oxidações lipídicas). A reação foi mantida por 30 min a 95°C sob agitação constante (Thermomixer digital compacto, Eppendorf). Após filtração da amostra derivatizada final (filtros MilliPore), 20 μ L do filtrado foram injetados no sistema HPLC Shimadzu SCL 10A provido de bombas LC10AD e detectores fluorescência RF-10AXL e *diode array* SPDM10A. A quantificação do MDA das amostras foi realizada através da integração da área do pico do MDA (tempo de retenção médio ~ 6 min), e interpolada numa curva-padrão constituída com o 1,1,2,2-tetraetóxiopropano em metanol 30%.

3.5 Espectrofotometria UV-Visível

Com a finalidade de verificar alterações no cit *c* causadas pela interação entre proteína e membrana e pelo dano oxidativo ao cit *c* promovido pelas EROs/ERNs geradas pelo SIN-1, foram realizados ensaios de espectrofotometria UV/VIS, no aparelho Varian 50 Bio UV/VIS. Espectros de cit *c* 5 μ M incubados com 5 μ M ou 50 μ M de SIN-1 foram adquiridos na presença ou ausência de:

- PC (1mM);
- PG (10 mol% com relação à concentração de PC);
- AST (0,5 mol% com relação à concentração de PC)
- Em pressão atmosférica;
- Em atmosfera de N₂.

3.6 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) a Baixa Temperatura

Foram obtidos espectros de EPR do cit *c*, para verificar possíveis alterações no spin do ferro hemínico, em decorrência da formação de EROs/ERNs. Nestes testes, foi utilizada proteína solubilizada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), na presença de vesículas de PC (1 mM) ou PCPG (10 mol% em relação à concentração de PC). As espécies oxidantes foram geradas pela decomposição térmica de SIN-1 150 µM durante 82 min e na presença de *t*-butOOH 15 mM. Além disso, tendo em vista que a decomposição do SIN-1 envolve a transferência de elétron para o oxigênio dissolvido no meio formando assim o ânion radical superóxido (WAHL, 2004), experimentos de EPR foram também conduzidos após borbulhamento de N₂ durante 5 min na solução. Neste ensaio, os sistemas de estudo foram constituídos em atmosfera de nitrogênio (NANTES *et al*, 2000).

3.7 Dicroísmo Circular (CD)

Com a finalidade de avaliar possíveis alterações estruturais no cit *c* causadas por interação com a membrana, ensaios de CD foram realizados com solução 10 µM de cit *c* (em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4), contendo suspensão lipossomal de PC (1 mM) e PG (10 mol% com relação à concentração de PC). Cit *c* na mesma concentração foi incubado em tampão fosfato com SIN-1 durante 82 min, com a finalidade de acompanhar o efeito das espécies reativas sobre as estruturas secundária/terciária da proteína. Nestes experimentos foi utilizado o espectropolarímetro Jasco J-720.

3.8 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para verificar se a AST, na concentração utilizada nos ensaios de lipoperoxidação, causa alterações nos lipossomos, foram realizados experimentos de DLS, que verifica a difusão mútua de partículas no meio em dispersão. Neste ensaio, suspensões de vesículas de PC, PCPG 5% e PCPG 10%, com e sem AST, foram diluídas em tampão fosfato 50 mM. O DLS é uma técnica que utiliza um feixe de *laser*, num comprimento de onda de aproximadamente 590 nm, o qual é colimado no centro da cubeta. O detector é posicionado em um ângulo de 90° com relação à direção do feixe de *laser*. Um computador registra a luz espalhada, correlacionando o espalhamento de luz com o tempo de difusão da partícula em

questão. O diâmetro da partícula é inversamente proporcional ao tempo de difusão e, assim, o computador pode calcular o diâmetro das vesículas.

3.9 Geração de NO^\bullet por SIN-1

Além da determinação dos índices de peroxidação lipídica induzida por SIN-1, foi analisada também a liberação de NO^\bullet , utilizando-se o marcador fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM), adquirido através da empresa Molecular Probes (WAHL, 2004). Estes ensaios foram realizados com a finalidade de observar se a presença de cit *c* 0,15 mM afetaria a produção de NO^\bullet , gerado através da decomposição térmica de SIN-1, no meio.

O DAF-FM é um composto que reage com o NO^\bullet com alta especificidade. O produto da reação é um derivado do benzotriazol (Figura 9) que, excitado em um comprimento de onda de 495 nm ($\lambda_{\text{exc.}}$), emite fluorescência com pico em 515 nm. Esse marcador pode detectar NO^\bullet em concentrações de 3 nM, conforme indicações da Molecular Probes.

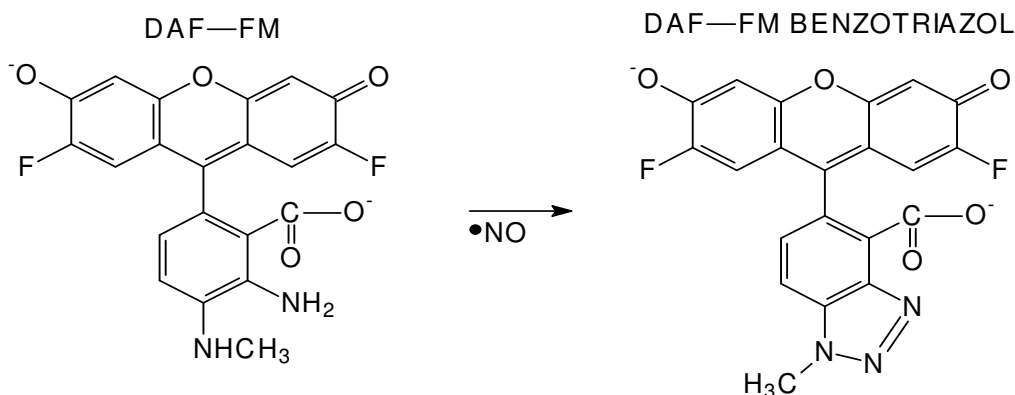


Figura 9 – Reação do 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM) com o óxido nítrico (NO^\bullet) formando DAF-FM benzotriazol. (www.probes.com)

3.10 Determinação de Lipoperoxidação por Fluorescência.

Outros ensaios de lipoperoxidação foram realizados com o composto fluorescente C_{11} -BODIPY^{581/591} (Figura 10) (Molecular Probes). Este fluoróforo é anfipático, pois tem uma cadeia de ácido undecanóico e se mantém próximo à interface formada pela membrana e o

tampão. Quando reage com radicais ROO^\bullet ou RO^\bullet , o $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ emite fluorescência em um comprimento de onda de aproximadamente 520 nm (λ_{exc} de 485 nm). Sua emissão original ocorre a 600 nm (λ_{exc} de 580 nm), mudando portanto sua emissão do vermelho para o verde (DRUMMEN *et al*, 2001).

Para a realização destes experimentos, adicionou-se $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ diluído em DMSO às suspensões lipossomais (PC 1 mM) de maneira a atingir uma concentração final de 10 nM do fluoróforo. A fluorescência foi medida no espectrofluorímetro Hitachi F-4010, com controle de temperatura, mantido a 37°C. Foi registrada a queda na fluorescência em 600 nm, durante 7000 s. Em tempos demarcados, adicionou-se os seguintes compostos:

- Cit *c* (150 μM) após 300 s;
- Tampão (no controle) ou SIN-1 150 μM após 600 s;
- *t*-butOOH 150 μM após 3600 s;

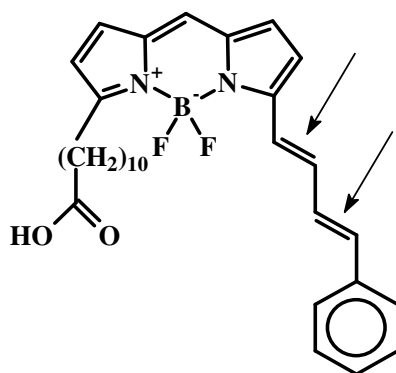


Figura 10 – Estrutura do $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$. As setas indicam as duplas ligações onde se adicionam os radicais peroxila e alcoxila.
(www.probes.com)

3.11 Análise Estatística

Os dados estatísticos referentes a, no mínimo, três experimentos reprodutíveis, foram analisados de acordo com o teste t-Student's com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Lipoperoxidação

Experimentos de peroxidação lipídica, avaliada pelo teste de TBARS, demonstraram que o índice de lipoperoxidação na presença ou ausência do SIN-1 foi semelhante ao controle em todas as composições de membranas (PC; PCPG5% e PCPG10%). O cit *c*, em todos os ensaios, foi capaz de aumentar os índices de TBARS e a presença da AST inibiu estes índices.

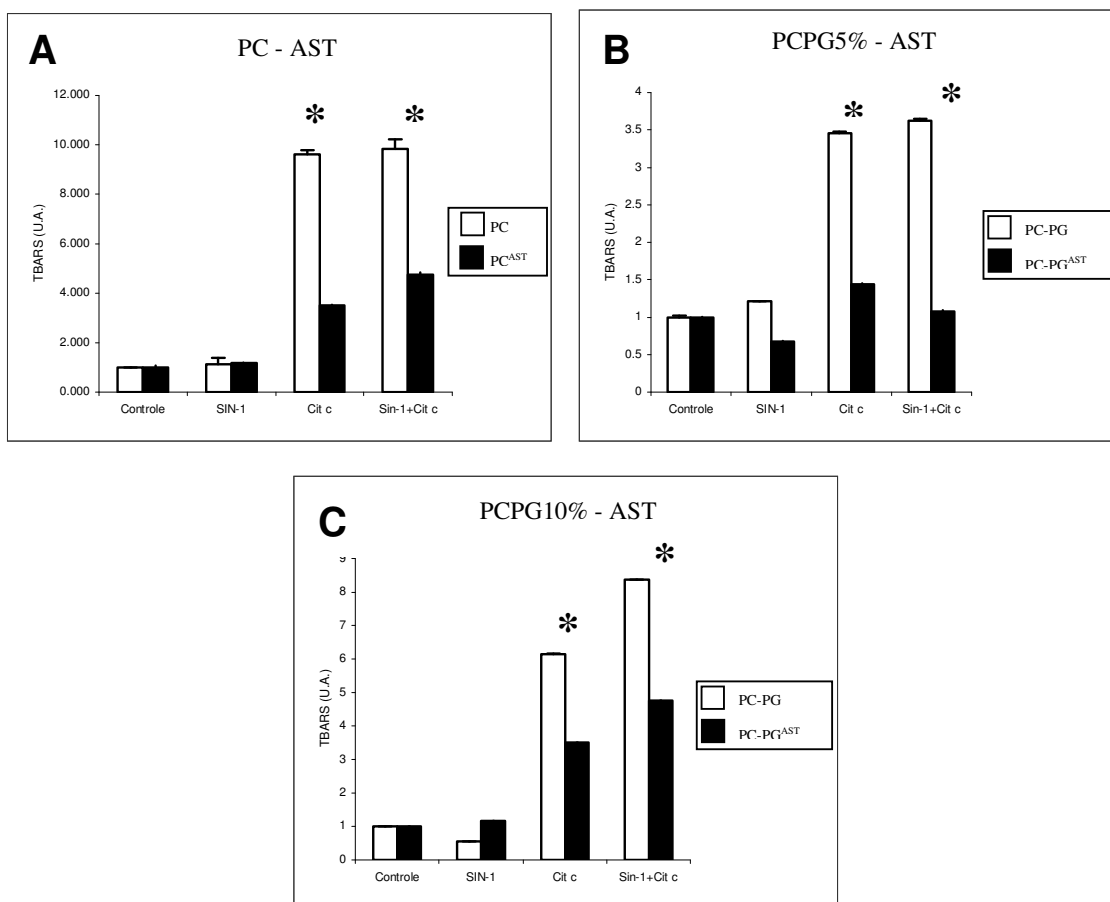


Figura 11 – Concentrações relativas de TBARS em lipossomos unilamelares oxidados por diferentes sistemas, na presença ou ausência de AST. (A) Vesículas formadas por PC (5 mM); (B) PC (5 mM) PG 5% ; (C) PC (5 mM) PG 10%.

* $p < 0,05$; $n > 3$

Quando incubados juntos, SIN-1 e cit *c*, mantiveram os mesmos índices de peroxidação lipídica, na presença de membranas de PC e PCPG5% (Figura 11 (A) e (B)). Na presença de PCPG10% (Figura 11 (C)), porém, observa-se que a lipoperoxidação causada pelo cit *c* foi intensificada (2 x) com a adição de SIN-1. Em todos os sistemas de oxidação que

havia cit *c*, a AST apresentou capacidade antioxidante visto que os índices de TBARS estão próximos ao controle, com exceção daqueles realizados com membrana de PCPG10%, nos quais a AST diminuiu os índices de lipoperoxidação pela metade com relação às membranas sem o pigmento.

4.2 Efeito da alteração do microambiente na atividade antioxidante da AST

O efeito da alteração do microambiente na capacidade antioxidante da AST foi avaliado através de medida de níveis de peroxidação lipídica das vesículas incorporadas ou não com o carotenóide, causado pelos agentes oxidantes gerados pelo SIN-1, cit *c* e KO_2 em diferentes pHs. Para tal, utilizou-se medidas de TBARS e de MDA por HPLC.

Os testes TBARS (Figuras 12, 13 e 14) mostram que o cit *c* (Cit *c* [Fe^{3+}]) promoveu aumento significativo dos níveis de lipoperoxidação, mostrando ser este o oxidante mais lesivo para as membranas estudadas. Por outro lado, foi contra o sistema SIN-1 e cit *c* [Fe^{3+}] que a AST apresentou sua maior capacidade antioxidante, exceto nos ensaios realizados em pH 6,2 e 6,8 com lipossomos formados por PC e 5% de PG, nos quais uma aparente atividade pró-oxidante foi observada. Nos ensaios elaborados com PC e 10% de PG, a AST apresentou a mesma atividade pró-oxidante nos sistemas acidificados e mesmo em pH 7,4.

Os demais sistemas oxidantes resultaram em variações menores do índice de peroxidação, próximo do controle. A AST demonstrou significativa ação antioxidante, embora uma relativa atividade pró-oxidante da AST fosse identificada em sistemas mais acidificados (pH 6,2, principalmente). Estes dados estão dispostos na Figura 14 (A) e (B), nos sistemas contendo SIN-1, KO_2 , SIN-1 + SOD e KO_2 + SOD. O pH do meio e a alteração da composição lipídica afetaram a capacidade antioxidante do carotenóide.

Os resultados da medida de MDA por HPLC (Figuras 15, 16 e 17) confirmam o perfil de atividade anti/pró-oxidante da AST verificada no ensaio de TBARS. A medida de MDA por HPLC é uma técnica mais recomendada pela literatura, uma vez que os compostos formados são separados e apenas o aduto de MDA é detectado. A crítica ao TBARS deve-se ao fato de que outros produtos de lipoperoxidação também reagem com TBA.

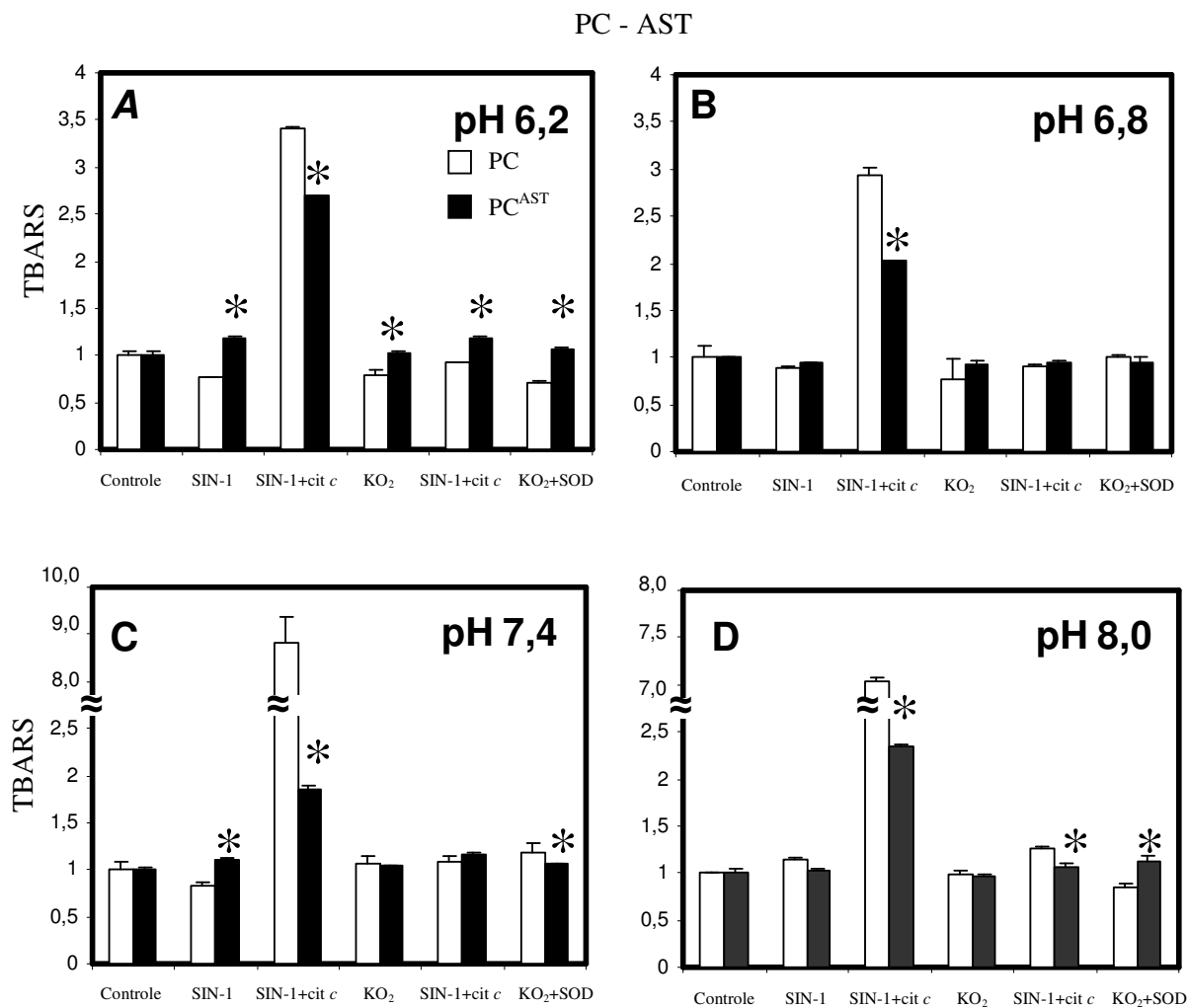


Figura 12 – Concentrações relativas de TBARS em lipossomos unilamelares de PC 5 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PC^{AST}) ou ausência (PC) de AST (25 μM) em pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* p < 0,05; n>3

