



UFG

INSTITUTO DE FÍSICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA EXPERIMENTAL E APLICADA

JORGE LUIZ V. ANJOS

**INTERAÇÕES DA ALBUMINA DE SORO BOVINO COM SURFACTANTES E
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES SOBRE A OXIDAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DE
BAIXA DENSIDADE INDUZIDA POR ÍONS DE COBRE**

GOIÂNIA

2012

JORGE LUIZ V. ANJOS

**INTERAÇÕES DA ALBUMINA DE SORO BOVINO COM SURFACTANTES E
EFEITOS DE ANTIOXIDANTES SOBRE A OXIDAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DE
BAIXA DENSIDADE INDUZIDA POR ÍONS DE COBRE**

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Física Experimental e Aplicada.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO ALONSO

GOIÂNIA

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

A599i Anjos, Jorge Luiz Vieira.
Interações da albumina de soro bovino com surfactantes e efeitos de antioxidantes sobre a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade induzida por íons de cobre [manuscrito] / Jorge Luiz Vieira Anjos. - 2012.
145 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Física, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas e siglas.

1. Albumina – Bovino. 2. Lipoproteína de baixa densidade (LDL) – Humano – Oxidação. I. Título.

CDU: 577.112.85

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”

Albert Einstein

À MINHA FAMÍLIA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem acreditado em meus ideais e terem me condicionado para realização deste trabalho;

Ao Prof. Antônio Alonso, orientador e principalmente amigo, pela orientação, dedicação, conselhos e oportunidade oferecida para realização deste trabalho;

Aos meus colegas e professores do Instituto de Física que por diversas vezes me auxiliaram nos momentos de dificuldades com o curso e me proporcionaram momentos de descontração que tornaram os estudos mais prazerosos;

Aos colegas do laboratório de Biofísica, Adolfo, Agnaldo, Daiane Hansen, Heverton, Kelly, Rodrigo e Sebastião, pela amizade e enorme ajuda nos experimentos relacionados a este trabalho;

Aos meus familiares, avó, irmãos e sobrinhas, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado do curso, me estimularam a seguir em frente;

Ao Prof. Marcel Tabak e a Profa. Patricia Santiago, pelos experimentos e colaboração nos estudos envolvendo albuminas;

A Profa. Dulcinéia S. P. Abdalla e por seus alunos que durante uma semana tiveram toda a paciência do mundo em me ensinar em detalhes o processo de isolamento das lipoproteínas;

A Profa. Eliane Martins Lima e por suas alunas por gentilmente nos permitir usar seu laboratório para realizar os experimentos com lipoproteínas;

Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini, por ceder gentilmente o espectrômetro de RPE para realização deste trabalho;

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a pós-graduação Instituto de Física pelo auxílio financeiro;

RESUMO

O plasma humano contém principalmente grandes proteínas, com variação na composição e concentração conforme o estado fisiológico do indivíduo. Entre essas proteínas, a albumina e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) têm sido amplamente estudadas. A albumina (proteína mais abundante do plasma sanguíneo) é a responsável por importantes funções no organismo humano devido a sua excelente capacidade de se ligar e transportar pequenas moléculas. Por sua vez, a LDL (responsável pelo transporte de colesterol para as células) em sua forma oxidada está diretamente associada à aterosclerose, principal causa de doenças cardiovasculares. Na primeira parte deste trabalho, a interação da albumina de soro bovino (BSA) com os surfactantes iônicos dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) e N-hexadecil-N,N, dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato (HPS) foi estudada através da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do marcador de spin Mal-5 ligado covalentemente na cadeia lateral do resíduo Cys-34 da BSA. Na segunda parte foi estudada a oxidação da LDL humana por íons de cobre e também o potencial antioxidante dos polifenóis resveratrol, (+)-catequina e quercetina, usando a RPE de um marcador de spin derivado do ácido esteárico (5-DSA) e o método de formação de malondialdeído (MDA). **Parte I:** A dinâmica da BSA e os parâmetros termodinâmicos para transferir a cadeia lateral do nitróxido da componente de movimento mais restrito para a componente menos restrita foram monitorados através da simulação dos espectros de RPE. Enquanto o SDS e o CTAC mostraram efeitos similares na dinâmica da proteína para todas as concentrações usadas, o HPS apresentou menor efeito em concentrações acima de 1,5 mM. Em 10 mM de surfactantes e 0,15 mM de BSA, a variação da energia livre padrão de Gibbs foi consistente com a conformação da cadeia proteica mais expandida e mais exposta ao solvente, mas com um efeito menos pronunciado para o HPS. Na presença dos surfactantes, a variação de entalpia, relacionada a energia necessária para dissociar a cadeia lateral do nitróxido da proteína, foi grande, sugerindo uma menor atividade da água. A cadeia lateral do nitróxido também detectou um ambiente com maior viscosidade nas vizinhanças do Mal-5 induzida pela adição dos surfactantes. Os resultados sugerem que a interação surfactante-BSA, em altas concentrações, é afetada pela afinidade do surfactante por suas próprias micelas e agregados micelares incorporados na proteína. Complementarmente, dados obtidos com DLS (*Dynamic Light Scattering*) sugerem que as mudanças induzidas pela temperatura que são monitoradas pelo Mal-5 são mudanças locais na vizinhança do único resíduo Cys-34 da BSA. **Parte II:** O processo oxidativo induzido pelos íons de cobre resulta na peroxidação dos lipídios da LDL (evidenciado pela elevação da concentração de MDA) também pôde ser monitorado pela diminuição na dinâmica do marcador de spin 5-DSA refletida no aumento do parâmetro espectral $2A_{\parallel}$. A oxidação da LDL acarretou no aumento da barreira da energia que os marcadores de spin precisam superar para alcançar graus superiores de movimento. Todos os polifenóis estudados foram capazes de proteger completamente a LDL contra a oxidação em concentrações a partir de 30 μ M, enquanto que a proteção fornecida pelo butil-hidroxi-tolueno (BHT) se deu apenas parcialmente. Este resultado, baseado em dados da literatura, foi atribuído à capacidade dos polifenóis atuarem tanto como *scavenger* quanto como quelantes, ao passo que o BHT é capaz de atuar apenas como *scavenger* devido à presença de apenas uma única hidroxila em sua molécula.

ABSTRACT

Human plasma contains primarily large proteins, ranging in composition and concentration as the individual's physiological state. Among these proteins, albumin and low density lipoprotein (LDL) have been widely studied. The albumin (the most abundant protein in blood plasma) is responsible for important functions in the human body due to its excellent ability to bind and transport small molecules. In turn, the LDL (responsible for transporting cholesterol to the cells) in its oxidized form is directly associated with atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease. In the first part of this work, the interaction of bovine serum albumin (BSA) with the ionic surfactants sodium dodecylsulfate (SDS), cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS) was studied by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin label covalently bound to the single free thiol group of the protein. In the second part was studied the oxidation of human LDL by copper ions and also the antioxidant potential of polyphenols resveratrol, (+)-catechin and quercetin, using the EPR of a spin label, derived from stearic acid (5-DSA), and the method malondialdehyde content (MDA). **Part I:** The dynamics of the BSA and the thermodynamic parameters for transferring the nitroxide side chain from the more motionally restricted to the less restricted component were monitored through EPR spectra simulation. Whereas SDS and CTAC showed similar increases in the dynamics of the protein backbone for all concentrations used, HPS presented a smaller effect at concentrations above 1.5mM. At 10mM of surfactants and 0.15 mM BSA, the standard Gibbs free energy change was consistent with protein backbone conformations more expanded and exposed to the solvent, but with a less pronounced effect for HPS. In the presence of the surfactants, the enthalpy change, related to the energy required to dissociate the nitroxide side chain from the protein, was greater, suggesting a lower water activity. The nitroxide side chain also detected a higher viscosity environment in the vicinity of the Mal-5 induced by the addition of the surfactants. The results suggest that the surfactant-BSA interaction, at higher surfactant concentration, is affected by the affinities of the surfactant to its own micelles and micelle-like aggregates. Complementary DLS (Dynamic Light Scattering) data suggests that the temperature induced changes monitored by the Mal-5 reflects local changes in the vicinity of Cys-34 BSA residue. **Part II:** The oxidative process induced by copper ions results in lipid peroxidation of LDL (evidenced by high concentration of MDA) could also be monitored by the decrease in the dynamics of 5-DSA, reflected in increased spectral parameter $2A_{//}$. The oxidation of LDL resulted in increased energy barrier that the spin labels must overcome to achieve higher degrees of motion. All polyphenols studied were able to protect LDL completely against oxidation for concentrations from 30 μ M, whereas the protection provided by the Butylated hydroxytoluene (BHT) occurred only partially. This result, based on data from the literature, was attributed to the ability of polyphenols act as scavenger and chelating agents, while the BHT acts just like scavenger due the presence of only a single hydroxyl group in its molecule.