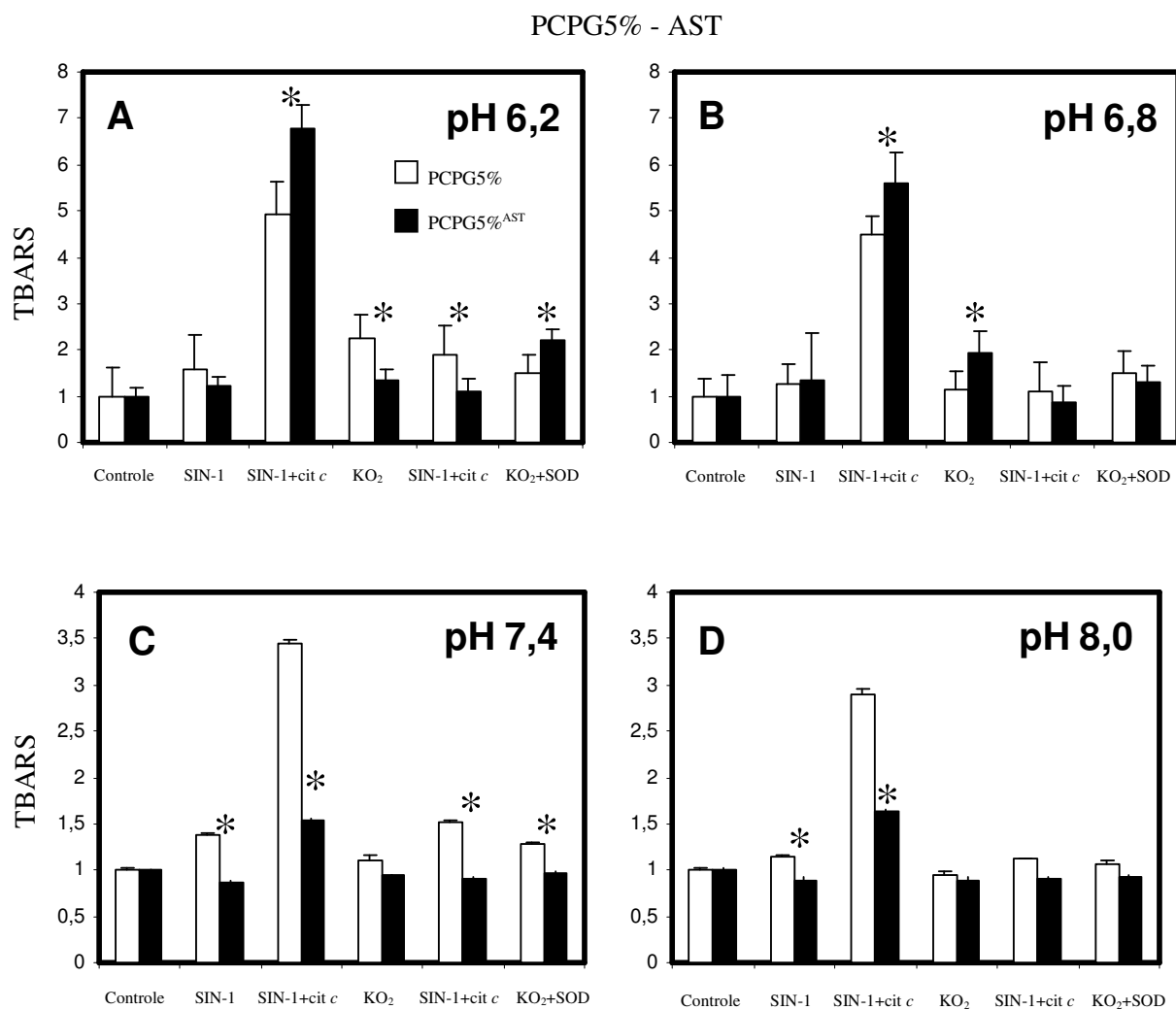


Figura 13 - Concentrações relativas de TBARS em lipossomos unilamelares de PC 5 mM contendo PG 0,25 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PCPG_{5%}^{AST}) ou ausência (PCPG_{5%}) de AST (25 μM) em pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* p < 0,05; n>3

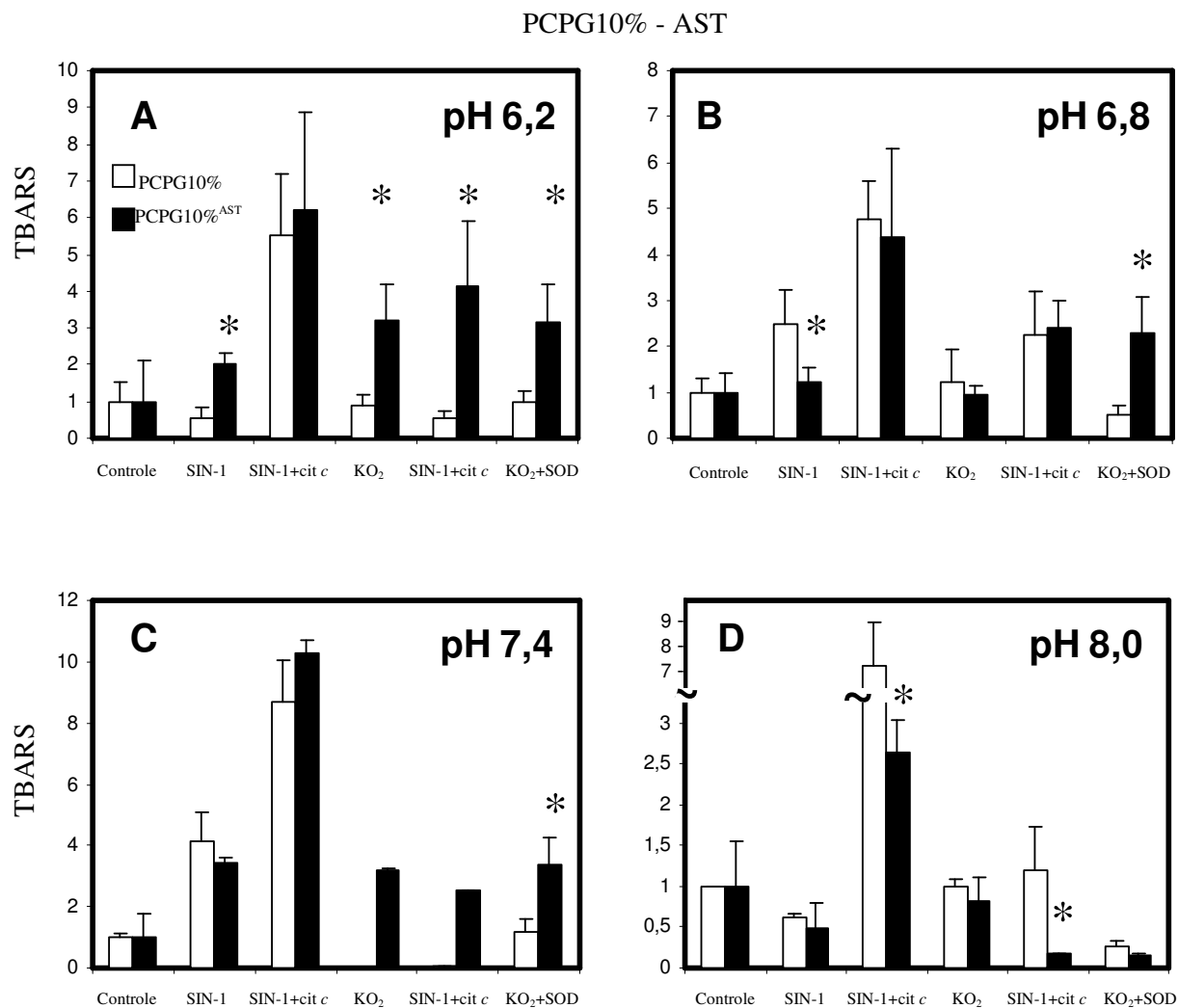


Figura 14 - Concentrações relativas (U.A.) de TBARS em lipossomos unilamelares de PC 5 mM contendo PG 0,5 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PCPG_{10%}^{AST}) ou ausência (PCPG_{10%}) de AST (25 μM) em pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* p < 0,05; n>3

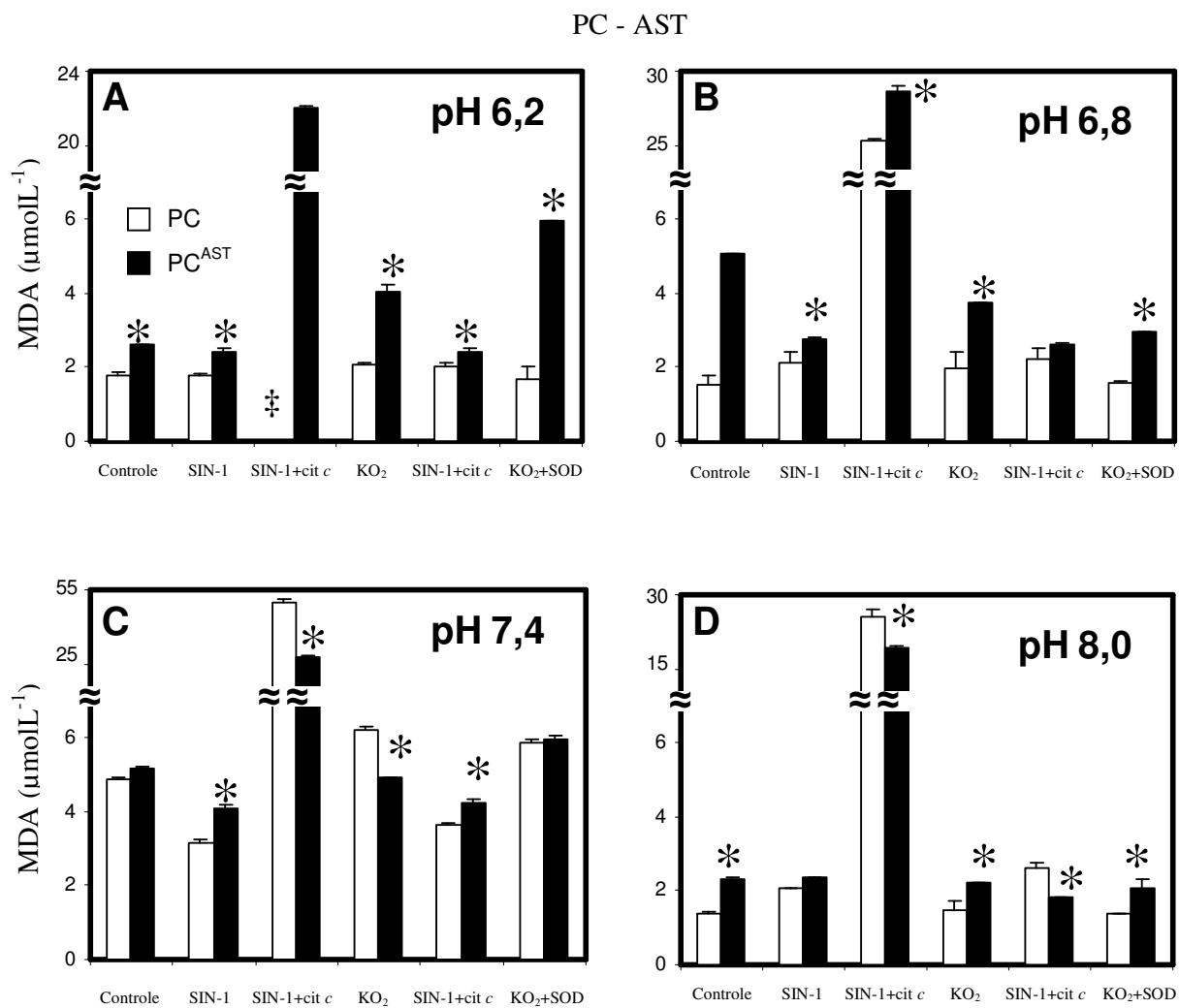


Figura 15 – Concentrações de MDA (μmolL^{-1}) em lipossomos unilamelares de PC 5 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PC^{AST}) ou ausência (PC) de AST (25 μM) em pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* $p < 0,05$; $n > 3$

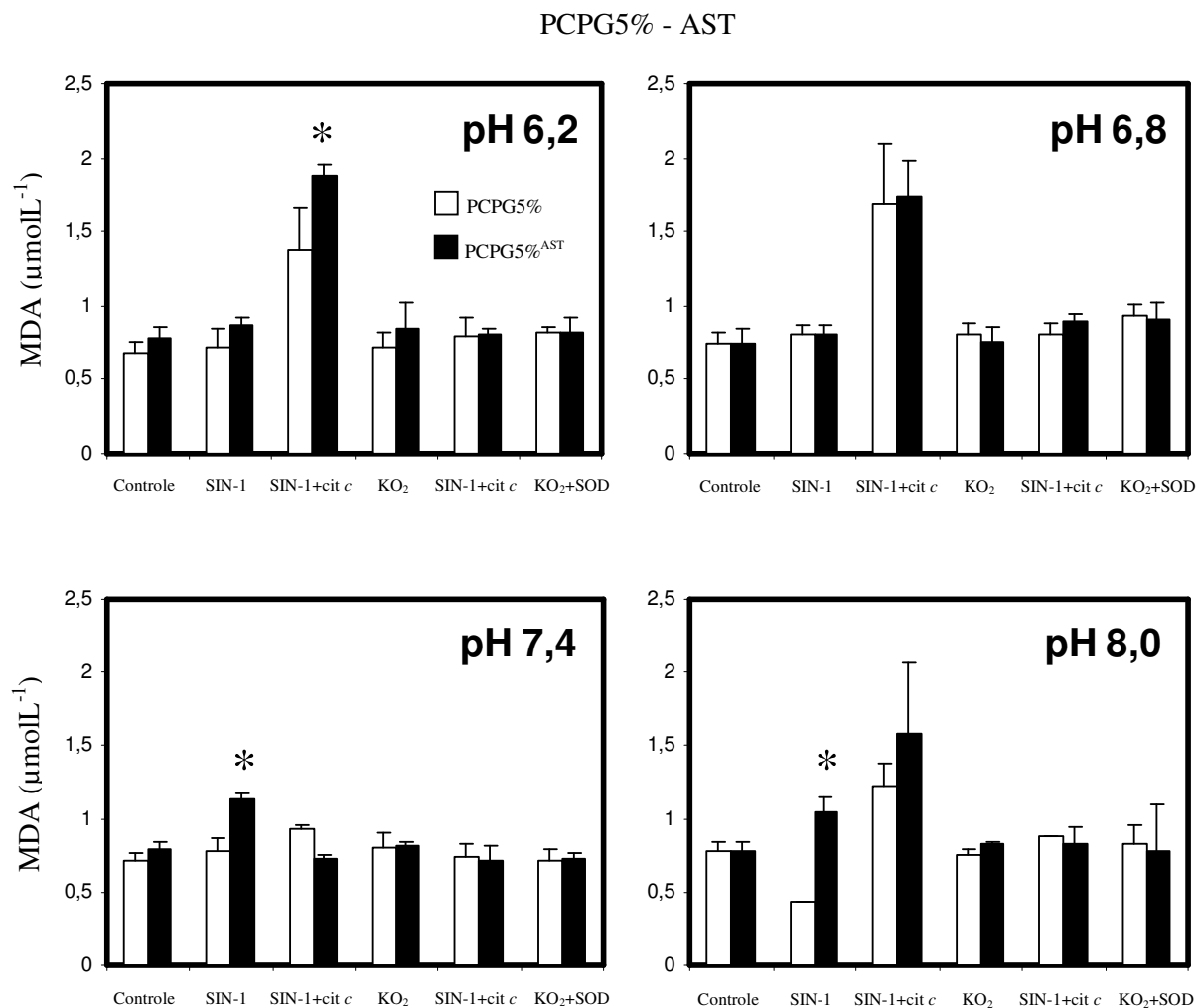


Figura 16 - Concentrações de MDA (μmolL^{-1}) em lipossomos unilamelares de PC 5 mM contendo PG 0,25 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PCPG5%^{AST}) ou ausência (PCPG5%) de AST (25 μM) em: pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* $p < 0,05$; $n > 3$

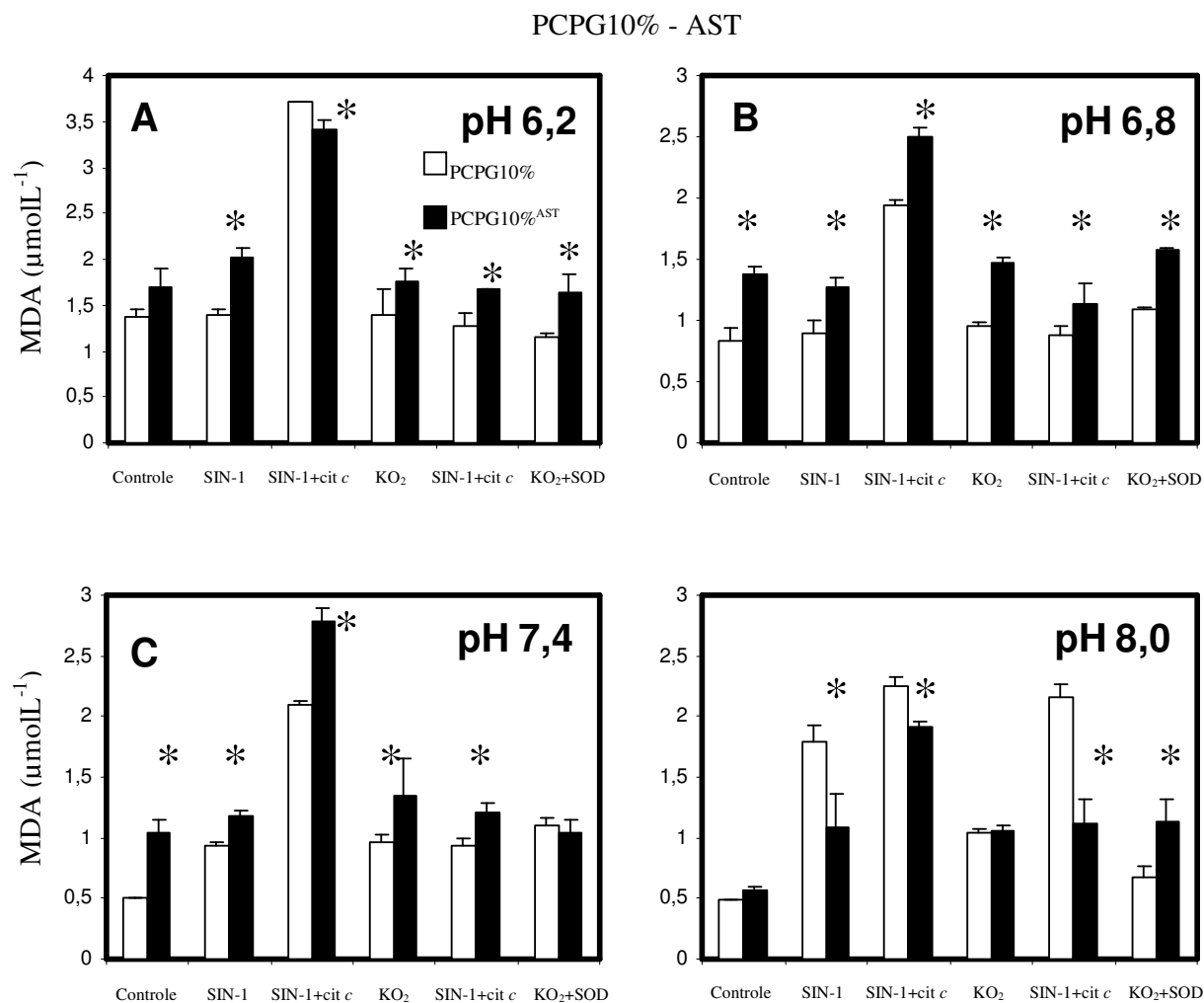


Figura 17 – Concentrações MDA (μmolL^{-1}) em lipossomos unilamelares de PC 5 mM contendo PG 0,5 mM, oxidados por diferentes sistemas, na presença (PCPGL10%^{AST}) ou ausência (PCPGL10%) de AST (25 μM) em pHs (A) 6,2; (B) 6,8; (C) 7,4 e (D) 8,0.

* $p < 0,05$; $n > 3$

4.3 Análises espectrofotométricas UV/Visível

Ensaios de espectroscopia UV/VIS foram elaborados para verificar os efeitos da interação entre a bicamada lipídica e o cit *c*. A Figura 18 (A e B) mostra o espectro do cit *c* com duas bandas de interesse para estudar sua atividade peroxidásica: a banda Soret (aproximadamente 410 nm) e a banda Q (aproximadamente 540 nm) (MAUREN *et alli*, 2004). Como é possível visualizar na Figura 18, a banda Soret não é afetada pela diferença de composição da vesícula (A) PC 1,5 mM e (B) PC 1,5 mM e PG 5 mol%, mas a banda Q é intensificada 10 minutos após adição da proteína no meio lipossomal.

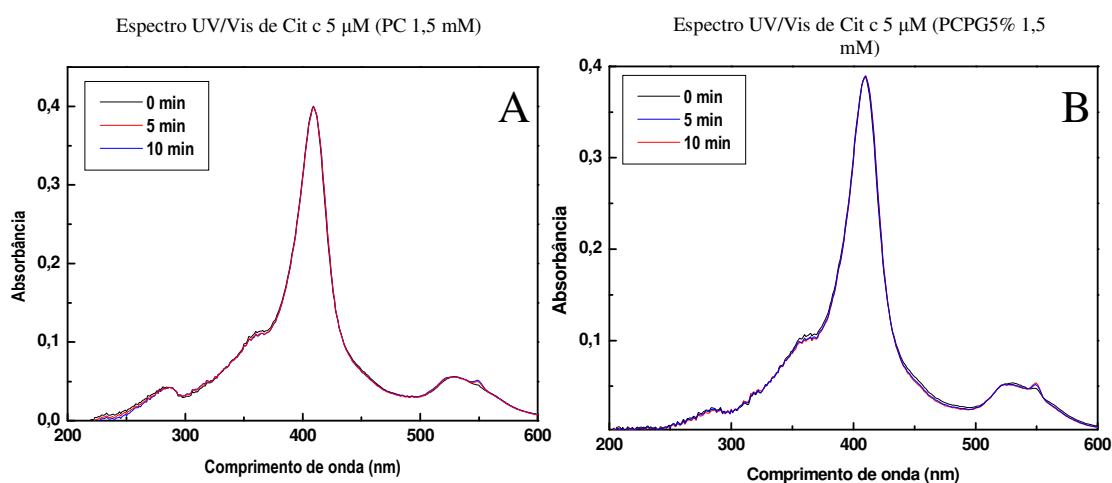


Figura 18 – Espectros UV-VIS em 0, 5 e 10 min do cit *c* (5 μM) em suspensões lipossomais de: (A) PC 1,5 mM, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4; (B) PCPG (5% em mols), em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4.

A Figura 19 apresenta o espectro de suspensões lipossomais formada por (A) 1,5 mM de PC e 0,5%, em mol, de AST e (B) 1,5 mM de PC, PG 5% em mol e AST 0,5% em mol. É possível verificar, nestes espectros a banda de absorvância do carotenóide em $\lambda = 483$ nm (BARROS *et alli*, 2001).

Os espectros do cit *c* em suspensões de vesículas formadas por PC + AST e PCPG5% + AST são apresentados na Figura 20 (A) e (B). Nestes espectros não é possível verificar alterações na banda Q, pois esta foi acobertada pela absorvância do carotenóide, porém, é possível verificar na Figura 20 (A), uma pequena queda reprodutível no pico de absorvância da AST (uma diferença de 0,01125).

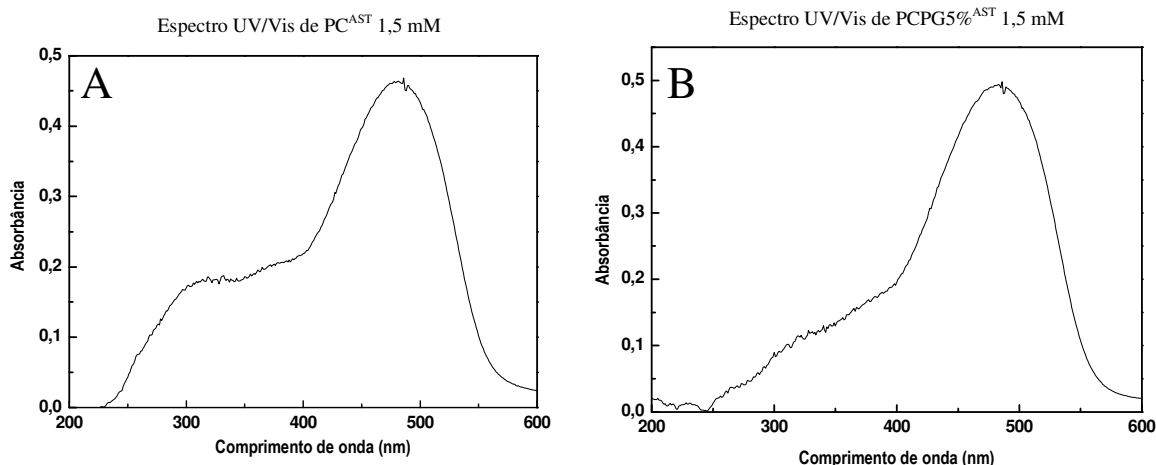


Figura 19 – Espectros UV-VIS das suspensões lipossomais de: (A) PC 1,5 mM contendo 0,5% (em mols) de AST, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4; (B) PC e PG (5% em mols) contendo 0,5% (em mols) de AST, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4.

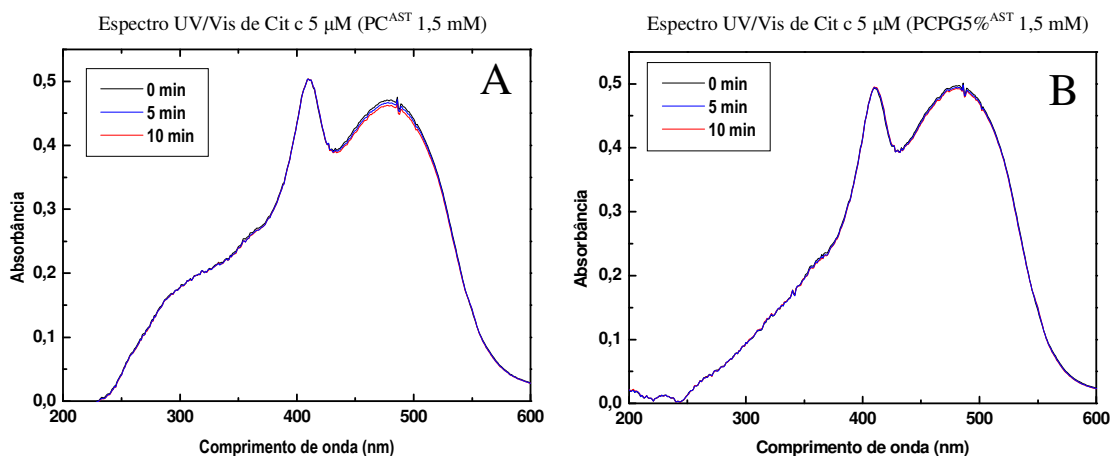


Figura 20 – Espectros UV-VIS em 0, 5 e 10 min do cit *c* (5 μ M) em suspensões lipossomais de: (A) PC 1,5 mM contendo 0,5% (em mols) de AST, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4; (B) PC e PG (5% em mols) contendo 0,5% (em mols) de AST, em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4.

Novos espectros do cit *c* foram adquiridos após a adição de 50 μ M de SIN-1 para verificar a ação de peroxinitrito na proteína. Neste ensaio foram realizadas duas adições da solução estoque de SIN-1 nos tempos $t=0$ e $t=20$ min (Figura 21). O painel (A) contém o espectro de cit *c* na presença de lipossomos de PC 1,5 mM e o (B) representa o espectro da mesma proteína na presença de lipossomos de PCPG5%. Conforme pode ser observado, o SIN-1 absorve luz em comprimento de onda próximo a 300 nm. Ainda é possível verificar as diferenças causadas na absorbância da banda Soret e na banda Q, sendo que ambas diminuíram de intensidade. A diminuição da banda Q reflete alterações no estado de oxidação do ferro no grupamento heme, que neste caso deve ter sofrido oxidação, passando do estado Fe(II) para Fe (III) (MAUREN *et alli*, 2003). Este efeito pode ser visto nos dois espectros.

Nota-se também que é possível acompanhar a cinética de decomposição do SIN-1 através do aumento na absorbância na banda de $\lambda = 300$ nm.

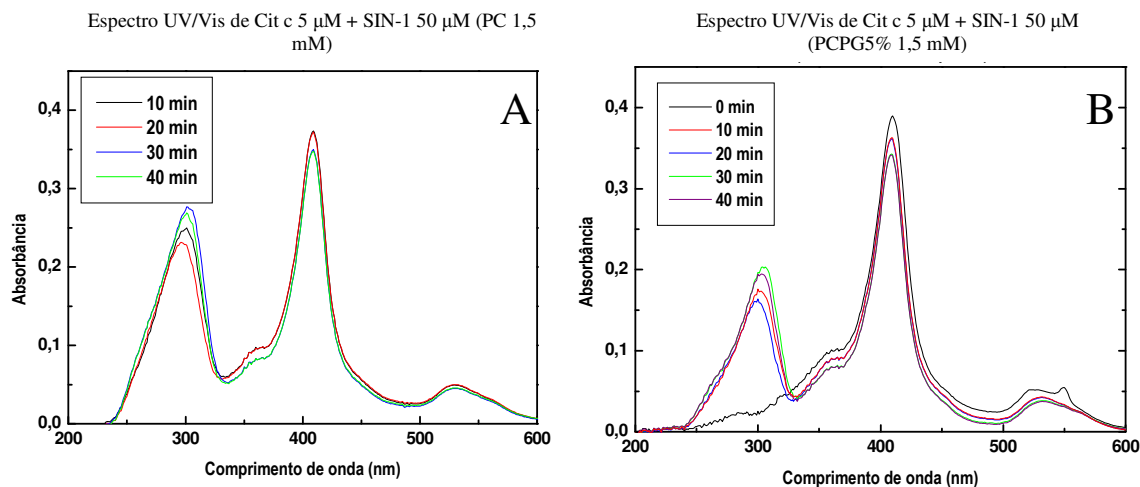


Figura 21 – Espectros UV-VIS em 0, 10, 20, 30 e 40 min do cit *c* (5 μ M) modificado por adições sequenciais de SIN-1 (50 μ M) nos tempos $t = 0$ min e $t = 20$ min em suspensões lipossomais de: (A) PC 1,5 mM, em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4; (B) PC e PG (5% em mols), em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4.

Da mesma forma, foram obtidos espectros do cit *c* em suspensão lipossomal (Figura 22) mostrando alteração apenas na presença de 0,5% em mol da xantofila na vesícula. Os painéis A e B representam experimentos realizados nas mesmas condições descritas para obtenção dos espectros anteriores.

A degradação do carotenóide evidenciada pela diminuição na absorbância do pico em 483 nm parece ser mais pronunciada que o descolorimento do cit *c*. Não é possível verificar diferenças atribuíveis à associação da proteína com as membranas de diferentes composições, visto que a banda Q não é evidente, tal como mostrado nas Figuras 20 A e B.

O espectro do cit *c* 150 μ M foi obtido antes (linha preta) e após (linha cinza) incubação com SIN-1 mesma concentração, em cubeta de caminho óptico de 1 mm (Figura 23). Conforme já citado, não foram visualizadas importantes alterações estruturais na proteína, apenas pequena redução da banda 550 nm. Porém ao avaliar exclusivamente o pico de 695 nm em cela de caminho óptico de 1 cm, uma diminuição na absorbância é observada, evidenciando que a coordenação com a Met 80 foi rompida (Figura 23, detalhe) (MUGNOL *et al*, 2008).

Por fim, foi obtido espectro do SIN-1 em solução tamponada com fosfato 50 mM pH 7,4 e na presença de lipossomos de PC 1,5 mM para verificar o aumento de absorbância e o desvio do pico causado pela presença das vesículas (Figura 24).

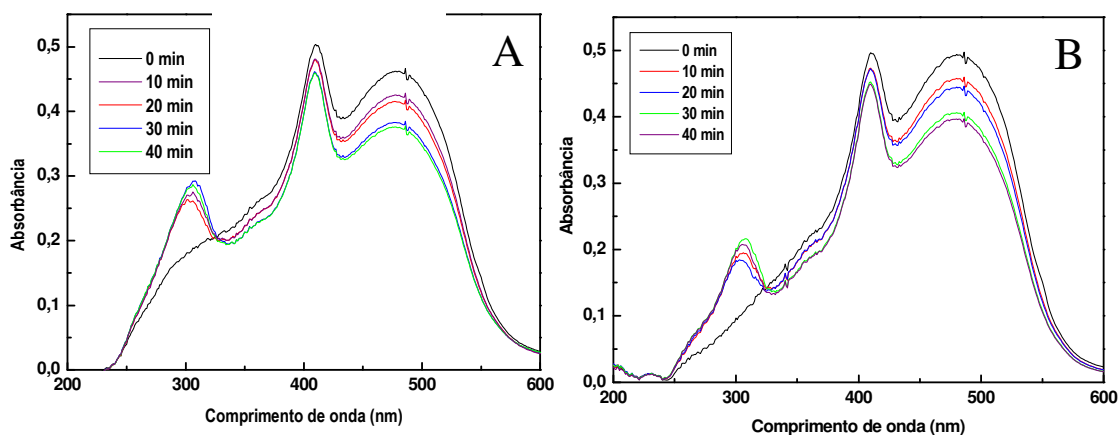


Figura 22 – Espectros UV-VIS em 0, 10, 20, 30 e 40 min do cit.c ($5 \mu\text{M}$) modificado por adições sequenciais de SIN-1 ($50 \mu\text{M}$) nos tempos $t = 0 \text{ min}$ e $t = 20 \text{ min}$ em suspensões lipossomais de: (A) PC $1,5 \text{ mM}$, contendo $0,5\%$ (em mols) de AST, em tampão fosfato 50 mM , pH $7,4$; (B) PC e PG (5% em mols), contendo $0,5\%$ (em mols) de AST, em tampão fosfato 50 mM , pH $7,4$.

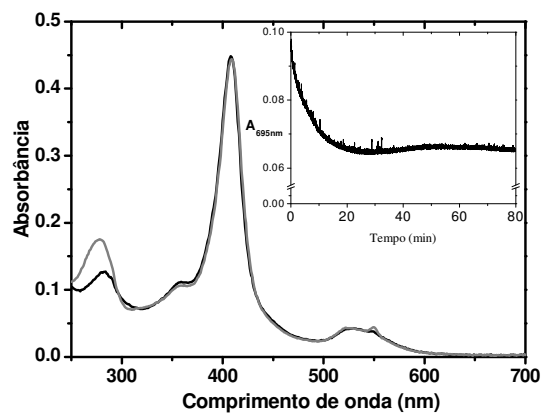


Figura 23 – Espectros de cit *c* ($150 \mu\text{M}$) em solução de tampão fosfato (50 mM , pH $7,4$) incubado com SIN-1 ($150 \mu\text{M}$). Em detalhe, cinética de absorbância acompanhada em 695 nm .

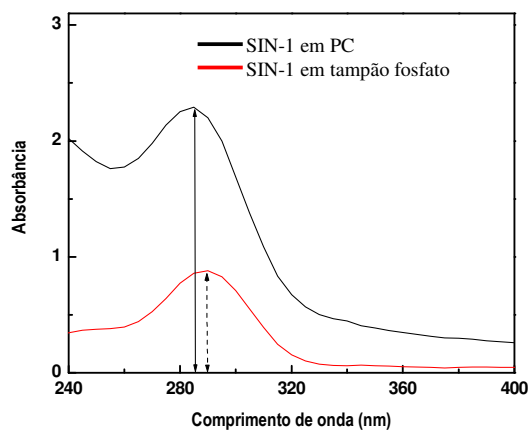


Figura 24 – Espectros de SIN-1 $50 \mu\text{M}$ em lipossomos de PC $1,5 \text{ mM}$ e em tampão fosfato 50 mM , pH $7,4$.

4.4 Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Sistema Cit *c*/SIN-1 em Baixa Temperatura (EPR)

Estes experimentos foram realizados com a finalidade de verificar possíveis alterações no estado spin do ferro hemínico do cit *c* quando incubado com 150 μM de SIN-1 a 37°C. A linha “a”, da Figura 25, mostra o espectro de EPR do cit *c* em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. Este espectro corresponde à forma nativa do cit *c* Fe^{3+} e apresenta baixo spin com simetria rômbrica (NANTES *et alli*, 2000). Na mesma Figura, a linha “b” caracteriza o espectro do cit *c* após 82 min de incubação com SIN-1 e a linha “c” a simulação feita para calcular os valores de *g* referentes à linha “b”. Neste espectro é possível observar duas populações da proteína. Uma delas trata-se da forma nativa ($g_1= 3,04$ e $g_2=2,23$) de baixo spin com simetria rômbrica e a outra também com baixo spin mas com rombicidade menor que a da primeira população ($g_1= 2,736$, $g_2= 2,465$ e $g_3=2,058$).

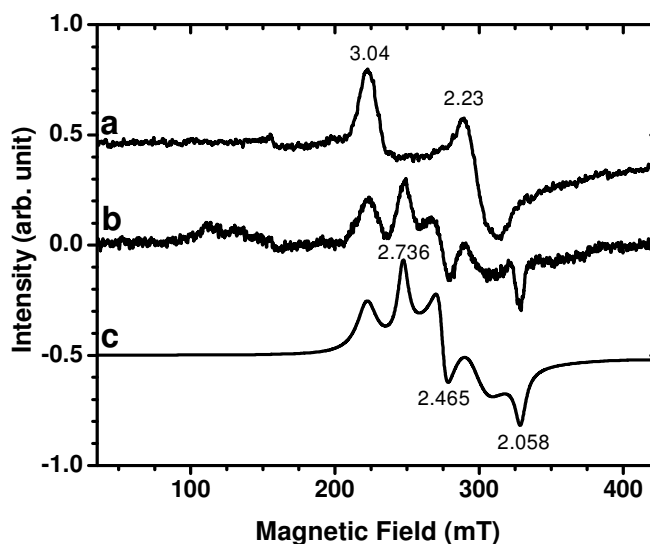


Figura 25 – Espectros de EPR do cit *c* 150 μM em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, na ausência (linha “a”) ou na presença do gerador de peróxinitrito (linha “b”) SIN-1 150 μM , após 60 min de incubação a 37°C. A linha “c” é a simulação elaborada para cálculo dos valores de *g*.