Lista de Figuras

Parte I

- Figura 1.1:** Sequência linear de aminoácidos da albumina de soro bovino de acordo com o modelo proposto por Brown..... 10
- Figura 1.2:** Estrutura tridimensional da HSA destacando a posição do único resíduo de cisteína (Cys-34) contendo uma representação do marcador de spin ligado covalentemente a este aminoácido.. 11
- Figura 1.3:** Estrutura da HSA mostrando os seis subdomínios em cores diferentes. É mostrado também o grupo heme encaixado no subdomínio IB da proteína. O sítio de Sudlow I é ocupado por uma molécula do fármaco varfarina, já o sítio de Sudlow II está ocupado por duas moléculas aniônicas de miristato..... 14
- Figura 1.4:** Estruturas micelares formadas por surfactantes em meios aquosos e apolares. 16
- Figura 1.5:** Representação esquemática do número de ligantes por molécula de proteína (ν) em função do logaritmo da concentração de surfactante livre..... 17
- Figura 1.6:** Representação esquemática das estruturas propostas para o complexo surfactante-proteína: (a) modelo “colar de pérolas”; (b) elipsoide prolato; (c) e (d) vista lateral e frontal, respectivamente, do modelo “hélice flexível”..... 18
- Figura 1.7:** Representação esquemática das possíveis estruturas do complexo surfactante-proteína para o modelo “colar de pérolas”: (A) Cadeia polipeptídica em torno das micelas de surfactantes; (B) micelas nucleadas em sítios hidrofóbicos da proteína. 19
- Figura 2.1:** (A) Níveis de energia Zeeman em função do campo magnético para $S = \frac{1}{2}$ e (B) espectro de RPE. A energia de separação em $H = H_r$ é $\Delta E = g\beta_e H_r$, que é igual a $h\nu$ de acordo com a condição de ressonância..... 22
- Figura 2.2:** Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = \frac{1}{2}$ como uma função do campo magnético em uma frequência constante.. 27
- Figura 2.3:** Definição dos eixos moleculares do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o objetivo. 28
- Figura 2.4:** Anisotropia espectral do nitróxido ligado a um ácido graxo orientado em um cristal. (a), (b) e (c) com o campo ao longo dos eixos principais de g e A . (d) espectro isotrópico, radical nitróxido em uma solução não viscosa e (e) espectro de pó. 29
- Figura 2.5:** (a) Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = 1$ como uma função do campo magnético. As transições de ressonância do spin eletrônico, $S = \frac{1}{2}$, são indicadas. O número de linhas do desdobramento é característico do valor do spin nuclear I ; m_I é a projeção do spin nuclear na direção do campo magnético H e m_s é a projeção do spin eletrônico. (b)

espectro de absorção e (c) primeira derivada da curva de absorção do radical nitróxido; a é a constante de desdobramento hiperfino. A posição da linha central é definida pelo fator g 30

Figura 2.6: Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente. (B) aumento na amplitude de movimento devido a inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido..... 32

Figura 2.7: Reação do marcador de spin metanotiosulfonato (MTSL), a); iodoacetamida, b); e maleimido (mal-5) com o grupo sulfidril da cadeia lateral da cisteína, c), gerando uma cadeia lateral marcada R1..... 33

Figura 2.8: Representação de um espectro de RPE do marcador de spin lipídico 5-doxil stearato em membranas de hemácias. 35

Figura 2.9: Espectros de RPE do marcador de spin TEMPOL livre em solventes com diferentes concentrações de glicerol. Os valores de viscosidade (η) estão indicados..... 36

Figura 2.10: Desenho esquemático ilustrando o movimento global de uma proteína e o movimento da cadeia lateral do nitróxido. 37

Figura 2.11: Representação de uma lisozima T4 ilustrando as mudanças na forma das linhas espectrais para marcadores de spin ligados em diferentes posições da estrutura proteína. 38

Figura 2.12: Exemplo de funções de auto-correlação para flutuações lentas e rápidas. 40

Figura 4.1: Estruturas químicas do marcador de spin Mal-5 e dos três surfactantes utilizados neste trabalho..... 44

Figura 5.1: (a) Espectros de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 38°C do marcador de spin mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (0,2 mM) em tampão fosfato pH 7,4..... 48

Figura 5.2: Modelo esquemático do marcador Mal-5 ligado covalentemente ao grupo sulfidril da proteína. Neste modelo o átomo de oxigênio do nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente S, ou com as moléculas de água do solvente, formando a componente W.. 49

Figura 5.3: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (0,2 mM; pH 7,4) tratada com diferentes concentrações do agente de relaxação paramagnética (NiCl_2)..... 50

Figura 5.4: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (pH 7,4) em diferentes concentrações. O sinal de RPE tende a reduzir de intensidade com o aumento do conteúdo de água disponível..... 51

Figura 5.5: Espectros de RPE experimental (linhas pretas) e simulado (linhas vermelhas) a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (pH 7,4) para várias concentrações de surfactantes. Os valores dos parâmetros, obtidos do melhor ajuste através do

programa NLLS, estão indicados: $\tau_c(S)$ é o tempo de correlação rotacional da componente fortemente imobilizada e NS a percentagem de marcadores desta componente.....	53
Figura 5.6: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 em BSA (pH 7,4) tratada com 10 mM de SDS para diferentes tempos de incubação.	54
Figura 5.7: Parâmetro espectral $2A_{//}$ de BSA marcada com Mal-5 em função da concentração dos três surfactantes estudados	55
Figura 5.8: Tempo de correlação rotacional, τ_c , em função da concentração de surfactante, para as componentes fortemente $\tau_c(S)$, painel superior, e fracamente imobilizada $\tau_c(W)$, painel inferior, para os três surfactantes estudados.	56
Figura 5.9: População relativa da componente S no espectro de RPE de BSA marcada com Mal-5 em função da concentração de surfactante.	57
Figura 5.10: Componente principal z do tensor hiperfino $2A_{zz}$ para a componente S em função da concentração de surfactante, obtida a partir da curva de melhor ajuste dos espectros de RPE, utilizando o programa NLLS.	58
Figura 5.11: Logaritmo natural da razão entre as populações de marcadores de spin das componentes fracamente e fortemente imobilizadas, N_w/N_s , obtidas a partir do melhor ajuste dos espectros de RPE do Mal-5 estruturado em BSA na presença e na ausência de 10 mM de surfactante, como função do recíproco da temperatura absoluta.	60
Figura 5.12: Dependência do tempo de correlação rotacional com a temperatura para as componentes fortemente ($\tau_c(S)$, painel A) e fracamente ($\tau_c(W)$, painel B) imobilizadas, obtida do espectro de melhor ajuste do marcador Mal-5 em BSA pura (círculos fechados) e BSA tratada com 10 mM de SDS (quadrados), de CTAC (triângulos) e de HPS (círculos abertos), de surfactantes.....	63
Figura 5.13: Dependência do parâmetro espectral $2A_{//}$ com a temperatura, obtida diretamente do espectro experimental do marcador Mal-5 em BSA pura e BSA tratada com 10 mM de surfactantes.	64
Figura 5.14: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA pura, num intervalo de temperatura de 25-65°C.....	65
Figura 5.15: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 4 mM (círculos) e 10 mM (triângulos) de SDS, num intervalo de temperatura de 25-65°C.	66
Figura 5.16: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 4 mM (círculos) e 10 mM (triângulos) de HPS, num intervalo de temperatura de 25-65°C.	67
Figura 5.17: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 0,5 mM (triângulos invertidos) e 10 mM (triângulos) de CTAC, num intervalo de temperatura de 25-65°C.	69

Parte II

- Figura 1.1:** Estrutura esquemática tridimensional da LDL, mostrando os domínios lipídicos, compostos principalmente por Triglicerídeos (TG), ésteres de colesterol (EC) e fosfolipídios. A molécula de colesterol também é mostrada, bem como sua possível localização na partícula. 81
- Figura 1.2:** Divisão de uma partícula de LDL estruturada em três camadas lipídicas: uma camada externa superficial, uma camada interfacial, e o núcleo. 82
- Figura 1.3:** Estresse oxidativo e peroxidação lipídica. 83
- Figura 1.4:** Mecanismos de oxidação da LDL e formação de células espumosas na parede da artéria. LDL entra na parede arterial através de endocitose nas células endoteliais. 84
- Figura 1.5:** Visão frontal de uma artéria, mostrando a evolução do processo aterosclerótico. 85
- Figura 1.6:** Teste de TBA. Reação do entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o composto colorido (cromogênio), medido espectrofotometricamente a 532 nm. 87
- Figura 1.7:** Estrutura molecular butil-hidroxi-tolueno (BHT). 89
- Figura 1.8:** Estrutura químicas básica dos flavonoides (a) e suas subclasses: (b) flavona; (c) flavonol; (d) flavonona; (e) flavonol; (f) isoflavona; (g) antocianidina. 90
- Figura 1.9:** Estrutura molecular da (+)-catequina, antioxidante usado neste trabalho. 91
- Figura 1.10:** Estrutura molecular da quercetina. 91
- Figura 1.11:** Estrutura molecular dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol. 92
- Figura 3.1:** Estrutura molecular do marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA). 95
- Figura 4.1:** Espectros RPE de 5-DSA em LDL a 5,5 mg/ml (A) e em membranas de *ghosts* de hemácias (B). 99
- Figura 4.2:** Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na LDL (5,5 mg/ml) na presença de diferentes concentrações de Cu^{2+} a 37°C. 100
- Figura 4.3:** Parâmetro espectral $2A_{\lambda/\lambda}$, de LDL marcada com 5-DSA, em função da concentração de CuSO_4 para três 1, 2 e 3 horas de incubação a 37°C. 101
- Figura 4.4:** Variação da concentração de MDA-TBA (resultante da peroxidação lipídica) e variação do parâmetro espectral $2A_{\lambda/\lambda}$ (como consequência da peroxidação lipídica) do marcador de spin 5-DSA incorporado na LDL (5,5 mg/mL) em função da concentração do CuSO_4 102
- Figura 4.5:** Espectros de RPE experimental (linha pretas) e simulado (círculos) a 25°C do marcador de spin 5-DSA inserido na LDL (pH 7,4) oxidada com 200 μM de CuSO_4 e tratada com diferentes concentrações dos antioxidantes Resveratrol, (+)-Catequina e Quercetina. Três espectros de amostras de LDL controle (não oxidada) também são apresentados. 104

Figura 4.6: (A) Parâmetro espectral $2A_{\parallel}$ e (B) tempo de correlação rotacional, obtido a partir do programa de simulação NLLS, para marcador de spin 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL submetida a oxidação com 200 μM de CuSO_4 e em função da concentração de Resveratrol, Quercetina, (+)-Catequina e BHT. 105

Figura 4.7: Variação concentração de MDA-TBA, para LDL oxidada com 200 μM de CuSO_4 , em função da concentração de antioxidante..... 106

Figura 4.8: Tempo de correlação rotacional (painel esquerdo) obtido a partir do programa de simulação NLLS, para o marcador de spin 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL em função da temperatura. No painel direito é mostrado a alteração na forma de linha dos espectros em duas temperaturas distintas, 4 e 34°C..... 107

Figura 4.9: : Gráfico de Arrhenius obtido a partir da simulação dos espectros de 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL oxidada (com 400 μM de CuSO_4) e não-oxidada (círculos vermelhos) em função do inverso da temperatura absoluta..... 108

Abreviaturas e Siglas

Parte I:

2A _{//}	. desdobramento hiperfino máximo
CD	- <i>Circular Dichroism</i> (Dicroísmo Circular)
cmc	- concentração micelar crítica
CTAB	- <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
CTAC	- <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride</i>
Cys-34	- aminoácido cisteína na posição 34 da cadeia polipeptídica da BSA.
D _h	. diâmetro hidrodinâmico médio
DLS	- <i>Dynamic Light Scattering</i> (Espalhamento de Luz Dinâmico)
DSC	- <i>Differential scanning calorimetry</i> (Calorimetria Diferencial de Varredura)
HPS	- N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato
HSA	- <i>Human serum albumin</i> (Albumina de Soro Humano)
MAL-5	- 2,2',5,5'-tetramethyl-3-maleimidopyrrolidinyl-N-oxyl
MAL-6	- 2,2,6,6- tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl
n-DSA	- n-doxil estearato
NLLS	- <i>nonlinear least-squares</i>
ORD	- <i>Optical Rotatory Dispersion</i> (Dispersão Óptica Rotatória)
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salina)
RPE	- Ressonância Paramagnética Eletrônica
SAXS	- <i>Small-angle X-ray scattering</i> (Espalhamento de raios-X a baixo ângulo)
SDS	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)

Parte II:

AAPH	- <i>2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride</i>
ApoB-100	- apolipoproteína B-100
BHT	- butil-hidroxi-tolueno
ECs	- ésteres de colesterol
EDTA	- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilendiamino tetra-acético)
EROs	- espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
HDL	- (<i>High Density Lipoprotein</i>) lipoproteína de alta densidade
MDA	- malondialdeído
OxLDL	- LDL oxidada
PMSF	- <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil)
TBA	- <i>Thiobarbituric Acid</i> (ácido tiobarbitúrico)
TG	- triacilgliceróis
VLDL	- <i>Very Low Density Lipoprotein</i> (lipoproteína de densidade muito baixa)
τ_c	- tempo de correlação rotacional

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
Lista de Figuras	v
Abreviaturas e Siglas.....	1
PARTE I	
1 Introdução.....	7
1.1 Características Gerais da Albumina de Soro Bovino.....	9
1.1.1 Aspectos estruturais	9
1.1.2 Efeitos do aquecimento sobre a albumina	12
1.1.3 Ligação de moléculas à albumina	13
1.1.4 Interação Proteína-Surfactante	15
2 Aspectos Teóricos das Técnicas Utilizadas neste Trabalho.....	19
2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	19
2.1.1 O Fenômeno de Ressonância.....	20
2.1.2 Interação Hiperfina e Hamiltoniana de Spin	24
2.1.3 Análise dos Espectros de RPE.....	27
2.1.4 Marcadores de Spin	29
2.1.5 Estudo de Proteínas: estrutura e dinâmica	32
2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico	38
3 Objetivos	42
3.1 Objetivos Gerais	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 Materiais e Métodos	43
4.1 Materiais	43
4.2 Métodos.....	43
4.2.1 Marcação da BSA com o marcador de spin derivado do maleimido.....	43
4.2.2 Medidas de RPE	44
4.2.3 Medidas de DLS	46
5 Resultados	47

5.1	Espectros de RPE de BSA marcada com MAL-5	47
5.2	Efeitos de Surfactantes na Dinâmica da BSA	52
5.3	Perfil Termodinâmico do Marcador de Spin	59
5.4	Efeitos dos Surfactantes Avaliados por Espalhamento de Luz Dinâmica	65
6	Discussão	70
7	Conclusões	76
PARTE II		
1	Introdução	79
1.1	Características Gerais da LDL	80
1.2	Consequências da Oxidação da LDL	82
1.2.1	<i>Mecanismos de Oxidação da LDL</i>	85
1.3	Antioxidantes	88
1.3.1	<i>Flavonóides</i>	89
1.3.2	<i>Resveratrol</i>	92
2	Objetivos	94
2.1	Objetivos Gerais:	94
2.2	Objetivos Específicos	94
3	Materiais e Métodos	95
3.1	Materiais	95
3.2	Métodos	95
3.2.1	<i>Isolamento da LDL</i>	95
3.2.2	<i>Oxidação da LDL por Íons de Cobre</i>	96
3.2.3	<i>Determinação da formação de Malondialdeído (MDA)</i>	97
3.2.4	<i>Marcação dos lipídios da LDL</i>	97
3.2.5	<i>Medidas de RPE</i>	98
4	Resultados	99
4.1	Espectros de RPE de LDL marcada com 5-DSA e Oxidada por Íons de Cobre	99
4.2	Efeito Antioxidante do Resveratrol e dos Flavonóides Quercetina e (+)-Catequina	103
4.3	Efeito da temperatura sobre a LDL oxidada e não oxidada	107
5	Discussão	109
5.1	Características dos espectros de RPE de 5-DSA em LDL	109