A Figura 26 (A) apresenta os espectros de EPR do ferro hemínico do cit *c* tratados com SIN-1 na presença e ausência de lipossomos de PC ou PCPG10% ou de *tert*-butil-hidroperóxido. Este sistema foi elaborado sob pressão atmosférica (normóxia). Ainda na Figura 26 (B) estão apresentados os espectros de EPR de sistemas semelhantes ao descrito anteriormente, diferindo apenas no fato de que este ensaio foi realizado sob atmosfera de

nitrogênio. O gás nitrogênio foi também borbulhado previamente no tampão para garantir condição de hipóxia ao experimento.

As linhas “a” na Figura 26 (A) e (B) referem-se ao sinal do ferro hemínico após tratar o cit *c* (em solução) com SIN-1 durante 82 min na presença ou ausência de oxigênio, respectivamente. Neste espectro é possível verificar um sinal de maior intensidade do ferro hemínico no sistema sob hipóxia. As linhas “c” correspondem ao sinal do ferro hemínico após o tratamento com SIN-1 na presença de vesículas de PC. De maneira semelhante, estes ensaios também apresentaram sinal mais intenso na condição de hipóxia. As linhas “e” mostram os espectros de EPR do ferro hemínico de cit *c* em condições idênticas à anterior, porém na presença de lipossomos de PCPG10%.

As linhas “b”, “d” e “f” correspondem às mesmas condições citadas nas linhas “a”, “c” e “e”, respectivamente, mas imediatamente após a adição de *tert*-butil-hidroperóxido. Sob situação de normóxia, os espectros “b”, “d” e “f” apresentam três populações, uma nativa (mais pronunciada no espectro “f”), como já descrita anteriormente, outra de alto spin ($g = 6,0$) e por último uma forma oxidada ($g = 4,3$). Após o tratamento com *tert*-butil-hidroperóxido, a forma de baixo spin com simetria menos rômbrica desaparece. Em condição de hipóxia, além da forma de baixo spin com simetria menos rômbrica a forma nativa nestes espectros também desaparece após o tratamento com *tert*-butil-hidroperóxido.

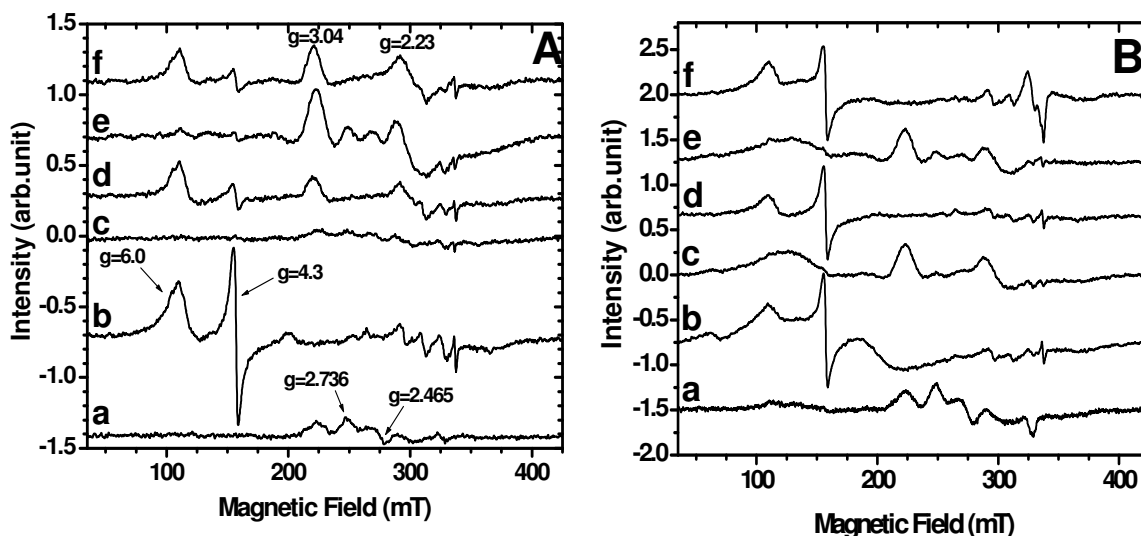


Figura 26 – Espectros de EPR do cit *c* 150 μ M em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, após 82 min de incubação a 37°C na presença do gerador de peroxinitrito, SIN-1 150 μ M (linhas “a” e “b”), e de vesículas lipossomais de PC 1,5 mM (linhas “c” e “d”) ou PCPGL10% (linhas “e” e “f”) e de *tert*-butOOH 15 mM (linhas “b”, “d” e “f”). (A) na presença de O₂ (normóxia); (B) saturada com N₂ (hipóxia).

4.5 Espectros de dicroísmo circular (CD)

O espectro de dicroísmo circular do cit *c* foi obtido na presença de vesículas de PC e PCPG10%, com a finalidade de verificar se as diferentes composições da vesícula afetam a proteína. Neste procedimento foram avaliados as alterações dicroicas em comprimentos de onda da faixa do UV distante (190 a 260 nm), do UV próximo (250 a 350 nm) e da banda Soret (390 a 450 nm), indicadas anteriormente na Figura 9, itens A, B e C respectivamente.

Cada painel da Figura 27 apresenta três espectros, onde a linha preta representa o espectro de CD do cit *c* nativo em tampão fosfato 20 mM. A linha cinza representa o espectro do cit *c* na presença de lipossomos de PC e a linha tracejada, PCPG10%.

Nos espectros de UV distante (190 nm a 260 nm), Figura 27 (A), são perceptíveis alterações nos picos em 208 nm e 222 nm, na presença do lipossomo PCPG10%. A banda em 208 nm do cit *c* nativo, que apresentava menor intensidade que a banda 222 nm, quando em vesícula aniônica, revela diferença menor entre os citados picos. O espectro de UV distante do cit *c* na presença de vesículas de PC é quase idêntico ao do cit *c* nativo.

Realizou-se uma deconvolução do espectro UV distante, utilizando-se o *software* k2d, disponível no *site* da *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>). Não foram observadas alterações nas porcentagens de estruturas secundárias da proteína (α - hélice = 31%; folhas - β = 10%; estrutura randômica = 59%) na presença do lipossomo com fosfolipídio aniônico (ANDRADE *et al.*, 1993).

Observando-se os espectros de UV próximo (250 nm a 350 nm) (Figura 27 (B)), percebe-se mudanças sutis nos picos em 282 nm e 288 nm, e alteração das bandas próximas a 260 nm. Aqui, novamente, os espectros correspondentes ao cit *c* nativo na presença de vesículas de PC, são quase idênticos, com o mínimo de 288 nm mais intenso que o pico de 282 nm. Com as vesículas de PCPG10% a banda de 288 nm diminuiu de intensidade, aproximando-se do valor do pico em 282 nm (SINIBALDI *et alli*, 2005).

Ao verificar o espectro da banda Soret (390 nm a 450 nm) (Figura 27 (C)), percebe-se que o pico em 416 nm é 50% maior que o pico em 405 nm. Quando o espectro Soret de cit *c* foi obtido em presença de PC, houve uma diminuição sutil no máximo em 405 nm. A presença do fosfolipídio aniônico fez com que os dois picos, em 405 nm e 416 nm, diminuíssem de intensidade.

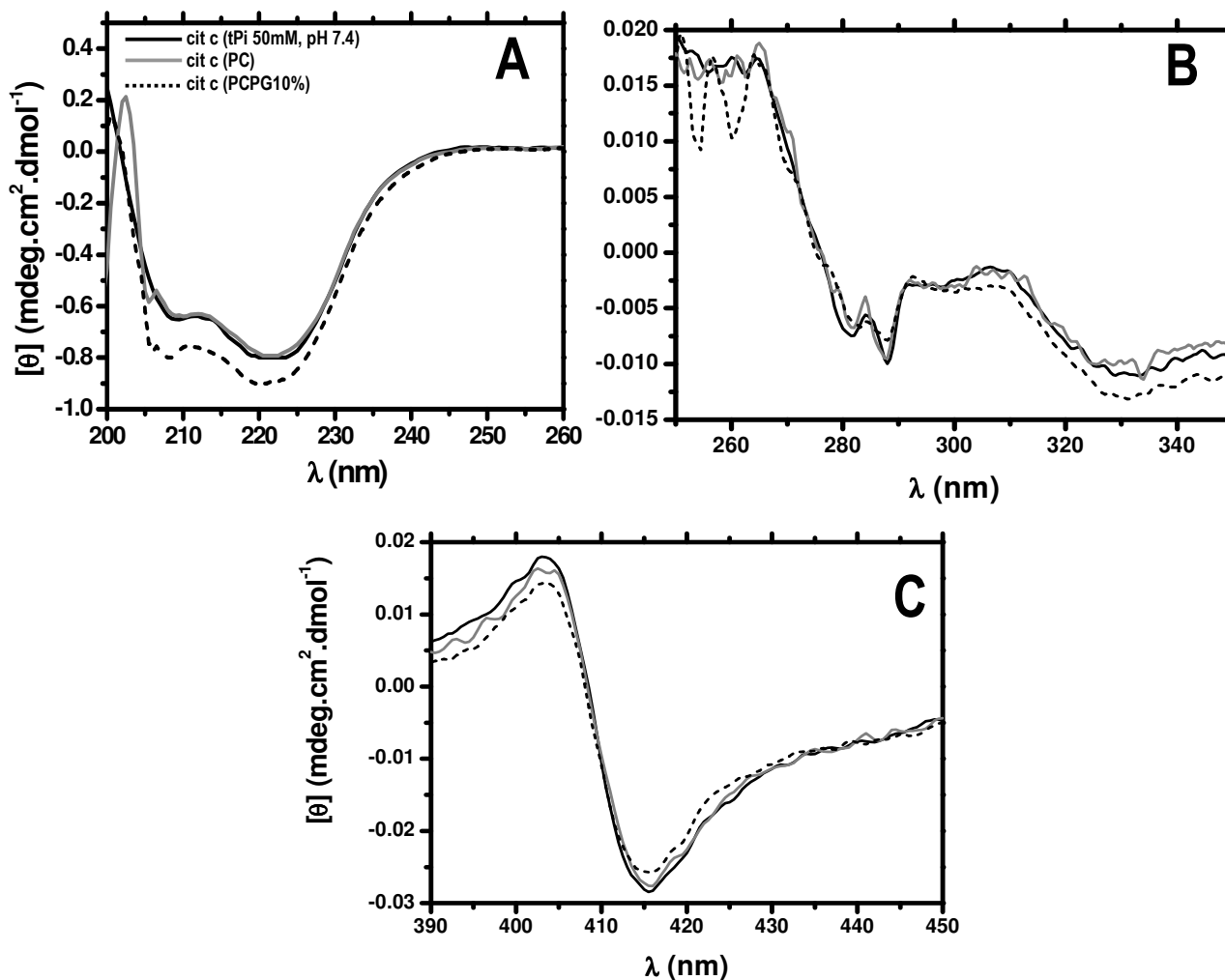


Figura 27 – Espectro de dicroísmo circular do cit *c*. (A) corresponde ao UV distante, (B) ao UV próximo e (C) à região Soret. Linha preta – cit *c* nativo, linha cinza – cit *c* + vesículas de PC e linha tracejada – cit *c* + vesículas de PCPG10%.

Para caracterizar melhor o efeito do SIN-1 (10 μ M) sobre o cit *c* (10 μ M), espectros de CD (em solução de tampão fosfato 20 mM, pH 7,4) foram obtidos antes (linha preta) e após (linha cinza) incubar a proteína com o gerador de NO[•] por 82 min (Figura 28 (A), (B) e (C)). A Figura 28 A representa o espectro de UV distante do cit *c* e revela uma pequena diminuição na proporção de α -hélice, indicada pela diminuição nos picos em 210 nm e 222 nm. Novamente, a deconvolução destes espectros foi feita com o programa k2d. (ANDRADE *et al*, 1993), confirmando a diminuição na proporção de α -hélice (de 39% para 34%). O espectro de UV próximo correspondente ao mesmo tratamento (Figura 28 B), mostrou uma pequena diminuição nas bandas de 260 nm e 305 nm, indicando pequena alteração da estrutura terciária da proteína.

No espectro relativo à região Soret (Figura 28 C), o Fe^{3+} cit *c* nativo (linha preta) apresenta dois picos negativos (em 330 e 374 nm) (banda N) que aumentam de intensidade quando o cit *c* é tratado com SIN-1 (linha cinza). Na banda Soret, a proteína nativa apresenta um efeito *Cotton*, definido por um pico positivo seguido de outro negativo, de intensidade próxima. Após o tratamento, o pico positivo da banda Soret diminui de intensidade, enquanto a banda negativa se manteve próxima da intensidade original com apenas um pequeno desvio para a região do azul. A linha pontilhada representa a subtração de metade do valor de espectro do cit *c* nativo, pelo espectro da proteína tratada com SIN-1, feita para verificar o espectro da proteína tratada, sem interferência do espectro do cit *c* nativo, visto que, conforme visualizado nos espectro de EPR, nem toda a proteína é alterada pelo tratamento com SIN-1.

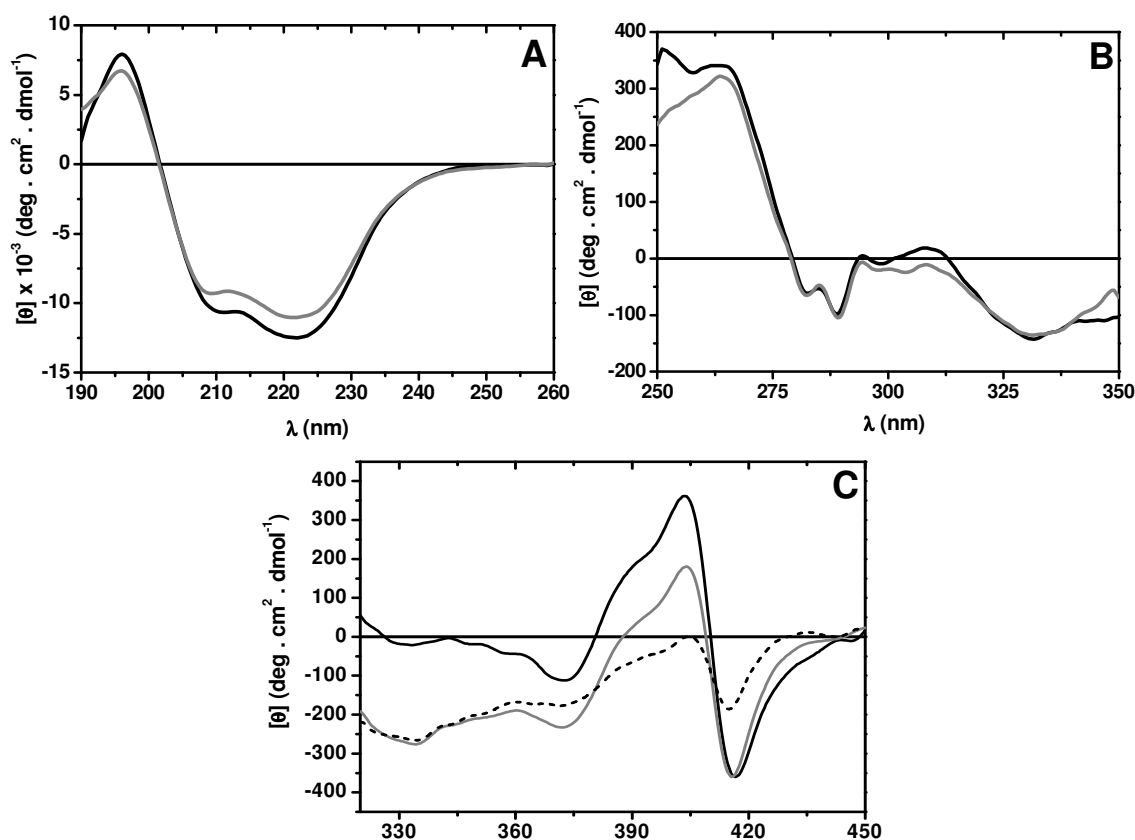


Figura 28 – Espectro de dicroísmo circular do cit *c* (10 μM) tratado com SIN-1 (10 μM). (A) corresponde ao UV distante, (B) ao UV próximo e (C) à região Soret. Linha preta – cit *c* nativo, linha cinza – cit *c* + tratado com SIN-1 e linha tracejada – subtração de cit *c* tratado pela metade do valor de cit *c* nativo.

4.6 Espectroscopia UV-Vis do cit *c* incubado com SIN-1

Os efeitos causados pelos produtos da termólise do SIN-1 (Figura 29) sobre o cit *c* foram acompanhados por espectrofotometria UV/VIS. Estes espectros foram traçados com a

finalidade de complementar os experimentos de ERP. Por este motivo, foram adquiridos espectros do cit *c* (10 μ M) incubado com SIN-1 (10 μ M) em solução (Figura 29 (A) e (B)), contendo vesículas de PC (Figura 29 (C) e (D)) e de PCPG10% (Figura 10 (E) e (F)). Os espectros foram obtidos em atmosfera de nitrogênio (Figura 29 (A), (C) e (E)) e pressão atmosférica (Figura 29 (B), (D) e (F)). Na Figura 29, as linhas pretas representam o espectro do cit *c* um minuto após a adição do SIN-1 e a linha cinza corresponde ao espectro após 82 min de incubação.

É possível observar no espectro do cit *c* em solução (Figura 29 (A) e (B)) que, em condição de hipóxia (banda em 550 nm – Figura 29 (A)), houve uma redução do ferro hemínico, mais acentuada em comparação à condição de normóxia (banda em 550 nm – Figura 29 (B)). Além disso, o pico correspondente à banda Soret (409 nm), na primeira condição citada (Figura 29 (A)), apresentou um desvio em direção a comprimentos de onda mais altos e também um aumento de intensidade, o que se pode atribuir à redução do ferro hemínico.

Na presença de lipossomos de PC ou de PCPG10%, em hipóxia (Figura 29 (C) e (E)) a redução do ferro hemínico foi menor que aquele apresentado pelo cit *c* em solução. Tanto em condições de hipóxia quanto normóxia (Figura 29 (D) e (F)), observa-se um desvio e queda na banda Soret.

A Figura 30 descreve a cinética de absorbância do pico de 550 nm que, como anteriormente citado, indica a redução do cit *c*. Neste estudo é possível observar maior índice de redução do cit *c*, em solução e sob hipóxia. A condição de menor índice de redução do ferro hemínico corresponde à cinética ocorrida na presença de lipossomos de PCLPG10% em condições de normóxia. Salienta-se que o cit *c* em solução aerada também apresentou um dos menores índices de redução.