5.2	Eficiência do resveratrol, da quercetina e da (+)-catequina como antioxidante em comparação com o BHT	110
5.3	Efeito da Temperatura	114
6	Conclusões	116
7	Perspectivas	117
8	Bibliografia Parte I e II	118
	Apêndice	130
	A. Trabalhos Desenvolvidos Durante o Doutorado	130

PARTE I

**INTERAÇÃO DA ALBUMINA DE SORO BOVINO COM
SURFACTANTES IÔNICOS AVALIADOS POR
RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA**

1 Introdução

Albumina de soro é a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, com concentração típica de aproximadamente 40 g/L (~0,6 mM) [1]. Várias funções importantes para o organismo humano são atribuídas à albumina, tais como: manutenção da pressão osmótica sanguínea, manutenção do pH do plasma, efeito antioxidante, marcadora de nutrição e longevidade, transporte de fármacos, entre outras. Devido à importância fisiológica da albumina, a relativa facilidade com a qual pode ser isolada e purificada em grande escala e o fato de ser um excelente ligante de uma variedade de moléculas, as albuminas têm sido empregadas em um grande número de estudos biofísicos e bioquímicos. Além disso, o fato da albumina humana (HSA - do inglês *human serum albumin*) ter sido cristalizada há poucos anos, tem estimulado pesquisas relacionadas à interação das albuminas com outras proteínas e com pequenas moléculas, visando entender melhor sua função transportadora e sua funcionalidade como marcador de doenças nutricionais.

A albumina de soro bovino (BSA – do inglês *Bovine Serum Albumin*) é comumente utilizada como padrão em pesquisas relacionadas a estudos sobre as albuminas em geral, isto se deve ao fato da BSA ser mais viável economicamente, além de possuir uma estrutura primária muito similar à estrutura da albumina humana. Além disso, devido a sua alta estabilidade e por ser uma proteína com composição e peso bem definidos, BSA é frequentemente utilizada como referência para quantificação de outras proteínas de peso desconhecido.

É sabido da literatura que a albumina tem alta afinidade por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados, e também é capaz de formar ligações covalentes com vários metais, tais como Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II) e Au(II) [2]. Como uma proteína de transporte multifuncional, a albumina é o principal carreador de ácido nítrico e a principal carreador de ácidos graxos no sangue. E, é graças a esta função que os ácidos graxos são distribuídos por todo corpo humano, caso contrário, devido à insolubilidade desta classe de moléculas no ambiente aquoso, sua distribuição ficaria comprometida [3]. A grande maioria dos estudos envolvendo albuminas visa obter informações que contribuam para elucidar os mecanismos relacionados a sua alta capacidade em transportar pequenas moléculas. Uma classe de ligantes estudada em detalhes é a classe dos surfactantes, especialmente os derivados do sulfato aniônico e sulfonados de diferentes comprimentos de cadeia.

A interação entre pequenas moléculas e macromoléculas biológicas, em geral, se dá por quatro diferentes maneiras: pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas [4]. Entretanto, alguns autores acreditam que nas albuminas a natureza das interações com pequenos ligantes é essencialmente de origem eletrostáticas [5]. Neste contexto, em estudo recente, no qual o comportamento termodinâmico da BSA ligada ao ácido aurintricarboxílico (ATA) foi avaliado, Bardhan e colaboradores mostraram que tanto interações hidrofóbicas quanto eletrostáticas são importantes [6].

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica muito utilizada em estudos de biomoléculas, devido a sua alta sensibilidade em reportar pequenas alterações nos sistemas de interesse. Em alguns casos, para se realizar esses tipos de estudos é necessário introduzir no sistema biológico uma espécie de sonda repórter (marcadores de spin) contendo um elétron desemparelhado que responde a campos magnéticos aplicados. Em proteínas, em geral, um marcador de spin é ligado covalentemente a um grupo sulfidril livre. Assim, os espectros gerados nos experimentos de RPE refletem de forma indireta o comportamento da região da proteína em que a sonda se encontra. Os espectros de RPE de proteínas são geralmente caracterizados pela coexistência de duas componentes espectrais, que refletem duas populações distintas de marcadores de spin. Estas componentes são comumente mencionadas na literatura como fortemente e fracamente imobilizadas, sendo associadas a dois diferentes estados de movimento na escala de tempo do RPE (9,4 GHz). A interpretação destas duas componentes será apresentada e discutida com mais detalhes na próxima seção. Desta forma, a RPE mostra-se uma técnica muito importante para se estudar as modificações em regiões específicas de proteínas quando estas se ligam a outras moléculas.

Entender a ligação de moléculas às proteínas é de grande importância em aplicações farmacêuticas, principalmente no que se refere à entrega de fármacos. É amplamente aceito que a eficácia de muitos fármacos em alcançar efeitos terapêuticos no corpo humano depende da sua afinidade com a albumina de soro [7, 8, 9]. Embora haja diversos estudos relacionados à interação de surfactantes com proteínas, os mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, o estudo da interação da BSA com surfactantes nos permite avaliar as alterações biofísicas nesta proteína, tais como, mudança local de viscosidade e alterações dinâmicas quando o complexo BSA-surfactante é formado,

possibilitando uma maior compreensão das propriedades biofísicas deste sistema, fornecendo subsídios para propor modelos mais gerais que visam aplicações em áreas biomédicas e farmacêuticas.

1.1 Características Gerais da Albumina de Soro Bovino

1.1.1 Aspectos estruturais

Nos mamíferos, a albumina de soro é sintetizada inicialmente como prealbumina pelo fígado, convertida em proalbumina e por fim em albumina. A albumina enviada para a circulação sanguínea possui uma meia-vida de aproximadamente 19 dias e a diminuição de sua quantidade no plasma pode estar relacionada à desnutrição, a uma dieta pobre em proteínas, a alguma doença hepática, ou também pode ser o resultado de alguma doença renal que permite que a albumina escape pela urina [10, 11].

O primeiro modelo molecular para a BSA foi proposto por Joseph F. Foster, mas foi Brown quem apresentou sua sequência linear, no mesmo ano em que foi proposta a sequência linear da HSA. Segundo Foster e Brown, a albumina bovina consiste de um acoplamento flexível de domínios semi-independentes, com massa de 66 kDa, composta de 582 resíduos de aminoácidos e três domínios (I, II e III), os quais são arranjados em uma única cadeia polipeptídica. Na albumina bovina há 17 pontes dissulfeto, que contribuem para manter sua estrutura terciária e que resultam em 9 loops, os quais estão arranjados de maneira similar aos da HSA (Figura 1.1). Nenhuma dessas pontes dissulfeto são acessíveis a agentes redutores em um intervalo de pH de 5 a 7,4. Por outro lado, estas pontes dissulfeto se tornam vulneráveis quando o pH do meio atinge valores extremos. De acordo com Carter e He [11], tanto a BSA quanto a HSA possuem apenas um único grupo tiol livre (-SH), Cys-34, inserido em um “bolso” de 9,5 Å, próximo a três grupos polares de Asp-38, His-39 e Tyr-84. A disponibilidade de grupos tíóis livres nas albuminas pode resultar em formação de dímeros entre as proteínas e até em ligações cruzadas entre as cadeias polipeptídicas, o que compromete estudos que visam investigar a interação entre proteína e moléculas ligantes [14].

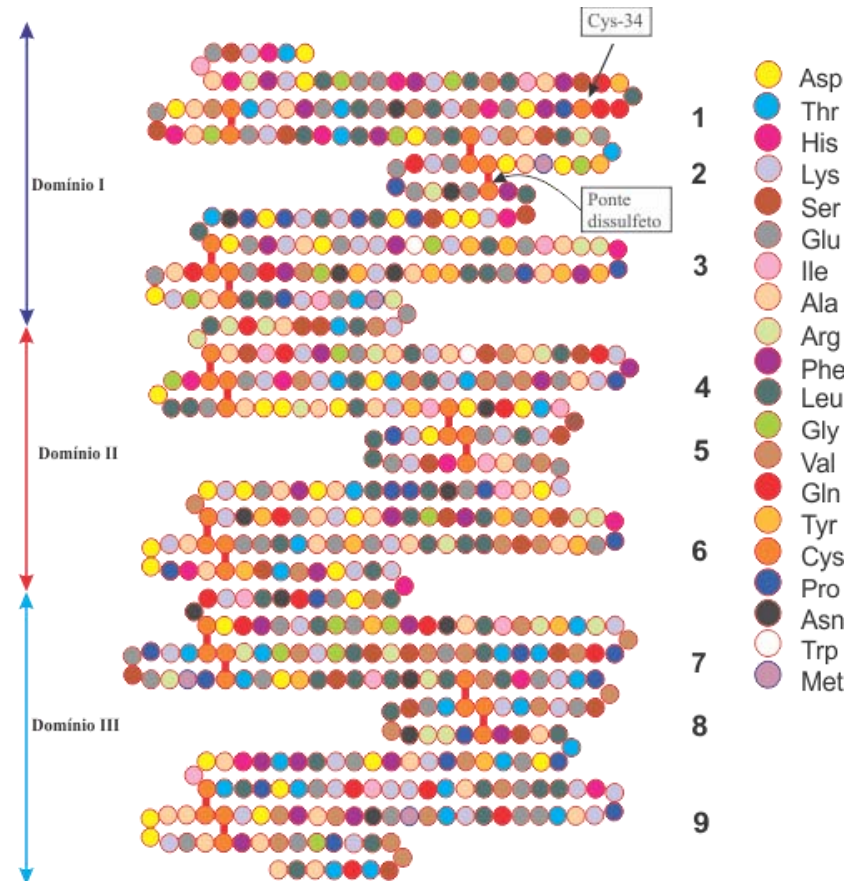


Figura 1.1: Sequência linear de aminoácidos da albumina de soro bovino de acordo com o modelo proposto por Brown [12]. A posição o aminoácido Cys-34 também está indicado. Figura adaptada da referência [13].

Devido à alta sensibilidade do grupo tiol às mudanças conformacionais da albumina, sua reatividade é frequentemente afetada pela presença de moléculas ligantes. Por exemplo, os ácidos graxos, que se ligam a locais específicos da albumina, e relativamente distantes do Cys-34, induz mudanças conformacionais no sítio da cisteína e pode aumentar a capacidade deste aminoácido em formar pontes de dissulfeto [15, 1]. A maioria dos estudos de albuminas por RPE somente é possível devido à este único grupo tiol livre presente na cadeia polipeptídica desta proteína. Estudos anteriores realizados por nosso grupo mostraram a eficiência da técnica de RPE e do método de marcadores de spin no estudo das modificações em proteínas devido a interações com outras moléculas [16, 17, 18]. Outro importante papel desempenhado pelo grupo tiol da albumina está relacionado ao combate de radicais livres. Experimentos *in vitro* mostraram que a albumina protege as lipoproteínas de baixa densidade da oxidação por cobre e hemólise de hemácias devido a danos provocados por radicais livres nas membranas [19]. Em geral, as albuminas protegem as células principalmente por eliminação direta de espécies reativas de oxigênio [20, 21].

Outro fator que desperta interesse de pesquisadores está relacionado à capacidade da albumina de estabilizar e transportar óxido nítrico (NO) no plasma. Esta propriedade, a qual é dependente da reatividade do resíduo Cys-34 com o NO (gerando um grupo S-Nitroso), é altamente influenciada por seu ambiente e regulada por seu controle alostérico. Stamler et al. [22] demonstraram que proteínas S-nitrosiladas são formadas sob condições fisiológicas e possuem efeitos de vasodilatação e inibição plaquetária. Essas observações sugeriram que grupos S-nitrosotíóis podem servir como intermediários no metabolismo celular do NO e podem ser um mecanismo regulatório adicional. Usando BSA e nitrito de sódio (NaNO_2) em meio ácido e espectroscopia de absorção, esses autores evidenciaram que o resíduo Cys-34 pode servir como carreador de NO e é provavelmente o principal fornecedor para células musculares lisas [22, 23]. Desta forma, o estudo da interação de moléculas com a região da proteína em que se encontra o grupo Cys-34 é importante para elucidar as funções desempenhadas pela albumina.

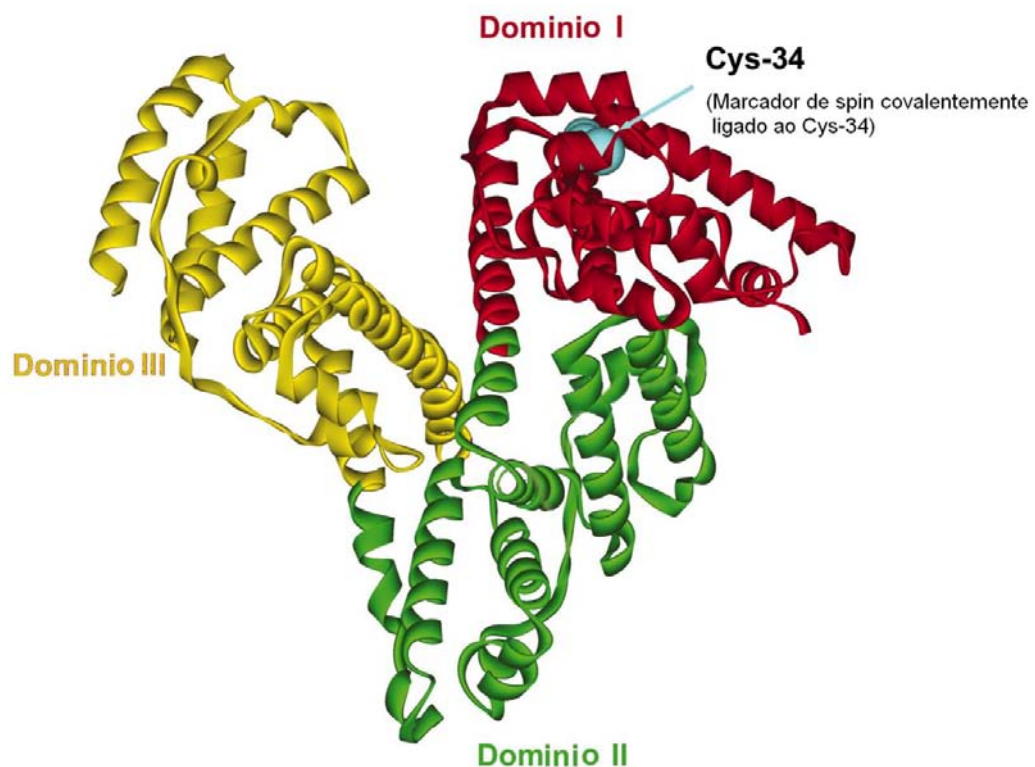


Figura 1.2: Estrutura tridimensional da HSA, os domínios I, II e III são destacados em diferentes cores. A posição do único resíduo de cisteína (Cys-34) contendo uma representação do marcador de spin ligado covalentemente a este aminoácido também é mostrada. Figura adaptada a referência [24].

A albumina bovina é altamente homóloga a albumina humana, com cerca de 76% de suas sequências de aminoácidos idênticas, o que confere a BSA características bioquímicas e biofísicas similares as da HSA, isto é, ambas as proteínas apresentam funções biológicas similares [13]. As albuminas são caracterizadas por seu baixo conteúdo de triptofano (Trp) e metionina (Met) e um alto conteúdo de cisteína e de aminoácidos carregados, tais como os ácidos aspártico (Asp) e glutâmico (Glu). Enquanto a BSA apresenta dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212) a HSA possui apenas um (Trp-214). Além disso, a diferença entre a albumina bovina e a albumina humana no sítio N-terminal resume-se a um aminoácido, sendo Asp-Thr-His para BSA e Asp-Ala-His para HSA. Segundo Carter et al. [25], na estrutura terciária da HSA há um alto conteúdo de α -hélices (~67%), veja Figura 1.2, mas não há qualquer estrutura secundária do tipo folhas- β (β -sheet). Embora a conformação da BSA seja altamente similar a da HSA, até o momento sua estrutura tridimensional ainda não foi caracterizada.

Segundo Peters [13] a albumina possui uma distribuição de carga assimétrica ao longo de sua estrutura primária. A carga total calculada para BSA a pH fisiológico é de -11, -7 e +1 para os domínios I, II e III, respectivamente, de modo que sua carga global é negativa. Para BSA o ponto isoelétrico (PI), que indica o pH no qual a molécula possui o mesmo número de cargas negativas e positivas, está em torno de 5,1 [25]. Variações de pH podem provocar mudanças nas estruturas de aminoácidos e, conseqüentemente, modificações na conformação da BSA, o que ocorre principalmente no intervalo de pH de 4 a 8. Para meios em que o pH é próximo de 7, as albuminas são extremamente solúveis em água ou soluções salinas. Já para pH em torno de 5, próximo ao ponto isoelétrico, a solubilidade da albumina decresce sensivelmente.