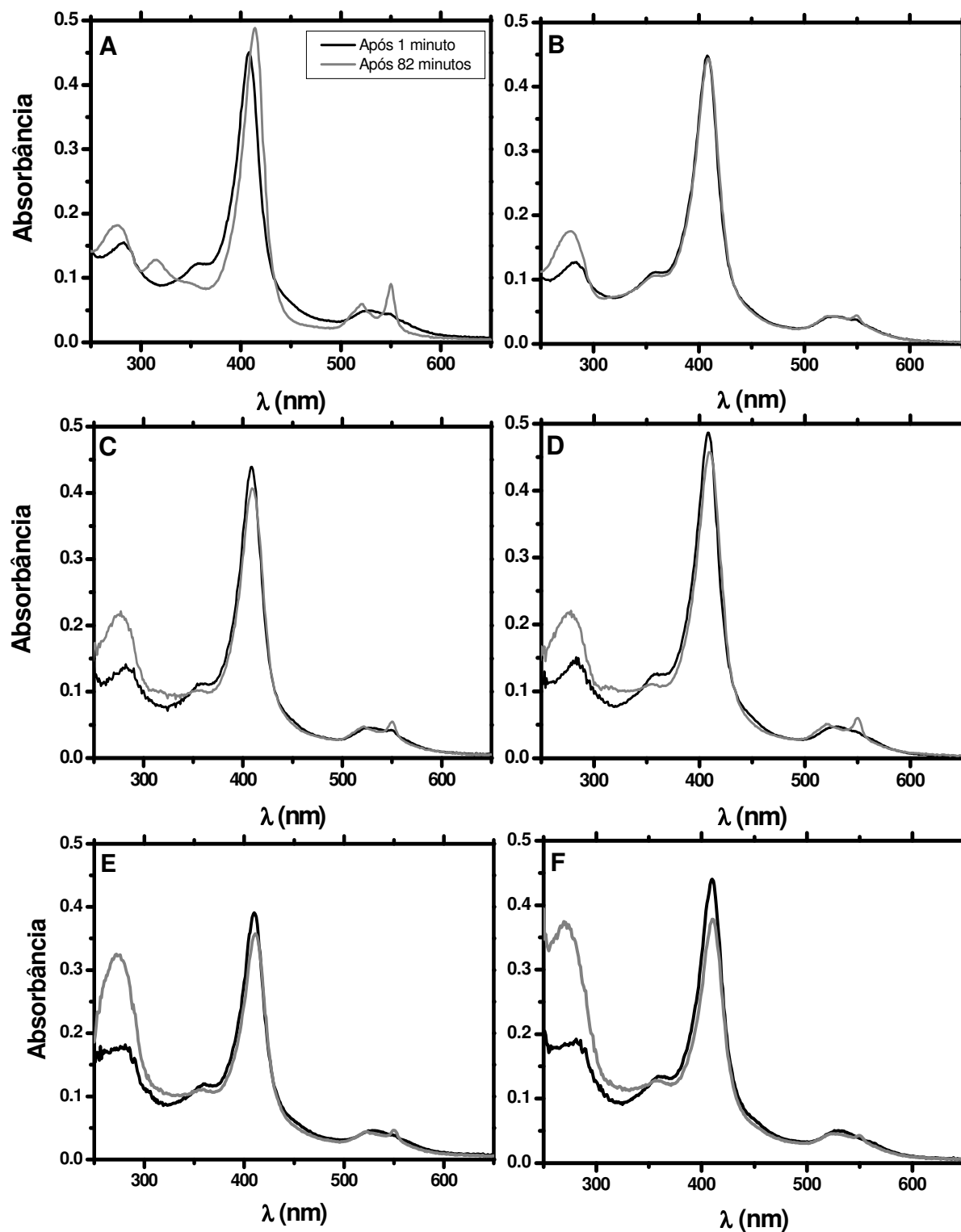


Figura 29 – Espectro UV/VIS de cit *c* em solução (A) e (B), na presença de vesículas de PCL (C) e (D) e de PCLPG10% (E) e (F). A coluna da esquerda corresponde à condição de hipóxia, enquanto a da direita, à condição de normóxia.

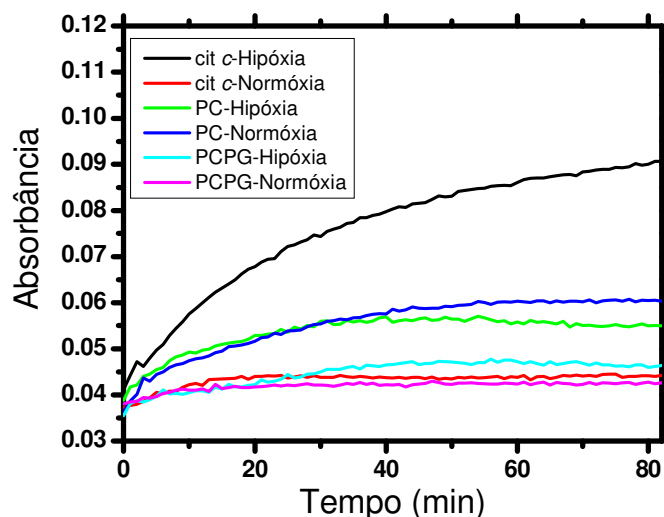


Figura 30 – Cinética de absorvância do cit *c* da banda em 550 nm. As cores das linhas representam: Preta – cit *c* em solução (hipóxia); Vermelha – cit *c* em solução (normóxia); Verde – cit *c* com vesículas de PCL (hipóxia); Azul – cit *c* com vesículas de PCL (normóxia); Ciano – cit *c* com vesículas de PCLPG10% (hipóxia); Rosa – cit *c* com vesículas de PCLPG10% (normóxia).

4.7 Geração de NO[•]

A cinética de liberação do NO[•] por SIN-1 em pH 7,4 (Figura 31) é um evento termo-dependente, uma vez que o aumento da concentração do NO[•] aumenta à medida que temperatura do sistema, constituído em gelo, se estabiliza à temperatura de 37° C no fluorímetro.

A Figura 31 mostra diminuição na disponibilidade de NO[•] na presença de cit *c*, fato este que não foi visualizado na presença de CuZnSOD.

Com a finalidade de verificar se o efeito causado pelo cit *c* não correspondia a uma supressão na fluorescência, ao invés de interação com o NO[•], outra cinética foi realizada, desta vez sem membrana (Figura 32). O SIN-1 foi incubado a 37° C no fluorímetro, com o DAF-FM e, após 5000 s, o cit *c* foi adicionado. Observa-se que realmente houve uma pequena supressão na fluorescência, porém não corresponde à diminuição na intensidade visualizada quando cit *c* e SIN-1 foram adicionados ao mesmo tempo.

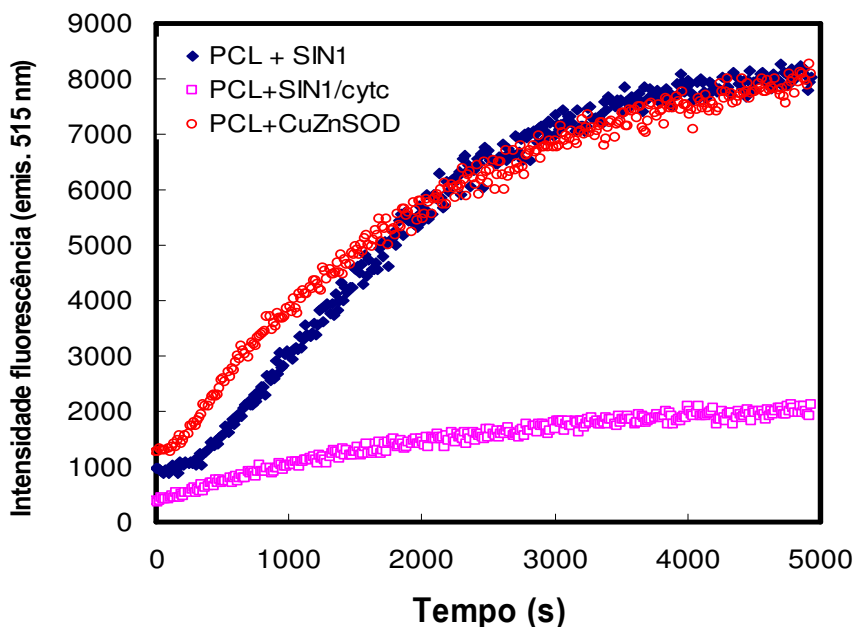


Figura 31 – Cinética de liberação de NO^\bullet pela decomposição térmica do SIN-1 em pH 7,4 na presença de lipossomos formados por fosfatidilcolina apenas (curva azul), de superóxido dismutase (SOD) (curva vermelha) e de citocromo c (Cyt c) (curva rosa).

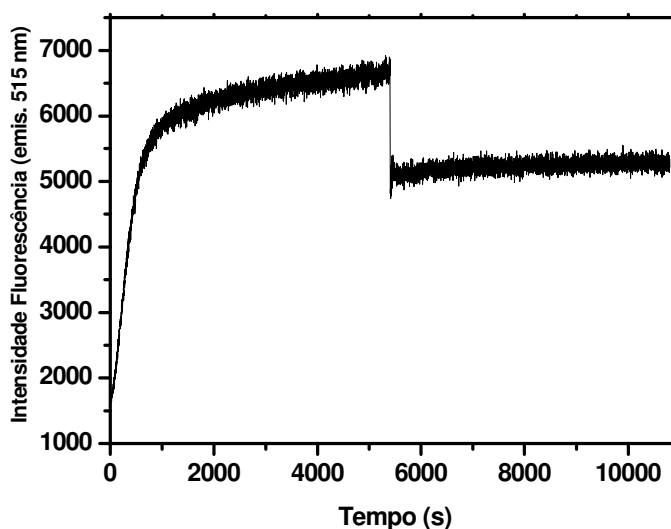


Figura 32 – Cinética de liberação de NO^\bullet pela decomposição térmica do SIN-1 em tampão fosfato pH 7,4. Após 5000 s foi adicionado cit c (150 μM)

4.8 Avaliação de peroxidação na interface membrana/água

A geração de peróxidos na interface entre a membrana e o solvente foi também avaliada através da oxidação do fluoróforo $\text{C}_{11}\text{-BODIPY}^{581/591}$ (Figura 33) (WAHL, 2004). Todas as curvas cinéticas apresentam uma queda abrupta na fluorescência, quando cit c é

adicionado (Figura 33 (A), (B), (C) e (D), primeira seta). As cinéticas seguidas na presença de vesículas de PC ou PCPG10%, sem (Figura 33 (A) e (C)) e com SIN-1 (Figura 33 (B) e (D)), demonstram que, à medida que a termólise do SIN-1 procede, ocorre aparentemente um pequeno aumento na fluorescência.

Observa-se que, após a primeira adição de *tert*-butil-hidroperóxido, a queda na fluorescência foi mais abrupta nos experimentos em que o SIN-1 não foi incluído (Figura 33 (A) e (C)). Além disso, quando se comparam os resultados na presença de vesículas de PC com vesículas de PCPG10%, é possível verificar que a queda na fluorescência é mais rápida, após a adição de *tert*-butil-hidroperóxido, quando o fosfolípido aniônico está presente. Na Figura 33 (B), inclusive, nota-se que a fluorescência não chega aos níveis basais, diferentemente das outras três curvas cinéticas apresentadas.

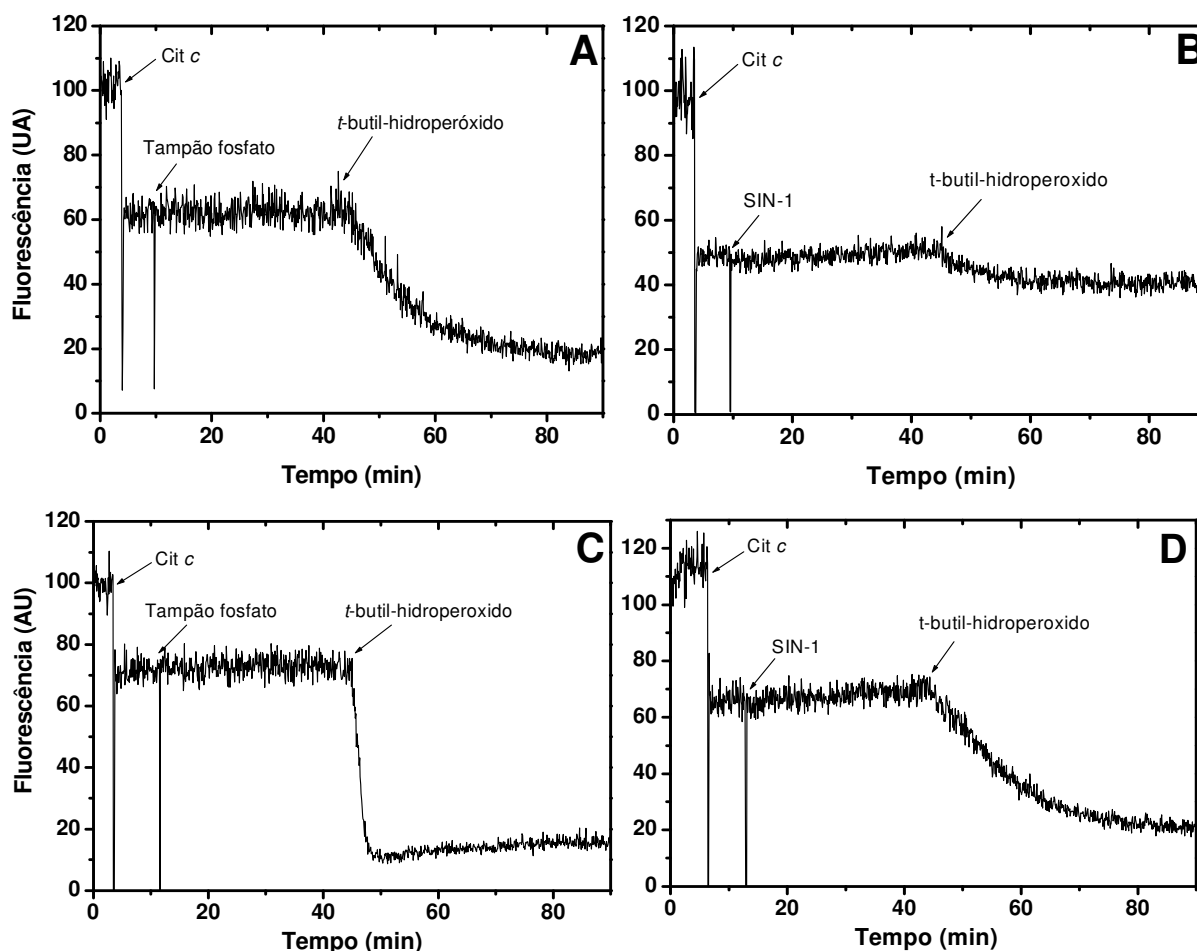


Figura 33 – Cinética de fluorescência do C_{11} -BODIPY^{581/591}, durante incubação com cit *c* seguida de adições de *t*-butOOH, na presença de lipossomos de (A) PC – sem SIN-1; (B) PC – com SIN-1; (C) PCPG10% - sem SIN-1 e (D) PCPG10% - com SIN-1.

4.9 Efeito da AST no diâmetro das vesículas

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos através da técnica de espalhamento de luz dinâmico. Comparando-se o diâmetro das vesículas de PC, PCPG5% e PCPG10%, com e sem AST é possível afirmar que, na concentração utilizada do pigmento (0,5% em relação à concentração de PC), não houve diferença significativa no diâmetro dos lipossomos.

Tabela 2 – Valores de diâmetro de vesículas contendo AST, obtidos através da técnica de espalhamento de luz dinâmico.

	tPi 50 mM (pH 7,4) (\varnothing em nm)	+ AST (tPi pH 7,4) (\varnothing em nm)
PC (1 mM)	196,7 $\pm 0,8$	184,2 $\pm 0,6$
PC (1 mM) PG5%	191,5 $\pm 0,3$	181,2 $\pm 0,3$
PC (1 mM) PG10%	189,1 $\pm 1,3$	190,4 $\pm 0,4$

A pequena diminuição aparente no diâmetro do lipossomo quando PG está presente pode ser explicado por um efeito de repulsão causado pelas cargas negativas no lipossomo, desde que o aparelho mede a mobilidade entre as partículas, correlacionando-a com o seu diâmetro.

5. Discussão

Os ensaios de lipoperoxidação (Figura 11) demonstram que o cit *c* sozinho é capaz de aumentar os índices de TBARS de vesículas de PC e PCPG5% em que foi incorporado, provavelmente em virtude de sua atividade peroxidásica. Quando incubado com SIN-1, nestas vesículas, os índices de peroxidação foram semelhantes aos obtidos com cit *c*. Em concordância com os trabalhos de Denicola e Radi (2005), o NO[•] e o ONOO⁻, formados pela termólise do SIN-1, aumentaram a atividade peroxidásica do cit *c*, pois as alterações estruturais na proteína (liberando o sexto ponto de coordenação) facilitariam a formação de intermediários de alta valência do ferro (ferril ou perferril).

Nosso resultado pode ser explicado pela pequena interação entre o cit *c* e a membrana, já que esta é zwitteriônica (vesículas de PC – Figura 11 (A)) e a proteína apresenta aminoácidos básicos na sua superfície (MCMILLIN; DOWHAN, 2002; BATTHYÁNY *et al*, 2005). No caso das vesículas de PCPG5% (Figura 11 (B)), aumento dos índices de lipoperoxidação do sistema contendo SIN-1 + cit *c* não foi observado pois a concentração de fosfolípido aniônico provavelmente não foi suficiente para que o cit *c* interagisse de forma eficiente com a membrana. Pesquisas que usam cardiolipina para avaliar a atividade peroxidásica do cit *c* utilizam cerca de 25% desse fosfolípido com relação ao total de fosfolípidos da vesícula (NANTES *et al*, 2000).

Conforme previsto, na presença de lipossomos formados por PCPG10% (Figura 11 (C)), houve aumento da lipoperoxidação quando cit *c* e SIN-1 foram incubados juntos, atribuível a alterações no cit *c* (aumentando a sua atividade peroxidásica) e pela interação entre a proteína e a membrana (DENICOLA; RADII, 2005; BAYIR *et al*, 2006). Esta interação é importante devido à aproximação do peróxido produzido às duplas ligações dos ésteres de ácido graxo dos fosfolípidos e a região onde se localiza o ferro hemínico, facilitando a formação dos já citados intermediários de alta valência (NANTES *et al*, 2000).

Os experimentos representados pela Figura 11 demonstram que a AST atuou eficientemente como antioxidante nos sistemas causadores dos maiores índices de peroxidação lipídica (cit *c* ou cit *c* + SIN-1). Entretanto, o pigmento não mostrou a mesma eficiência no sistema de oxidação mais moderado (SIN-1 somente).