1.1.2 Efeitos do aquecimento sobre a albumina

Vários fatores importantes para o entendimento do funcionamento de células e enzimas estão relacionados ao efeito da temperatura sobre as proteínas. A grande maioria dos estudos visa entender melhor os princípios termodinâmicos por trás do enovelamento e desnaturação das proteínas quando estas, ligadas ou não a outras moléculas, são submetidas a grandes variações de temperatura. Estudos deste tipo têm fornecido ao longo dos anos importantes informações sobre as alterações nas estruturas secundárias das albuminas quando estas são submetidas ao aquecimento, o que pode levar a alterações na estabilidade,

propriedades de transportes, propriedades cinéticas e até perda irreversível de função da proteína [26]. Experimentos de estabilidade térmica da BSA mostraram que a ligação e o transporte de lipídios respondem de forma diferente em diferentes faixas de pH e forças iônicas [27]. Kuznetsov mostrou que a albumina ao ser aquecida passa por dois estágios de mudanças estruturais. O primeiro estágio que se situa numa faixa de aquecimento até 65°C é reversível, enquanto que o segundo ($T > 65^{\circ}\text{C}$) é irreversível e pode resultar em formação de estruturas do tipo folhas- β , embora nenhum destes estágios resulte em uma completa destruição da estrutura ordenada da BSA ou HSA [28, 29, 30]. Os inícios da perda da conformação estrutural e da desnaturação da albumina ocorrem para temperaturas próximas de 58°C e 65°C, respectivamente, como evidenciado por estudos de DSC [31].

A estrutura secundária da BSA submetida à desnaturação térmica e o efeito protetor do dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) contra esta desnaturação foram examinados por meio da técnica de dicroísmo circular (CD, do inglês *Circular Dichroism*) por Moriyama et al. [32]. De acordo com este estudo, as estruturas em α -hélice tendem a diminuir em aproximadamente 50% quando a temperatura atinge valores em torno de 80°C. Por outro lado, após a adição do SDS, a estrutura secundária da BSA é parcialmente protegida contra a desnaturação térmica. Já para temperaturas acima de 95°C nenhum efeito protetor é observado [32].

1.1.3 Ligação de moléculas à albumina

Talvez a propriedade mais importante das albuminas seja sua capacidade de se ligar a uma grande variedade de moléculas com diferentes características bioquímicas. Graças à flexibilidade de seus três domínios a albumina pode se adaptar facilmente aos diversos tipos de ligantes. Como mencionado anteriormente, a albumina tem uma grande afinidade por ácidos graxos, hematina, pequenos compostos carregados e é capaz de inativar vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. Além disso, ela forma ligações covalentes com fosfato piridoxil, glutatona e vários metais como cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro [13]. Em geral, ânions orgânicos hidrofóbicos e lipídios de cadeia graxa longa se ligam mais fortemente as albuminas que pequenas moléculas, tais como compostos hidrofóbicos menores, triptofano e ácido ascórbico. Hamilton e colaboradores, usando fragmentos de BSA, mostraram que há dois fortes sítios de ligação para lipídios de cadeia longa no domínio III,

um forte sítio no domínio I, e um fraco sítio no domínio II [33]. Na tabela 1.1 são mostrados os valores das constantes de ligação para diferentes compostos à albumina.

Tabela 1.1: Constantes de ligação (K_A) de alguns compostos e fármacos que se ligam à albumina. [5, 13]

Compostos aniônicos e neutros	K_A (M^{-1})	Compostos catiônicos e íons inorgânicos	K_A (M^{-1})
Ácidos graxos de cadeia longa	$1 - 69 \cdot 10^7$	Cloropromazina	$2,0 \cdot 10^5$
Esteróides - progesterona	$3,6 \cdot 10^5$	Imipramina	$2,4 \cdot 10^4$
Esteróides - testosterona	$2,4 \cdot 10^4$	Pamaquina	$6,4 \cdot 10^7$
Bilirrubina	$9,5 \cdot 10^7$	Lidocaína	$1,3 \cdot 10^5$
L-triptofano	$1,0 \cdot 10^4$	Cl^-	$6,1 \cdot 10^1$
Cu (II)	$1,5 \cdot 10^{16}$	Ni^{++}	$3,0 \cdot 10^5$
Zn (II)	$3,4 \cdot 10^4$	Mn^{++}	$2,4 \cdot 10^4$
SDS*	$2,5 \cdot 10^4$	CTAC*	$2,6 \cdot 10^5$

*Valores obtidos da referência [34], para pH 5,0

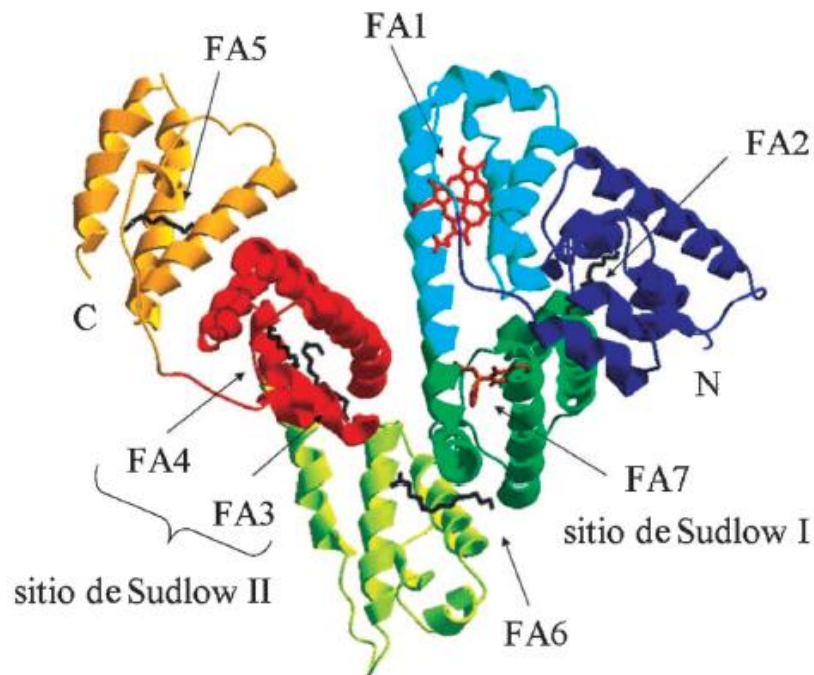


Figura 1.3: Estrutura da HSA mostrando os seis subdomínios em cores diferentes: subdomínio IA em azul, subdomínio IB em ciano; subdomínio IIA em verde escuro; subdomínio IIB em verde claro; subdomínio IIIA em vermelho; e o subdomínio IIIB em laranja. É mostrado também o grupo heme (em vermelho) encaixado no subdomínio IB da proteína. O sítio de Sudlow I (no subdomínio IIA) é ocupado por uma molécula do fármaco varfarina (em marrom), já o sítio de Sudlow II (no subdomínio IIIA) está ocupado por duas moléculas aniônicas de miristato. Figura adaptada de [35].

Um fator interessante é que a interação entre albumina e moléculas ligantes pode ser acompanhada por mudanças conformacionais da proteína. Alterações na estrutura da BSA devido à ligação com pequenas moléculas têm sido amplamente estudada por várias técnicas, tais como fluorescência, RMN, técnicas de espalhamento (SAXS, DLS, Raman), espectrofotometria UV, dicroísmo circular (CD), Dispersão Óptica Rotatória (ORD do inglês *Optical Rotatory Dispersion*), e RPE. Fasano e colaboradores [35] mostraram que a albumina pode ligar até sete moléculas de ácidos graxos de cadeia longa (FAs) em diferentes sítios de ligação (Figura 1.3). No sítio FA1 os ácidos graxos são ancorados por interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. O sítio FA1 faz pontes de sal com Arg117 entre os subdomínios IB e IIA enquanto que FA2 realiza pontes de hidrogênio com Tyr150 do subdomínio IB e com Arg257 e Ser287 do subdomínio IIA. Os sítios FA3 e FA4 por sua vez estão localizados em uma grande cavidade no subdomínio IIIA que constitui o sítio de Sudlow II. FA5 está localizado dentro do subdomínio IIIB, no qual o grupo cabeça polar dos ácidos graxos fica orientado junto ao subdomínio IIIA e estabelece pontes de sal e pontes de hidrogênio com Tyr401 e Lys525. Por outro lado, nenhuma evidência clara de interações polares entre as cabeças polares dos ácidos graxos e os sítios FA6 e FA7 foi notada, sugerindo que estes sítios possuem baixa afinidade por este tipo de moléculas [35].