É possível também observar que, na presença das vesículas de PCPG10%, a AST foi menos eficiente do que nos sistemas contendo PC e PCPG5%, fato este que também foi observado em outros experimentos (Figuras 12, 13 e 14). Este efeito pode ser atribuído à maior permeabilidade da região hidrofóbica da membrana às espécies reativas, pois, conforme

já reportado, a presença de fosfolipídios aniônicos aumenta a fluidez da bicamada lipídica (WATTS *et al*, 1978). Este efeito pode ser também atribuído ao fato de o cit *c* interagir melhor com a membrana de PCPG10%. Assim, o éster de ácido graxo “entra” no bolsão hidrofóbico formado no centro do cit *c*, posição chamada na literatura de “lipídio estendida” (KAWAI *et al*, 2005), ficando os radicais ali produzidos inacessíveis à AST.

Os resultados da lipoperoxidação estudada em diferentes pHs indicam que os sistemas oxidantes compostos pela mistura de cit *c* [Fe^{3+}] e SIN-1 produziram os maiores índices de oxidação lipídica das suspensões lipossomais (Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17). Como outras proteínas, o cit *c* representa um dos principais alvos moleculares de EROs/ERNs, principalmente do $\bullet\text{NO}$ e ONOO^- (DENICOLA; RADI, 2005). Curiosamente, o cit *c*, como uma hemoproteína, poderia receber elétrons do próprio SIN-1 inibindo a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e se tornando um gerador exclusivo de NO^\bullet (SINGH *et al*, 1999). Por isso, este complexo sistema gerador de espécies reativas demanda atenção especial para se explicar a lipoperoxidação aqui relatada.

A atividade peroxidásica do cit *c* foi relacionada com a nitrosilação dos resíduos de tirosina (Tyr) situados nas posições Tyr 74 e Tyr 97, produzindo 3-nitrotirosina, porém a oxidação de outros resíduos também pode afetar a estrutura proteica, resultando em ruptura da sexta coordenação com a Met80 (BATTHYÁNY *et al*, 2005). Além disso, reações envolvendo resíduos de aminoácidos em locais específicos podem acarretar a perda da função de transporte de elétron do cit *c*. Neste caso, oxidações severas podem resultar na liberação do íon Fe^{3+} presente no centro de seu grupamento heme (BATTHYÁNY *et al*, 2005). Íons de Fe^{2+} , através da reação de Fenton, é capaz de gerar radical hidroxila (HO^\bullet). Este radical é conhecido por ser uma das EROs mais lesivas às biomoléculas e, desta forma, causadora de altos índices de lipoperoxidação.

Para melhor compreensão dos mecanismos de reação envolvendo cit *c* e SIN-1, diversos experimentos foram realizados. As análises espectrofotométricas UV/Vis do cit *c* em presença dos lipossomos (Figura 18), demonstraram que há uma pequena alteração conformacional na proteína na presença de lipossomos de PCLPG5% (Figura 18 (B)). Nos espectros UV/VIS uma pequena alteração na banda Q (550 nm) é visualizada. Esta banda se refere a alterações da valência do ferro hemínico (MAUREN *et al*, 2004). Curiosamente a banda Soret no espectro UV/VIS, que se refere ao ambiente do heme, não apresentou alterações na presença das vesículas de PCLPG5%, indicando que ou não houve alteração na sexta coordenação, ou que esta foi substituída (do enxofre da Met80) por outro ligante de campo forte (MUGNOL *et al*, 2008).

Conforme relatado nos resultados, a presença da AST na membrana, cuja absorvância máxima ocorre em 483 nm (Figura 19), encobriu a banda em 550 nm do cit *c* (Figura 20). Entretanto, pode-se sugerir que não houve alterações na proteína, já que a banda Soret não sofreu variações significativas.

Espectros UV/Vis obtidos do tratamento do cit *c* com SIN-1 (este, 10 vezes mais concentrado que a proteína) (Figura 21) demonstraram a ocorrência de um modesto descoramento da banda Soret, sugerindo degradação do heme. Além disso, a banda Q (550 nm) teve intensidade menor nos lipossomos de PC e PCPG5% sugerindo oxidação do ferro hemínico.

Quando este mesmo tratamento foi realizado em vesículas contendo AST (Figura 22), foi possível perceber queda na absorvância da banda Soret, e descoramento da banda de AST. Tal resultado poderia ser atribuído à degradação da proteína e também interceptação do radical pela AST, mas a diminuição na intensidade do pigmento, que é maior do que a visualizada na proteína, pode interferir na absorvância da banda Soret. Este experimento sugere que o carotenóide está interceptando os radicais gerados (BARROS *et alli*, 2001; PANASENKO *et alli*, 2000), mas não é possível afirmar a extensão da lesão ocorrida na proteína. Nestes espectros também não foi possível acompanhar a oxidação da proteína, pelos motivos já expostos anteriormente.

O espectro do cit *c* incubado com SIN-1 na mesma concentração de 150 μM (Figura 23) demonstrou que, nesta condição, o descoramento da banda Soret não é mais visualizado, mas apenas uma pequena redução do ferro hemínico. Porém, no detalhe desta Figura, observa-se decaimento da curva de absorvância acompanhada em 695 nm, indicando que a proteína perde a coordenação com a Met80. Tal fato evidencia o aumento da atividade peroxidásica do cit *c* causado pelas EROs/ERNs geradas na decomposição do SIN-1 (KAPRALOV *et al*, 2007).

Tendo em vista que os experimentos de UV-Vis não foram suficientemente reveladores da natureza das alterações no cit *c*, causadas pelas EROs/ERNs geradas pelo SIN-1, realizou-se experimentos complementares por ERP em baixa temperatura (11 K), sensível para qualificar o ferro hemínico.

Experimentos de EPR visam comparar o cit *c* (em solução) no estado nativo com aquele tratado com SIN-1 (Figura 25, linhas “a” e “b”). A população de simetria menos rômica (spin 1/2) (Figura 25 linha “b”) foi prevalente quando a proteína reagiu com espécies reativas geradas durante a degradação térmica do SIN-1, causando alterações na sua

conformação espacial (NANTES *et al*, 2000). Neste caso, o baixo grau de rombicidade pode decorrer da troca da Met80 do sexto ponto de coordenação por outro aminoácido.

Uma espécie de menor rombicidade de cit *c* foi recentemente descrita na literatura (MUGNOL *et al*, 2008). Este cit *c* foi obtido na presença de membranas aniônicas e sua obtenção é dependente da razão proteína/lipídio. O cit *c* descrito neste trabalho tem baixo spin (1/2) e apresenta $g_1 = 2.902$, $g_2 = 2.225$, and $g_3 = 1.510$ (MUGNOL *et al*, 2008). Conforme observado na simulação apresentada na Figura 25 linha “c”, o cit *c* obtido após tratamento com SIN-1, exibe valores de $g_1 = 2.736$, $g_2 = 2.465$, and $g_3 = 2.058$. Estes dados atestam que o ferro hemínico apresenta uma simetria ainda maior do que aquele relatado na literatura. No último trabalho de Mugnol *et al* (2008), o aumento da simetria do heme foi atribuído à substituição da Met80, que coordena o ferro hemínico através de um enxofre, por uma lisina (provavelmente a lisina 79). Esta e a histidina presente na quinta posição, coordenam o ferro através de um átomo de nitrogênio do aminoácido e assim, seria justificado o aumento na simetria. No nosso caso, a aproximação dos valores de g sugerem que outros aminoácidos, diferentes de lisina, poderiam substituir a Met80. Outra histidina justificaria o aumento ainda maior na simetria.

Considerando que todos os experimentos de lipoperoxidação foram realizados sob pressão atmosférica de O_2 , o qual está envolvido na decomposição do SIN-1, ensaios de EPR em baixa temperatura do cit *c* foram conduzidos, em solução e na presença das vesículas de PC e PCPG10%, sob condições de normóxia e hipóxia.

Nos ensaios elaborados na presença e ausência de oxigênio (Figura 26 A e B respectivamente), as linhas “a” representam o cit *c* em solução, após o tratamento com SIN-1 em condições de normóxia (Figura 26 (A)) e hipóxia (Figura 26 (B)). É possível perceber um aumento do sinal do ferro hemínico na ausência de oxigênio. Isto pode ser explicado pela presença de oxigênio, pois o radical ânion superóxido formado é capaz de reduzir o Fe (III) do cit *c* a Fe (II). Este é diamagnético e portanto não apresenta sinal de EPR. Além disso, um sinal discreto de $g \sim 5,0$, que não pode ser simulado pois sua intensidade era muito baixa, também deve estar presente. Considerando que, em condições de hipóxia, há maior disponibilidade de NO^\bullet , este sinal poderia ser resultante da interação entre NO^\bullet e a proteína.

A adição de 15 mM de *t*-butOOH após o tratamento do cit *c* com SIN-1 (Figura 26 (A) e (B), linhas “b”) resultou no aparecimento de duas novas populações de cit *c* Fe (III): uma com alto spin (5/2) de simetria axial ($g = 6,0$) (FEHER, 1970) e outra de alto spin com simetria rômica ($g = 4,3$) (WICKMAN; KLEIN; SHIRLEY, 1965). Este último sinal demonstra que a proteína sofreu extensos danos oxidativos. Em condições de hipóxia, há

também o sinal largo em $g \sim 5,0$ que afeta o pico referente ao cit *c* Fe (III) de alto spin e simetria axial ($g = 6,0$).

As linhas “c” da Figura 26 (A) e (B) correspondem ao sinal do ferro hemínico após o tratamento com SIN-1, mas neste caso, no meio contendo lipossomos de PC. Nesta situação o sinal do ferro hemínico quase desaparece na presença de oxigênio. Tal eficiência na redução do ferro pode ser uma consequência de uma menor velocidade de reação entre o $O_2^{\bullet-}$ e o NO^{\bullet} , já que este último é mais difusível em membranas, visto que não possui cargas. O cit *c* Fe (II) é diamagnético quando coordena ligantes de campo forte. Nestes espectros, na ausência do oxigênio, verifica-se uma menor população de cit *c* com baixa rombicidade. Isto pode ser explicado pelo fato de a membrana agir como seqüestrador de NO^{\bullet} , pelos motivos expostos anteriormente (MAUREN *et al*, 2004). Novamente, em condições de hipóxia, o sinal de $g \sim 5,0$ estava presente.

Novamente, após a adição de *t*-butOOH (Figura 26 (A) e (B), linha “d”), apareceram os sinais de $g = 6,0$ e $g = 4,3$. No experimento em normóxia (Figura 26 (A), linha “d”), tais sinais foram menos intensos que os visualizados no tratamento anterior. Além disso, a população de cit *c* nativo voltou a aparecer, porém o mesmo não ocorreu com o sinais de cit *c* de simetria menos rômica. A diminuição da população de cit *c* Fe (III) com $g = 4,3$ indica que a proteína sofreu menor lesão oxidativa promovida por peróxidos, resultando em menor alteração no heme. Tal fato pode ser explicado pela anterior redução do ferro hemínico pelo $O_2^{\bullet-}$. Além disso, o desaparecimento da população de cit *c* Fe (III) com simetria menos rômica pode ser um indício de que esta forma de cit *c* é uma peroxidase mais eficiente que a forma nativa da proteína. Na literatura já foi reportado que cit *c* tratado com ERNs se torna uma peroxidase mais eficiente (JANG; HAN, 2005).

Em condições de hipóxia, os sinais $g = 6,0$ e $g = 4,3$ (Figura 26 (B), linha “d”), são mais evidenciados, ainda que menor do que aquele apresentado com cit *c* em solução, seguido de desaparecimento das duas populações de cit *c* baixo spin. Este resultado também é um indício de que, além da presença da bicamada lipídica, a qual já foi descrita como protetora da proteína (NANTES *et al*, 2000), o próprio $O_2^{\bullet-}$, capaz de reduzir o ferro hemínico, paradoxalmente também pode protegê-la. O cit *c* Fe^{2+} não é capaz de clivar o peróxido (BARR; MASON, 1995) e ainda pode reduzir radicais livres, finalizando a cadeia de reações e evitando que o próprio cit *c* e outras biomoléculas sejam alvos de peroxidação (MAUREN, 2004).

Nas linhas “e” da Figura 26, encontram-se os espectros de EPR do ferro hemínico na presença de lipossomos PCLPG10%. A presença do lipídio aniônico faz com que o cit *c*

interaja com a bicamada, por meio de interação eletrostática e lipídio estendida (KAWAI *et al*, 2005). Na presença de PCLPG10%, observa-se que o cit *c* apresenta sinais de cit *c* Fe (III) baixo spin. Assim, na presença de oxigênio molecular, o sinal do ferro hemínico é alto. Tal fato pode ter ocorrido devido à reoxidação do ferro hemínico pelos radicais formados pela reação do cit *c* Fe²⁺ com traços de peróxidos de lipídio. Este fato não ocorreu com vesículas de PC por não haver uma interação tão intensa com a proteína (NANTES *et al*, 2001). Sem o oxigênio molecular, o sinal do Fe (III) da forma nativa e a de menor rombicidade decrescem concomitantemente com o surgimento do mesmo sinal largo de $g \sim 5,0$. Novamente, na presença de oxigênio a redução do ferro por ânion superóxido pôde proteger o grupo heme do ataque.

Ao observar os sinais do ferro hemínico de cit *c* tratado com SIN-1 na presença de PCPG10% e imediatamente após a adição de *tert*-butil-hidroperóxido, verifica-se no espectro traçado na presença de oxigênio (Figura 26 (A), linha “f”) os mesmos resultados apresentados na linha “d” da Figura 26 (A). Tal resultado foi também reproduzido em condições de hipóxia (Figura 26 (B), linha “f”), em comparação com a linha “d” da Figura 26 (B).

Em todos os experimentos, a adição de *t-butOOH* fez desaparecer o sinal da forma de simetria menos rômbrica. Isto pode ter ocorrido pois esta espécie de cit *c* é mais reativa com o peróxido e, assim, mais susceptível ao ataque por radicais livres (NANTES *et al*, 2000).

De acordo com os trabalhos do grupo de pesquisa do Skulachev (SKULACHEV, 1998; KORSHUNOV *et al*, 1999), além das funções já relatadas do cit *c*, ele também age como um antioxidante, pois, na sua forma reduzida, pode doar elétrons aos radicais, sem gerar outras espécies reativas (PEREVERZEV *et al*, 2003). Recentemente foi demonstrado que a presença de SOD mitocondrial pode apresentar um efeito pró-oxidante, visto que ela pode competir com o cit *c* pelo O₂^{•-}, além de gerar H₂O₂, o qual pode reagir com cit *c* Fe³⁺, acarretando em lesões oxidativas (GOLDSTEINS *et al*, 2008). Neste trabalho, demonstra-se que, além de proteger a membrana contra as lesões oxidativas, a presença do O₂^{•-} surpreendentemente também protege a própria proteína das EROs/ERNs.

Espectros de CD também foram obtidos (Figura 27) com a finalidade de observar o efeito dos lipossomos sobre as estruturas secundárias e terciárias do cit *c* Fe³⁺. Conforme se observa na região do UV distante (Figura 27 (A)) e do UV próximo (Figura 27 (B)), o cit *c* nativo e a proteína estudada na presença de lipossomos de PC apresentam espectros quase idênticos. De fato só é possível perceber diferenças entre os espectros de cit *c* nativo (linha preta) ou cit *c* + PC (linha cinza) na região da banda Soret (Figura 27 (C)). Porém, tendo em

vista que houve uma pequena diminuição tanto no pico positivo quanto no negativo da banda Soret, não se pode afirmar que houve alguma alteração no ambiente que envolve o heme.

A presença de membranas de PCPG10% alterou, ainda que sutilmente, o espectro de CD do cit *c* em todas as regiões estudadas (Figura 27, linha tracejada). Apesar de não resultar em diferenças nas proporções de estrutura secundária, o PG, na concentração utilizada, foi capaz de alterar a relação entre os mínimos em 208 nm e 222 nm (Figura 27 (A)), indicando uma pequena exposição de aminoácidos aromáticos (SINIBALDI *et al*, 2005). Os picos em 282 nm e 288 nm (Figura 27 (B)) também diminuíram de intensidade, indicando, novamente, uma pequena exposição do único triptofano (Trp 59) presente na proteína, corroborando o que foi visualizado no UV distante (SINIBALDI *et al*, 2005).

Os dois picos a 405 nm e 416 nm, também diminuíram de intensidade na presença de lipossomos de PCPG10% (Figura 27 (C), linha tracejada). Tal diferença, ainda que pequena, representa uma alteração na estrutura do heme, indicando maior exposição do ferro. Este fato corrobora a hipótese de que, na presença destas vesículas, a proteína tem sua atividade peroxidásica aumentada (KAGAN *et al*, 2004; BELICOVA *et al*, 2005). Porém, salienta-se que as alterações observadas foram muito sutis para serem consideradas significativas, demonstrando apenas indícios de interação entre a proteína e o lipídio aniônico.

Os espectros de CD obtidos antes (Figura 28, linhas pretas) e após (Figura 28, linhas cinzas) o tratamento do cit *c* Fe (III) com SIN-1 indica, no espectro de UV próximo (Figura 28 (A)), que o tratamento propiciou uma pequena abertura na estrutura da proteína, sugerida pela diminuição na estrutura de α -hélice (de 39% para 34%). Houve também alteração no microambiente dos resíduos de fenilalanina (260 nm) e triptofano 59 (305 nm) (FASMAN, 1996), indicando uma pequena alteração na estrutura terciária da proteína ou nitração/nitrosilação destes aminoácidos (ALVAREZ, 1996).

Alterações mais relevantes foram observadas no espectro de CD da região Soret (Figura 28 (C)). O aumento da intensidade dos picos negativos presentes em 330 e 374 nm já foi anteriormente descrito em alterações de cit *c* Fe (III) nativo para aquele de baixo spin com pouca rombicidade (MUGNOL *et al*, 2008), sugerindo também alteração no sexto ligante do ferro hemínico. Além disso, houve um decréscimo no pico positivo da banda Soret enquanto o pico negativo foi pouco alterado. Este resultado é sugestivo novamente da presença de duas populações de cit *c*. Por esta razão, a subtração apresentada na linha tracejada da Figura 28 (C) foi elaborada, com a finalidade de observar melhor as alterações causadas pelo tratamento com SIN-1. Novamente, foram observadas diferenças entre a banda Soret relatada no trabalho

de MUGNOL e colaboradores (2008) e a obtida na presente pesquisa, o que sugere que a sexta coordenação do ferro hemínico foi substituída por ligantes diferentes em cada caso.

Os ensaios de espectroscopia UV/Vis foram realizados para se estudar os efeitos do SIN-1 sobre o cit *c* (Figuras 29 e 30). Nestes experimentos, observam-se que, em condições de hipóxia, o cit *c* em solução, incubado com SIN-1, foi quase totalmente reduzido (Figura 29 (A) – banda em 550 nm). Quando se decompõe, o SIN-1 doa um elétron antes de perder o NO[•]. Como a concentração de oxigênio molecular no sistema é baixa, o SIN-1 doa um elétron ao próprio cit *c* que assim é reduzido (SINGH *et al*, 1999). Neste espectro a redução é acompanhada de um desvio e aumento na absorbância da região Soret (409 nm). Esta mudança associada à redução foi anteriormente reportada por NANTES *et al* (2001).