Qualquer alteração por menor que seja na molécula ligante pode acarretar em grandes mudanças na interação ligante-proteína. Por exemplo, o fármaco ácido iopanóico e o ácido iofenóxico que diferem entre si, respectivamente, pela presença de um grupo amino e uma hidroxila em suas estruturas, se ligam em sítios totalmente diferentes na HSA [36]. Em alguns casos a estereoespecificidade também influencia na ligação a albumina. Uma molécula de D-triptofano se liga à BSA com uma constante de ligação cerca de 100 vezes menor que o L-triptofano [5]. É aceito que os surfactantes, os quais também possuem características anfifílicas, se ligam aos mesmos sítios que os ácidos graxos [37].

1.1.4 Interação Proteína-Surfactante

Surfactantes são compostos orgânicos de características anfifílicas, isto é, são constituídos por uma cabeça polar (hidrofílica) e uma cadeia apolar (hidrofóbica) na mesma molécula. É a natureza do grupo cabeça polar que classifica os surfactantes em aniônico, catiônico, não iônico ou zwitteriônico. Quando diluídos em solução aquosa, em concentrações baixas, os surfactantes agem como eletrólitos normais, mas em concentrações altas eles

formam estruturas agregadas (micelas) com um grande número de moléculas (Figura 1.4). A concentração na qual há a formação de micelas é conhecida como concentração micelar crítica (cmc). Uma cmc baixa é favorecida pelo aumento da massa molecular da parte lipofílica da molécula, diminuição da temperatura e aumento da disponibilidade de eletrólitos [38]. As aplicações dos surfactantes incluem solubilização de membranas, proteínas, sistemas de entregas de drogas e aplicações em medicina [39]. A formação do complexo entre surfactantes aniônicos e proteínas em solução aquosa tem sido bem estabelecida [40, 41]. É sabido que os surfactantes podem interagir indiretamente com proteínas, competindo em regiões de interface óleo-água ou ar-água.

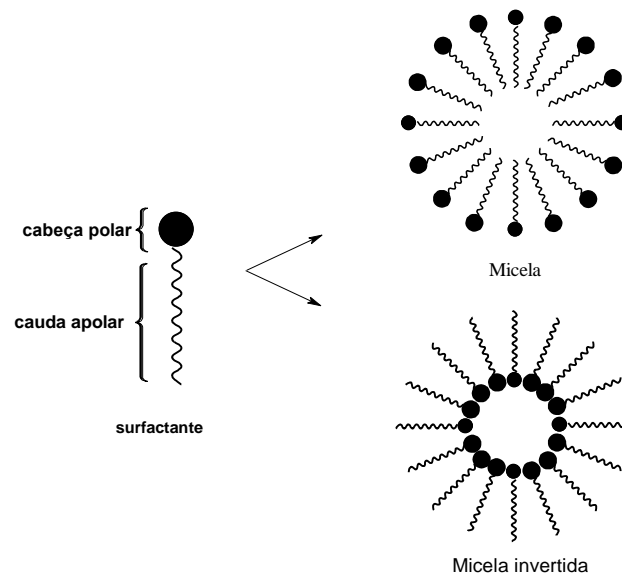


Figura 1.4: Estruturas micelares formadas por surfactantes em meios aquosos e apolares.

A isoterma de ligação, que mostra o número médio de surfactantes ligado por proteína em função do logaritmo da concentração de surfactante livre, é mostrada na Figura 1.5. Em geral a isoterma de ligação apresenta quatro regiões características distintas. A primeira região (A), em baixas concentrações (bem abaixo da concentração micelar crítica, cmc), está associada à ligação dos surfactantes a sítios específicos da proteína. Na segunda região (B) há um platô levemente inclinado que está associado às interações não cooperativas. A terceira região (C), por sua vez, corresponde ao aumento massivo nos ligantes devido às interações cooperativas entre as moléculas de surfactantes. A concentração em que ocorre a transição da segunda para a terceira região é conhecida como concentração de agregação

crítica, *cac*. Na quarta região (D), a isoterma de ligação mostra um segundo platô, estável, sugerindo que nesta região ocorre uma saturação, ou seja, não ocorre uma maior ligação do surfactante à proteína. Além disso, nesta região há uma grande formação de micelas normais quando os surfactantes são adicionados em excesso [42]. Sob condições de saturação, 1 g de proteína pode ligar a até 1,5-2 g de surfactante.

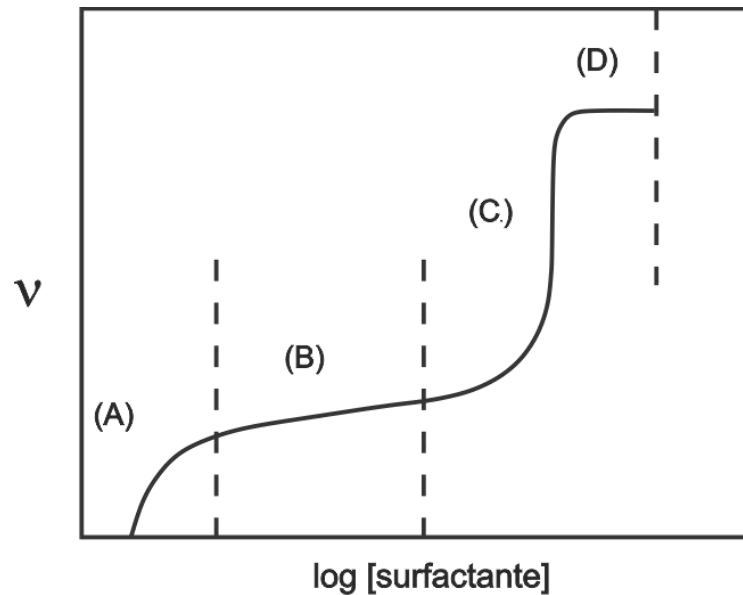


Figura 1.5: Representação esquemática do número de ligantes por molécula de proteína (v) em função do logaritmo da concentração de surfactante livre: região (A), ligação específica; região (B), ligação não cooperativa; região de ligação cooperativa (C); e região de saturação (D), [42].

A ligação específica é predominantemente eletrostática no qual os grupos polares dos surfactantes se ligam às regiões de cargas opostas nas proteínas. Por este motivo, se o pH do meio decresce, a isoterma de ligação (Figura 1.5) de surfactantes aniônicos é deslocada para esquerda, isto é, para baixas concentrações [43]. Outro fator importante que influencia as ligações específicas é o comprimento da cadeia hidrocarbônica dos surfactantes. Estudos usando uma série homóloga de surfactantes *n*-alquil sulfato e sulfonados mostraram que o número de sítios de ligação específico na BSA aumenta com o aumento da cadeia hidrocarbônica. Além disso, foi notado que o aumento da cadeia hidrocarbônica favorece o início das interações específicas em concentrações menores. Na região cooperativa, quanto maior a concentração do surfactante maior é sua ligação à BSA. Acredita-se que nesta região aconteça o desdobramento da proteína. Usando técnicas espectroscópicas, CD e ORD,

pequenas mudanças na estrutura secundária da BSA foram encontradas em soluções de surfactantes catiônicos e aniônicos, ao passo que mudanças na quantidade de hélices de 66% de BSA nativa para aproximadamente 50% na saturação foram causadas por todos os surfactantes estudados [44].

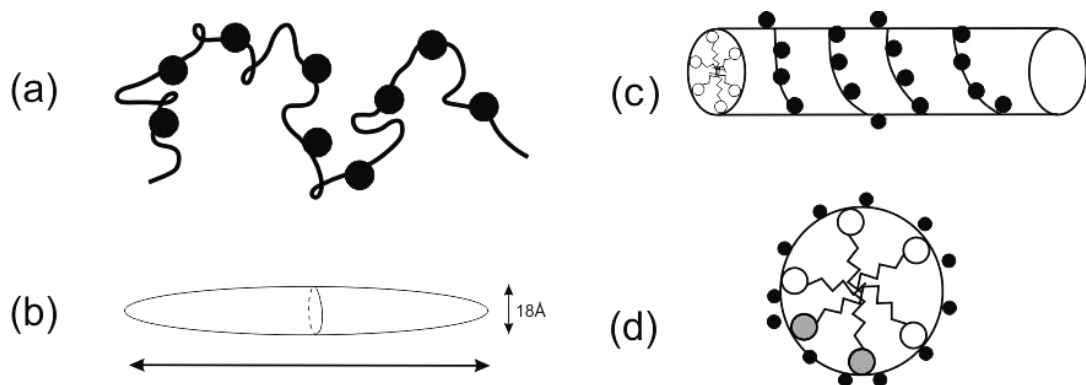


Figura 1.6: Representação esquemática das estruturas propostas para o complexo surfactante-proteína: (a) modelo “colar de pérolas”; (b) elipsoide prolato; (c) e (d) vista lateral e frontal, respectivamente, do modelo “hélice flexível”. Figura adaptada da referência [42].