Em condições de normóxia (Figura 29 (B)), o cit *c* quase não apresenta redução após os 82 min de incubação. Porém, é preciso relatar que o cit *c* compete com o O₂ pelo elétron doado pelo SIN-1 e, uma vez reduzida, a proteína pode ser re-oxidada, tanto pelo oxigênio presente no meio, quanto pelo ONOO⁻ gerado pelo SIN-1 (CASTRO *et al*, 2004).

Na presença das vesículas de PC e de PCPG10% (Figura 29 (C), (D), (E) e (F)) não foram verificadas diferenças significativas nas bandas Q (550 nm) e Soret (410 nm), em condições de hipóxia e normóxia. Tal fato pode ser atribuído à dificuldade de deaeração das membranas. Como a concentração de cit *c* Fe(III) era muito baixa (10 μM), a razão cit *c*/O₂ pode ser diferente daquela observada nos espectros de EPR em que o cit *c* era 150 μM. Além disso, as análises de espectroscopia UV-Vis se mostraram pouco sensíveis ao sistema de oxidação utilizado.

A geração de NO[•] foi acompanhada através do aumento da fluorescência do composto DAF-FM (Figuras 31 e 32). Conforme verificado na Figura 31, o cit *c* diminui a disponibilidade do NO[•] para reagir com o DAF-FM. Para dirimir dúvidas de que o efeito apresentado fosse em decorrência de supressão de fluorescência e não pela interação entre NO[•] (ou ONOO⁻) e a proteína, um novo estudo cinético foi realizado, desta vez somente com SIN-1 e a sonda em solução. Após a corrida, foi adicionado cit *c* para verificar a possível supressão de fluorescência do DAF-FM (Figura 32). De fato, assim que o cit *c* foi adicionado houve uma queda na fluorescência, sugerindo supressão. Porém, observa-se que esta supressão não equivale ao baixo nível de fluorescência apresentado pela Figura 31 (curva rosa). Segundo a empresa Molecular Probes, o DAF-FM é um fluoróforo que reage especificamente com NO[•], porém pesquisas demonstram que esta sonda pode também reagir com outras ERNs, como o ONOO⁻ (BALCERCYK *et al*, 2005), o que explica o motivo pelo qual, apesar de o SIN-1 gerar tanto NO[•] quanto O₂^{•-}, a fluorescência do DAF-FM aumentou.

O ONOO⁻ formado pela decomposição térmica do SIN-1 pode reagir com o cit *c*, causando nitrações em resíduos de aminoácidos e, como já citado, aumenta a atividade peroxidásica da proteína (BATTHYÁNY *et al*, 2005). Esta ERN também deveria reagir com a enzima CuZnSOD (ALVAREZ *et al*, 2004), que foi utilizada com um controle de baixo índice de fluorescência, porém surpreendentemente, este índice foi semelhante ao controle com PC. Estudos elaborados por Nagami *et al* (2005), demonstraram que os lipossomos protegem a enzima CuZnSOD de oxidação causada por EROs.

Algumas pesquisas utilizam o C₁₁-BODIPY^{581/591} para monitorar o efeito de EROs/ERNs em membranas biológicas e vesículas, pois esta sonda fluorescente se mantém próxima à interface membrana/água e é sensível a peróxidos orgânicos e ao ONOO⁻ (DRUMMEN *et alli*, 2002). Comparando-se os resultados apresentados pela Figura 33, a adição do cit *c* diminuiu imediatamente a intensidade da fluorescência do C₁₁-BODIPY^{581/591}, o que pode ser explicado por uma supressão de fluorescência causada pela proteína e não por radicais RO[•] e ROO[•].

Quando se comparam as curvas cinéticas obtidas na ausência de SIN-1 (Figura 33 (A) e (C)) com aquelas em que SIN-1 foi adicionado (Figura 33 (B) e (D)), após a inclusão de *tert*-butil-hidroperóxido, no primeiro caso, houve uma acentuada queda na fluorescência, possivelmente relacionada à atividade peroxidásica do cit *c* diante da presença do peróxido orgânico. Quando o SIN-1 estava presente no sistema, a oxidação do fluoróforo aparentemente foi atrasada e, na presença de vesículas de PC, ela nem atingiu os níveis basais observados nos outros experimentos. Este dado indica, novamente, que o O₂^{•-}, gerado pelo SIN-1, pode proteger a membrana de peroxidação lipídica (SKULACHEV, 1999).

Justifica-se a acentuada queda na fluorescência observada na Figura 33 (C) pela interação entre o cit *c* e a bicamada lipídica, visto que assim que o fluoróforo (localizado próximo interface membrana/água) é aproximado do cit *c*, que apresenta atividade peroxidásica já aumentada por desestabilização da sexta coordenação da proteína (KAPRALOV *et al*, 2007). Novamente, o mesmo fenômeno não é observado no experimento descrito pela Figura 33 (D) devido ao efeito do O₂^{•-} sobre o ferro hemínico, que protege a sonda de oxidação. Ainda assim, a peroxidação lipídica é maior na presença do fosfolípido aniônico (Figura 33 (D)) do que com vesículas de PC. Ainda que parte do cit *c* esteja protegido pela redução, a população formada por cit *c* Fe (III) de baixa rombicidade é capaz de contribuir com a lipoperoxidação, visto que, segundo os resultados de EPR, ela é uma peroxidase mais eficiente que o cit *c* Fe(III) nativo. Novamente, foi demonstrado o paradoxal efeito protetor causado pela presença do ânion radical superóxido e do cit *c* Fe(III).

O efeito da AST no diâmetro das vesículas foi estudado através da técnica de espalhamento de luz dinâmico. Os resultados apresentados demonstram que, tanto a alteração da composição da membrana, quanto a presença do carotenóide não afetaram de forma significativa o diâmetro médio dos lipossomos. Portanto, a AST não afetaria a estrutura dos lipossomos. A utilização de outras técnicas demonstraram que xantofilas com grupos polares nos dois anéis β causam menos perturbação na membrana e se distribui melhor pela bicamada lipídica, sem formar agregados (MCNULTY *et al*, 2007).

Pesquisas demonstram que a eficiência da AST na capacidade antioxidante decorre também por via indireta, pela diminuição da fluidez da membrana na fase líquido-cristalina (GABRIELSKA; GRUSZECKI, 1996), além da sua disposição na bicamada lipídica (que é perpendicular com relação à superfície da membrana). Este efeito permitiria que as espécies reativas fossem interceptadas tanto na interface membrana/água quanto no *core* da bicamada (MCNULTY *et al*, 2007). Segundo WISNIEWSKA *et al* (2006) os carotenóides somente interferem na difusibilidade de espécies reativas se estiverem dissolvidos na membrana como “monômeros” e a presença de agregados causa perturbações nas membranas que aumentariam esta permeabilidade.

O resultado de espalhamento de luz dinâmico também confirma que os lipossomos preparados pelo processo de extrusão apresentam volume homogêneo. Segundo PATTY e FRISKEN (2003), o diâmetro da vesícula é inversamente proporcional à pressão aplicada na seringa do extrusor. Assim, os resultados de espalhamento de luz demonstram a homogeneidade no tamanho de vesículas preparadas por extrusão. Não obstante o aumento na lipoperoxidação causado pela presença de cit *c* [Fe^{3+}] e o fato de a AST não ter causado alterações perceptíveis no diâmetro das vesículas, o pigmento apresentou a mais evidente capacidade antioxidante em todos os ensaios de lipoperoxidação realizados. Tal fato é evidente mesmo nos sistemas formado em tampão de pH 6,2 e 6,8 com lipossomos compostos apenas por fosfatidilcolina (Figura 12 (A) e (B)). Nos sistemas em que a oxidação foi menos intensas, a AST apresentou menor eficácia na proteção oxidativa ou, até mesmo, demonstrou uma possível atividade pró-oxidante, em condições mais ácidas (Figura 12 e 15 (A) e (B)).

Com a incorporação de 5% e 10% de PG (com relação à concentração de PC) na composição lipídica das vesículas, a ação pró-oxidante da AST foi mais ainda evidenciada em ambiente ácido, conforme sugerem as Figuras 13, 14, 16 e 17. Nos ensaios contendo 10% de PG, o aumento da lipoperoxidação foi visualizado inclusive em pH semelhante ao fisiológico (pH 7,4 – Figuras 14 e 17). Em conjunto, a alteração na composição do lipossomo e do pH foram capazes de interferir na atividade da AST. Estudos prévios realizados com β -caroteno

demonstraram que este pigmento pode exibir atividade pró-oxidante quando submetido a diferentes condições experimentais (RIETJENS *et al*, 2002). Estes resultados foram observados em pesquisas *in vivo*, especialmente relacionados ao consumo de altas doses de β -caroteno em fumantes inveterados (RIETJENS *et al*, 2002). Porém, com outros carotenóides, não há estudos demonstrando este mesmo resultado.

Nos ensaios efetuados com lipossomos contendo apenas PC, a AST demonstrou atividade antioxidante mais eficiente quando submetida a pH 7,4 e 8,0, em comparação com microambientes ácidos. O aumento da acidez aparentemente tornou o carotenóide menos eficaz em sua atuação antioxidante.

O aumento na concentração hidrogeniônica na solução pode causar alterações na reatividade dos radicais livres. O peroxinitrito (ONOO^-) se protona formando o ácido peroxinitroso (HONOO), cujo pKa é 6,8 (DENICOLA; RADI, 2005). O HOONO , por não apresentar carga, pode se difundir através da membrana com maior velocidade, e é capaz de formar, por fissão homolítica, dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) e $\text{HO}\bullet$ (ALVAREZ *et al*, 2004; DENICOLA; RADI, 2005), radicais altamente reativos.

Nos experimento de oxidação elaborados na presença da enzima CuZnSOD (sistemas 5 e 6), a taxa de TBARS deveria, supostamente, diminuir, uma vez que um dos precursores do potente agente oxidante ONOO^- estaria sendo eliminado do sistema pela CuZnSOD (radical $\text{O}_2\bullet^-$). Os resultados mostraram que, na presença da enzima, os níveis de TBARS foram semelhantes ao controle e, algumas vezes, até maior. A enzima CuZnSOD deve ter sido inativada por oxidação promovida pelos próprios radicais ONOO^- e $\text{HO}\bullet$ (ALVAREZ *et al*, 2004; NAGAMI, *et al*, 2005). Além disso, a oxidação da enzima é capaz de formar radicais histidinil, também reativos e, portanto, capazes de elevar os níveis de TBARS (ALVAREZ *et al*, 2004). De acordo com Alvarez *et al* (2004), a inativação da enzima CuZnSOD ocorre com maior rapidez quando a reação se procede em meio alcalino. Apesar de os resultados obtidos serem próximos ao controle (Figuras 12 (C) e (D), 13 (C) e (D), 14 (D), 15 (C) e 16 (C) e (D)), os sistemas que possuem CuZnSOD apresentaram aumento no índice de peroxidação lipídica, em pH 7,4 e 8,0, respectivamente. Esse aumento, na ausência do carotenóide, não foi tão pronunciado, pois segundo Nagami *et al* (2005), a própria membrana do lipossomo poderia ter efeito protetor contra inativação da enzima.

Mesmo nos sistemas contendo CuZnSOD, quando na presença da AST, o carotenóide se comportou de maneira semelhante ao sistema formado pelo cit *c* e SIN-1. Em meio moderadamente ácido, a proteção antioxidante do carotenóide foi menos eficiente,

apresentando até mesmo aumento nos índices de lipoperoxidação, em comparação aos resultados obtidos em pH alcalino.

O pH, além de afetar a permeabilidade e a reatividade dos radicais, também deve causar modificações nas propriedades físico-químicas determinadas pela membrana do lipossomo. Conforme os trabalhos realizados por Sulkowski *et al* (2005), em pH ácido, as membranas apresentam maior rigidez a uma temperatura inferior à de transição de fase, comparadas com lipossomos produzidos em pH alcalino. Por outro lado, acima desta temperatura, as primeiras membranas são mais fluidas que as segundas e, assim, são também mais permeáveis. Para a PC de gema de ovo, utilizada no presente trabalho, a temperatura de transição é próxima de -5° C. Na temperatura em que os ensaios foram realizados, portanto, a membrana se apresenta na fase cristal-líquido. O acréscimo de PG durante a formação do lipossomo causa diminuição no pH da superfície da membrana (GARBUZENKO *et al*, 2005). Assim, lipossomos formados em tampão de pH 7,4 apresentam decréscimo no pH superficial, no microambiente onde as interações entre fosfolipídios e a AST e/ou o cit *c* são mais pronunciadas (GARBUZENKO *et al*, 2005).

Gabrielska e Gruszecki (1996) relataram que a AST seria capaz de diminuir a fluidez da membrana e, portanto, deveria diminuir também a difusão de radicais através da membrana. Outros experimentos demonstraram a importância de relacionar alterações físico-químicas e a atividade antioxidante destes pigmentos (WISNIEWSKA; WIDOMSKA; SUBCZYNSKI, 2006; MCNULTY *et al*, 2007; SUJAK; STRZALKA; GRUSZECKI, 2007).

Inesperadamente a alteração no pH fez com que a AST aumentasse os níveis de lipoperoxidação. Segundo Sulkowski *et al* (2005), o pH altera a conformação na região polar dos fosfolipídios. Em pH próximo de 5,0 a “cabeça” polar apresenta uma conformação paralela com a superfície da membrana. Em pH 7,4, a região polar se mantém perpendicular em relação à superfície da membrana e, em pH próximo de 8,0 a região polar forma ângulos diferentes (porém próximos) de 90° com relação à superfície (Figura 34). Essa alteração conformacional poderia, hipoteticamente, interferir na interação entre o carotenóide e a membrana, tornando-a menos eficiente em sua ação antioxidante. Sulkowski *et al* (2005) ainda sugerem que as interações mais distintas entre os fosfolipídios ocorrem quando a “cabeça” está na posição perpendicular com relação à superfície (pH 7,4).

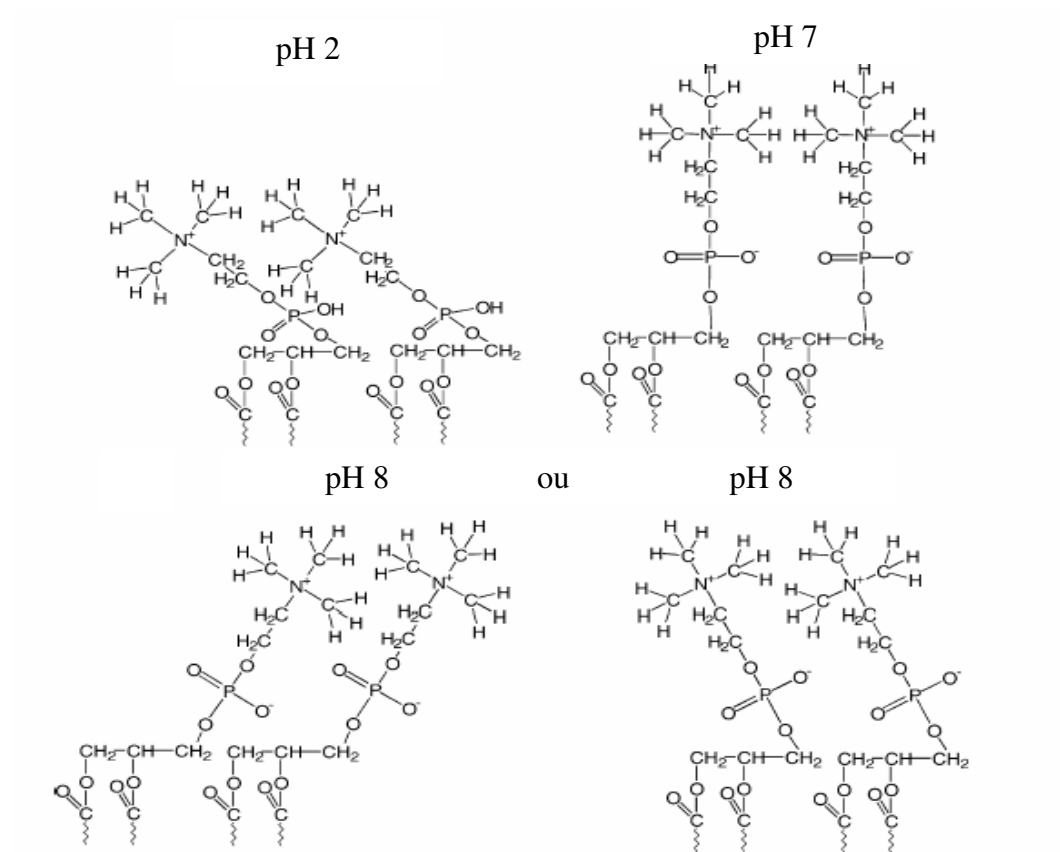


Figura 34 – Possíveis interações entre as regiões polares dos fosfolipídios em diferentes pHs.

6. Conclusões

Esta dissertação atesta que a capacidade antioxidante de carotenóides não pode ser definida exclusivamente pela sua estrutura molecular, pois sofre interferência da composição química da biomolécula alvo e das EROs/ERNs envolvidas. As condições do meio onde a AST se localiza também pode ser um fator determinante da ação do carotenóide. Nossos resultados sugerem que o pH é capaz de modular diferentes atividades, produzindo respostas anti ou pró-oxidantes.

Além de afetar o comportamento redox da AST, o pH também afeta a reatividade e a permeabilidade de diferentes ERO/ERNs através da membrana, bem como sua fluidez. Assim, dependendo da concentração de íons H^+ no meio, membranas podem sofrer maior ou menor degradação, bem como os compostos nela internalizados. A AST, dependendo das condições do meio é capaz de diminuir a fluidez da membrana, protegendo-a de agentes oxidantes. É capaz de prevenir altos níveis de oxidação, mas quando sujeita à agente oxidante moderado sua atividade é menos eficiente. A composição dos fosfolipídios da membrana também é importante para definir a atuação do carotenóide.

A AST, ingerida juntamente com outros antioxidantes que agem em condições moderadas de oxidação, pode contribuir na profilaxia e retardamento de processos degenerativos. Além disso, o efeito preventivo da AST sobre a lipoperoxidação promovida por *cit c* sugere que esta xantofila pode retardar o início da apoptose, apesar de que, em ambientes moderadamente ácidos, a AST pode contribuir com o aumento da lipoperoxidação.

Os resultados aqui apresentados demonstram que o *cit c* também interage com membranas de PG, fosfolipídio pouco descrito na literatura, o qual pode causar alterações na proteína de modo a exacerbar a atividade peroxidásica dela.

Nossos resultados ainda sugerem que o $O_2^{\bullet-}$, apresentou um efeito paradoxal, expondo o *cit c* à oxidação, especialmente quando NO^{\bullet} estava dissolvido no meio aquoso, devido à formação de $ONOO^-$ e, por outro lado, na presença de membranas, para onde o NO^{\bullet} se difunde, o $O_2^{\bullet-}$ protegeu a proteína de oxidação promovida pelo *t-butOOH* devido à redução do ferro hemínico.

Sabe-se que nos primeiros estágios da apoptose ocorre a peroxidação de cardiolipina pelo *cit c*, o que resulta na separação entre membrana e proteína. Esta posteriormente seria liberada para o citosol (BAYIR *et al*, 2006), mas a presença de AST na membrana interna da mitocôndria poderia inibir esta lipoperoxidação ou, devido a alterações no pH, os índices de lipoperoxidação poderiam ser exacerbados. Em ambos os casos a sinalização da apoptose

poderia ser afetada. Por outro lado, não há dados na literatura se a AST consumida, por animais ou seres humanos, chega a esta região da célula. Portanto, são necessários mais estudos para verificar a presença deste carotenóide na membrana mitocondrial nos animais que consomem alimentos e/ou medicamentos em que a AST está presente. Assim, o presente estudo contribui com o entendimento dos mecanismos de proteção antioxidante deste carotenóide em diferentes microambientes celulares, importante para se prever a eficácia de tais compostos e terapia antioxidante.

7. Bibliografía

ALVAREZ, B.; DEMICHELI, V.; DURÁN, R.; TRUJILLO, M.; CERVENŠANSKY, C.; FREEMAN, B.A.; RADI, R.. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, p. 813-822, 2004.

ALVAREZ, B.; RUBBO, H.; KIRK, M.; BARNES, S.; FREEMAN, B. A.; RADI, R. Peroxynitrite-Dependent Tryptophan Nitration. **Chem. Res. Toxicol.** v. 9, p. 390-396, 1996.

ANDRADE, M.A.; CHACÓN, P.; MERELO, J.J.; MORÁN, F. Evaluation of Secondary Structure of Proteins from UV Circular Dichroism Using an Unsupervised Learning Neural Network. **Prot. Eng.** v. 6, p. 383-390, 1993.

AUGUSTO, O.; BONINI, M.G.; AMANSO, A.M.; LINHARES, E.; SANTOS, C.C.X.; MENEZES, S.L. Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology. **Free Radic. Biol. Med.** v. 32, p. 841-859, 2002.

BARR, D.P.; MASON, R.P. Mechanism of Radical Production from the Reaction of Cytochrome *c* with Organic Hydroperoxides. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 12709-12716, 1995.

BARROS, M.P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; PEDERSÉN, M. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-Loaded Liposomes: Scavenging Oxyradicals or changing membrane permeability? **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 288, p. 225-232, 2001.

BATTHYÁNY, C.; SOUZA, J.M.; DURÁN, R.; CASSINA, A.; CERVENŠANSKY, C.; RADI, R.. Time course and site(s) of Cytochrome *c* Tyrosine nitration by peroxynitrite. **Biochemistry** v. 44, p. 8038-8046, 2005.

BAYIR, H.; FADEEL, B.; PALLADINO, M.J.; WITASP, E.; KURNIKOV, I.V.; TYURINA, Y.Y.; TYURIN, V.A.; AMOSCATO, A.A.; JIANG, J.; KOCHANNEK, P.M.; DEKOSKY, S.T.; GREENBERGER, J.S.; SHVEDOVA, A.A.; KAGAN, V.E. Apoptotic interactions of cytochrome *c*: Redox flirting with anionic phospholipids within and outside of mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1757, p. 648-659, 2006.

BELICOVA, N.A.; VLADIMIROV, Y.A.; OSIPOV, A.N.; KAPRALOV, A.A.; TYURIN, V.A.; PATAPOVICH, M.V.; BASOVA, L.V.; PETERSON, J.; KURNIKOV, I.V.; KAGAN, V.E. Peroxidase Activity and Structural Transitions of Cytochrome *c* Bound to Cardiolipin-Containing Membranes. **Biochemistry** v. 45, p. 4998-5009, 2006.

BRUNORI, M.; GIUFFRÉ, A.; FORTE, E.; MASTRONICOLA, D.; BARONE, M.C.; SARTI, P.; Control of Cytochrome *c* Oxidase Activity by Nitric Oxide. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1655, p. 365-371, 2004.

BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. **Science** v. 224, p. 569-573, 1984.

CASSINA, A.M.; HODARA, R.; SOUZA, J.M.; THOMSON, L.; CASTRO, L.; ISCHIROPOULOS, H.; FREEMAN, B.A.; RADI, R. Cytochrome *c* Nitration by Peroxynitrite. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 21409-21415, 2000.

CUNNINGHAM, F.X.; GANTT, E. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 49, p. 557-583, 1998.

DENICOLA, A.; RADII, R.. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. **Toxicology** v. 208, p. 273-288, 2005.

DI MASCO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 274, p. 532-538, 1989.

DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids? **Annu. Rev. Biochem.** v. 66, p. 199-232, 1997.

DRUMMEN, G.P.C.; VAN LIEDERGEN, L.C.M.; DEN KAMP, J.A.F.O.; POST, J.A. C11-Bodipy^{581/591}, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Rad. Biol. Med.** v. 33, p. 473-490, 2002.

EONSEON, J.; LEE, C.G.; POLLE, J.E.W. Secondary Carotenoid Accumulation in *Haematococcus* (Chlorophyceae): Biosynthesis, Regulation, Biotechnology. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 16, p. 821-831, 2006.

FASMAN, G.D., ed. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules** New York: Plenum Press; 1996.

FEHER, G., ed. **Electron Paramagnetic Resonance with Applications to Selected Problems in Biology** New York: Gordon and Breach; 1970.

FRAGA, C.G.; LEIBOVITZ, B.E.; TAPPEL, A.L. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: Characterization and comparison with homogenates and microsomes. **Free Radic. Biol. Med.** v. 4, p. 155-161, 1988.

GABRIELSKA, J.; GRUSZECKI, W.I.; Zeaxanthin (dihydroxy- β -carotene), but not β -carotene rigidifies lipid membranes: a ¹H-NMR study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1285, p. 167-174, 1996.

GARBUZENKO, O.; ZALIPSKY, S.; QAZEN, M.; BARENHOLZ, Y.. Electrostatics on PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. **Langmuir** v. 21, p. 2560-2568, 2005.

GOLDSTEINS, G.; KEKSA-GOLDSTEINE, V.; AHTONIEMI, T.; JARONEN, M.; ARENS, E.; ÅKERMAN, K.; CHAN, P.H.; KOISTINAHO, J. Deleterious role of superoxide dismutase in the mitochondrial intermembrane space. **J. Biol. Chem.** v. 283, p. 8446-8452, 2008.

GONZALVEZ, F.; GOTTLIEB, E. Cardiolipin: Setting the Beat of Apoptosis. **Apoptosis** v. 12, p. 877-885, 2007.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus Astaxanthin: applications for human health and nutrition. **J. Nutrit.** v. 5, p. 210-216, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fourth Edition. Oxford: Oxford University Press; 2007.

HERSLETH, R.P.; RYDE, U.; RYDBERG, P.; GÖRBITZ, C.H.; ANDERSSON, K.K. Structures of the High-Valent Metal-Ion Haem-Oxygen Intermediates in Peroxidases, Oxygenases and Catalases. **J. Inorg. Biochem.** v. 100, p. 460-476, 2006.

HOOK, G.E.R. Investigation of phospholipids of the pulmonary extracellular lining by electron paramagnetic resonance. **Biochem. J.** v. 223, p. 533-542, 1984.

JANG, B.; HAN, S.; Biochemical Properties of Cytochrome c Nitrated by Peroxynitrite. **Biochimie** v. 88, p. 53-58, 2005.

KAGAN, V.E.; BORISENKO, G.G.; TYURINA, Y.U.; TYURIN, V.A.; JIANG, J.; POTAPOVICH, A.I.; KINI, V.; AMOSCATO, A.A.; FUJII, Y. Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, p. 1963-1985, 2004.

KAGAN, V.E.; TYURIN, V.A.; JIANG, J.; TYURINA, Y.Y.; VLADIMIR, B.R.; AMOSCATO, A.A.; OSIPOV, A.N.; BELIKOVA, N.A.; KAPRALOV, A.A.; KINI, V.; VLASOVA, I.I.; ZHAO, Q.; ZOU, M.; DI, P.; SVISTUNENKO, D.A.; KURNIKOV, I.V.; BORISENKO, G.G. Cytochrome c Acts as a Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors. **Nature Chem. Biol.** v. 1 p. 223-232, 2005.

KAPRALOV, A.A.; KURNIKOV, I.V.; VLASOVA, I.I.; BELIKOVA, N.A.; TYURIN, V.A.; BASOVA, L.V.; ZHAO, Q.; TYURINA, Y.Y.; JIANG, J.; BAYIR, H.; VLADIMIROV, Y.A.; KAGAN, V.E. The Hierarchy of Structural Transitions Induced in Cytochrome c by Anionic Phospholipids Determines its Peroxidase Activation and Selective Peroxidation During Apoptosis in Cells. **Biochemistry** v. 46, p. 14232-14244, 2007.

KAWAI, C.; PRADO, F.M.; NUNES, G.L.; DI MASCIO, P.; CARMONA-RIBEIRO, A.M.; NANTES, I.L. pH-Dependent interaction of cytochrome c with mitochondrial mimetic membranes: the role of an array of positively charged amino acids. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 34709 – 34717, 2005.

KARLSSON, L.; IKONEN, E.; MITANS, A.; HANSSON, S. The diet of salmon (*Salmo salar*) in the Baltic Sea and connections with the M74 syndrome. **AMBIO** v. 28, p. 37-42, 1999.

KLEIN, C. Nitric Oxide and the other Cyclic Nucleotides. **Cellular Signal.** v. 14, p. 493-498, 2002.

KHOSCHSORUR G.A.; WINKLHOFER-ROOB B.M.; RABL H.; AUER T.; PENG Z., SCHAUR R.J. Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. **Chromatographia** v. 52, p. 181-184, 2000.

KORSHUNOV, S.S.; KRASNIKOV, B.F.; PEREVERZEV, M.O.; SKULACHEV, V.P. The Antioxidant Functions of Cytochrome c. **FESB Lett.** v. 462, p. 192-198, 1999.

- LIU, X.; KIN, C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. **Cell** v. 86, p. 147-157, 1996.
- LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of Reactive Oxygen Species by the Mitochondrial Electron Transport Chain. **J. Neurochem.** v. 80, p. 780-787, 2002.
- MARTIN-ROMERO, F.J.; GUTIÉRREZ-MARTIN, Y.; HENAO, F.; GUTIÉRREZ-MERINO, C.; Fluorescence Measurements of Steady State Peroxynitrite Production upon SIN-1 Decomposition: NADH Versus Dihydrodichlorofluorescein and Dihydrododamine 123. **J. Fluoresc.** v. 14, p. 17-23, 2003.
- MAUREN, E.L.; NASCIMENTO, O.R.; BAPTISTA, M.S.; DI MASCIO, P.; PRADO, F.M.; FALJONI-ALARIO, A.; ZUCCHI, M.R.; NANTES, I.L. Changes in the Spin State and Reactivity of Cytochrome c Induced by Photochemically Generated Singlet Oxygen and Free Radicals. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 39214-39222, 2004.
- MAYNE, S.T. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. **FASEB J.** v. 10, p. 690-701, 1996.
- MCMILLIN, J.B.; DOWHAN, W. Cardiolipin and apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1585, p. 97-107, 2002.
- MCNULTY, H.P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, F.S.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1768, p. 167-174, 2007.
- MACNULTY, H.P.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions. **Am. J. Cardiol.** v. 101, p. 20-29, 2008.
- MIKI, W. Biological function and activities of animal carotenoids. **Pure Appl. Chem.** v. 63, p. 141-146, 1991.
- MOLECULAR PROBES. Disponível em: <<http://www.probes.com>>. Acesso em: 14/08/2005.
- MULLER, F.L.; LIU, Y.; VAN REMMEN, H. Complex III Releases Superoxide to both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 49064-49073, 2004.
- MUGNOL, K.C.U.; ANDO, R.A.; NAGAYASU, R.Y.; FALJONI-ALARIO, A.; BROCHSZTAIN, S.; SANTOS, P.S.; NASCIMENTO, O.R.; NANTES, I.L. Spectroscopic, Structural, and Functional Characterization of the Alternative Low-Spin State of Horse Heart Cytochrome c. **Biophys. J.** v. 94, p. 4066-4077, 2008.
- NAGAMI, H.; YOSHIMOTO, N.; UMAKOSHI, H.; SHIMANOUCI, T.; KUBOI, R.; Liposome-assisted activity of Superoxide Dismutase under oxidative stress. **J. Biosc. Bioeng.** v. 99, p. 423 – 428, 2005.
- NANTES, I.L.; FALJONI-ALÁRIO, A; NASCIMENTO, O.R.; BANDY, B.; GATTI, R.; BECHARA, E.J.H.; Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome c by tert-butyl hydroperoxide: A magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. **Free Radic. Biol. Med.** v. 28, p. 786-796, 2000.

- NANTES, I.L.; ZUCCHI, M.R.; NASCIMENTO, O.R.; FALJONI-ALARIO, A. Effect of Heme Iron Valence State on the Conformation of Cytochrome *c* and its Association with Membrane Interfaces. A CD and EPR Investigation. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 153-158, 2001.
- OTT, M.; ROBERTSON, J.D.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cytochrome *c* Release From Mitochondria Proceeds by a Two-Step Process. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 99, p. 1259-1263, 2002.
- PALOZZA, P.; BARONE, E.; MANCUSO, C.; PICCI, N. The Protective Role of Carotenoids Against 7-keto-cholesterol Formation in solution. **Mol. Cell Biochem.** v. 309, p. 61-68, 2008.
- PANASENKO, O.M.; SHAROV, V.S.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Interaction of peroxynitrite with carotenoids in human low density lipoproteins. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 373, p. 302-305, 2000.
- PASHKOW, F.J.; WATUMULL, D.G.; CAMPBELL, C.L. Astaxantin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. **Am. J. Cardiol.** v. 101, p. 58-68, 2008.
- PEREVERZEV, M.O.; VYGODINA, T.V.; KONSTANTINOV, A.A.; SKULACHEV, V.P. Cytochrome *c*, an Ideal Antioxidant. **Biochem. Soc. Trans.** v. 31, p. 1312-1315, 2003.
- PETTERSSON, A.; LIGNELL, A. Astaxanthin deficiency in eggs and fry of Baltic salmon (*Salmo salar*) with M74 syndrome. **AMBIO** v. 28, p. 43-47, 1999.
- RADI, R.; TURRENS, J. F.; FREEMAN, B. A. Cytochrome *c*-Catalyzed Membrane Lipid Peroxidation by Hydrogen Peroxide. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 288, p. 118-125, 1991.
- RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and Human Health. **Pharmac. Res.** v. 55, p. 207-216, 2007.
- RENGEL, D.; DIEZ-NAVAJAS, A.; SIERNA-RICO, A.; VIEGA, P.; MUGA, A.; MILICUA, J.C.G. Exogenously incorporated ketocarotenoids in large unilamellar vesicles. Protective activity against peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1463, p. 179-187, 2000.
- RIETJENS, I.M.C.M.; BOERSMA, M.G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H.M.; CNUBBEN, N.H.P.; ZANDEN, J.J.; WOUDC, H.; ALINK, G.M.; KOEMAN, J.H.. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environ. Toxic. Pharmac.** v. 11, p. 321-333, 2002.
- RODRIGUEZ, H.; DROUIN, R.; HOLMQUIST, G.P.; O'CONNOR, T.R.; BOITEUX, S.; LAVAL, J.; DOROSHOW, J.H.; AKMAN, S.A. Mapping of Cooper/Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage at Nucleotide Resolution in Human Genomic DNA by Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 17633-17640, 1995.
- RYTÖMAA, M.; KINNUINEN, P.K.J. Reversibility, of the Binding of Cytochrome *c* to Liposomes. **J. Biol. Chem.** v. 270, p. 3197-3202, 1995.
- RYTÖMAA, M.; MUSTONEN, P.; KINNUINEN, P.K.J. Reversible, Nonionic, and pH-Dependent Association of Cytochrome *c* with Cardiolipin-Phosphatidylcholine Liposomes. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 22243-22248, 1992.

- SHIBATA, A.; KIBA, Y.; NOBUYASU, A.; FUKUZAWA, K.; TERADA, H. Molecular characteristics of astaxanthin and β -carotene in the phospholipids monolayer and their distributions in the phospholipids bilayer. **Chem. Phys. Lipids** v. 113, p. 11-22, 2001.
- SINGH, R.J.; HOGG, N.; JOSEPH, J.; KONOREV, E.; KALYANARAMAN, B. The Peroxynitrite Generator, SIN-1, Becomes a Nitric Oxide Donor in the Presence of Electron Acceptors. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 361, p. 331-339, 1999.
- SINIBALDI, F.; MEI, G.; POLITICELLI, F.; PIRO, M.C.; HOWES, B.D.; SMULEVICH, G.; SANTUCCI, R.; ASCOLI, F.; FIORUCCI, L. ATP specifically drives refolding of non-native conformations of cithochrome c. **Protein Sci.** v. 14, p. 1049-1058, 2005.
- SKULACHEV, V.P. Cytochrome *c* in the Apoptotic and Antioxidant Cascades. **FEBS Lett.** v. 423, p. 275-280, 1998.
- SOCACIU, C.; BOJARSKI, P.; ABERLE, L.; DIEHL, H.A. Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. **Biophys. Chem.** v. 99, p. 1-15, 2002.
- SUJAK, A.; STRZALKA K.; GRUSZECKI, W.I.; Thermotropic phase behavior of lipid bilayers containing carotenoid pigment canthaxanthin: a differential scanning calorimetry study. **Chem. Phys. Lipids** v. 145, p. 1-12, 2007.
- TERAO, J. Antioxidant activity of β -Carotene – related carotenoids in solution. **Lipids** v. 24, p. 659-662, 1989
- VOUTILAINEN, S.; NURMI, T.; MURSU, J.; RISSANEN, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 83, p. 1265-1271, 2006.
- WAHL, R.U.R; Decomposition mechanism of 3-N-morpholinosydnonimine (SIN-1) – a density functional study on intrinsic structures and reactivities. **J. Mol. Model.** v. 10, p. 121-129, 2004.
- WATTS, A.; HARLOS, K.; MASCHKE, W.; MARSH, D. Control of the structure and fluidity of phosphatidylglycerol bilayers by pH titration. **Biochim. Biophys. Acta** v. 510, p. 63-74, 1978.
- WICKMAN, H.H.; KLEIN, M.P.; SHIRLEY, D.A.; Paramagnetic Resonance of Fe^{3+} in Polycrystalline Ferrichrome A. **J. Chem. Phys.** v. 42, p. 2113-2117, 1965.
- WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R.A. Transbilayer Phospholipids Movement and the Clearance of Apoptotic cells. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1585, p. 53-63, 2002.
- WISNIEWSKA, A.; WDOMSKA, J.; SUBCZYNSKI, W. Carotenoid-membrane interactions in liposomes: effect of dipolar, monopolar, and nonpolar carotenoids. **Acta Bioch. Pol.** v. 55, p 475-484, 2006.
- WOODALL, A.A.; BRITTON, G.; JACKSON, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship

between carotenoid structure and protective ability. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1336, p. 575-586, 1997.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M.; Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 385, p. 20-27, 2000.

YUAN, J.P.; CHEN, F. Purification of *trans*-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. **Food Chem.** v. 68, p. 443-448, 2000.

Lista de Anexos

- Anexo A: Símula Curricular

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)