Embora não se conheça completamente a estrutura do complexo surfactante-proteína, ao longo dos anos, vários modelos têm sido propostos para descrevê-lo. A grande maioria dos modelos tem emergido de estudos usando técnicas espectroscópicas, eletroforéticas e de espalhamento [43]. Destes modelos tem emergido três que foram muito bem aceitos pela comunidade científica (Figura 1.6): (a) modelo de “colar de pérolas”, o qual é caracterizado por estruturas micelares ligadas à cadeia polipeptídica da proteína; (b) modelo do elipsoide prolato, no qual as moléculas de surfactantes se agregam formando uma estrutura elipsoidal com semieixo menor de 18 Å e a cadeia polipeptídica se enrola em torno do agregado; (c) o modelo da “hélice flexível”, que é um modelo teórico que descreve o complexo micelar como um agregado de surfactantes formando um cilíndrico flexível envolvido pela cadeia polipeptídica em forma helicoidal [42]. Vale a pena mencionar ainda um quarto modelo, no qual a cadeia polipeptídica forma estruturas complexas constituídas por α -hélices e bobinas aleatórias em torno de moléculas de surfactantes distribuídas de forma desconhecida.

Dentre estes modelos citados, o modelo do “colar de pérolas” é o que mais concorda com os resultados experimentais. Neste modelo são possíveis duas estruturas distintas (Figura 1.7). Na primeira delas (Figura 1.7A) a cadeia polipeptídica se enrola na

micela, diminuindo a mobilidade da cabeça polar dos surfactantes. Na segunda (Figura 1.7B) as micelas encontram-se nucleadas nos sítios hidrofóbicos da proteína e a mobilidade das cabeças polares não é afetada. Turro e colaboradores [42], em estudo combinando as técnicas de fluorescência, RPE e RMN, concluíram que a proteína se desdobra envolta em micelas na região em que as interações são cooperativas.

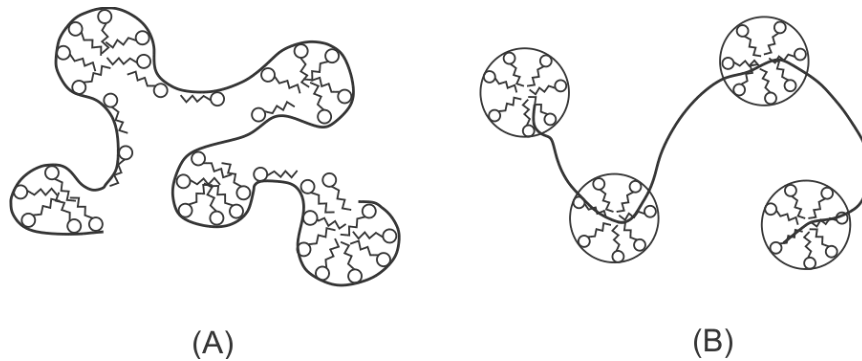


Figura 1.7: Representação esquemática das possíveis estruturas do complexo surfactante-proteína para o modelo “colar de pérolas”: (A) Cadeia polipeptídica em torno das micelas de surfactantes; (B) micelas nucleadas em sítios hidrofóbicos da proteína. Figura adaptada da referência [42].

A ligação dos surfactantes às proteínas pode ocorrer quando estes estão na forma de monômeros individuais ou quando estão na forma de clusters de micelas, dependendo da natureza da interação e da concentração de surfactante. As alterações nas características moleculares das proteínas globulares podem ser provocadas por suas interações com surfactantes, acarretando em mudanças em sua capacidade de ligar a outras moléculas, se associar a outras proteínas e também comprometer o seu poder de absorção em interfaces, alterando assim suas características funcionais.

2 Aspectos Teóricos das Técnicas Utilizadas neste Trabalho

2.1 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica é uma técnica que monitora as transições induzidas entre os *níveis Zeeman* de um sistema paramagnético situado em um campo magnético estático, ou seja, ela monitora a absorção de energia de um campo de radiação quando as moléculas mudam seu estado de energia. Ela permite ao investigador

detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados, tais como radicais livres ou complexos orgânicos, sem modificá-las. Como a maioria dos sistemas biológicos são diamagnéticos (não possuem elétrons desemparelhados) faz-se necessário o uso de sondas (marcadores de spin), moléculas que contém um radical livre estável e que podem ser inseridas no sistema de interesse. Em condições de pH e temperatura fisiológicas, os marcadores de spin reportam por meio de espectros o comportamento do microambiente no qual estão inseridos. A grande sensibilidade da técnica se deve ao fato das características espectrais serem altamente dependentes da distribuição eletrônica, orientação molecular, natureza do ambiente, e movimento molecular.

A RPE tem sido muito usada no estudo da dinâmica e mudanças conformacionais de proteínas. A maneira mais comum de se realizar tal estudo é ligando covalentemente o marcador de spin derivado do nitróxido (N–O) aos grupos tióis livres da cadeia polipeptídica da proteína. Em proteínas carentes de cisteína, este estudo pode ser realizado usando técnicas de biologia molecular [45]. Análise de espectros de diferentes marcadores de spin ligados a uma dada proteína permite ao investigador definir elementos de estrutura secundária, exposição ao solvente, caracterizar topografia e determinar orientação individual de um segmento da proteína [46].

2.1.1 O Fenômeno de Ressonância

Como todas as formas de espectroscopia, a RPE está baseada na absorção de energia de uma radiação quando um átomo ou molécula muda seu estado. Para que a transição aconteça a energia da radiação deve ser igual a diferença de energia entre os níveis fundamental e excitado, isto é

$$\Delta E = h\nu , \quad (2.1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s) e ν é a frequência da radiação. A eq. (2.1) é conhecida como condição de ressonância.

A interação de um átomo ou molécula, com momento magnético eletrônico não nulo ($\vec{\mu} \neq 0$), com um campo magnético externo (\vec{H}) produz uma energia de interação que pode ser calculada a partir da seguinte Hamiltoniana:

$$\hat{\mathcal{H}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} = \beta_e \vec{J} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} \quad (2.2)$$

Onde \vec{J} é o momento angular eletrônico, β_e é o magnéton de Bohr ($\beta_e = \frac{|e|\hbar}{2mc}$), e \vec{g} é um tensor de segunda ordem, cujo valor depende das espécies magnéticas. Como, na maioria dos casos, cerca de 99% do momento magnético de dipolo é proveniente da contribuição do momento angular de spin (\vec{S}) e considerando um campo aplicado na direção z ($\vec{H} = H\hat{z}$), a eq. (2.2) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\hat{H} = \beta_e \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} = g_{zz} \beta_e H S_z \quad (2.3)$$

onde S_z é o operador correspondente a projeção do momento angular de spin ao longo da direção do campo. As energias obtidas pela interação do campo magnético com o spin do elétron podem ser obtidas a partir da eq. de Schroedinger independente do tempo:

$$\hat{H}_m \psi_m = E_m \psi_m = g_{zz} \beta_e H m_s \psi_m \quad (2.4)$$

m_s são os valores esperados de S_z na direção do campo, o qual pode variar de $-m_s$ a $+m_s$. Como o elétron possui spin $S = \frac{1}{2}$, os estados de spin podem assumir apenas os valores $m_s = \pm \frac{1}{2}$. Dessa forma,

$$E_m = \pm \frac{1}{2} g_{zz} \beta_e H \quad (2.5)$$

O nível de energia relacionado ao estado $m_s = -1/2$ corresponde ao alinhamento antiparalelo do momento magnético em relação ao campo, enquanto o nível relacionado à $m_s = +1/2$ corresponde ao alinhamento paralelo.

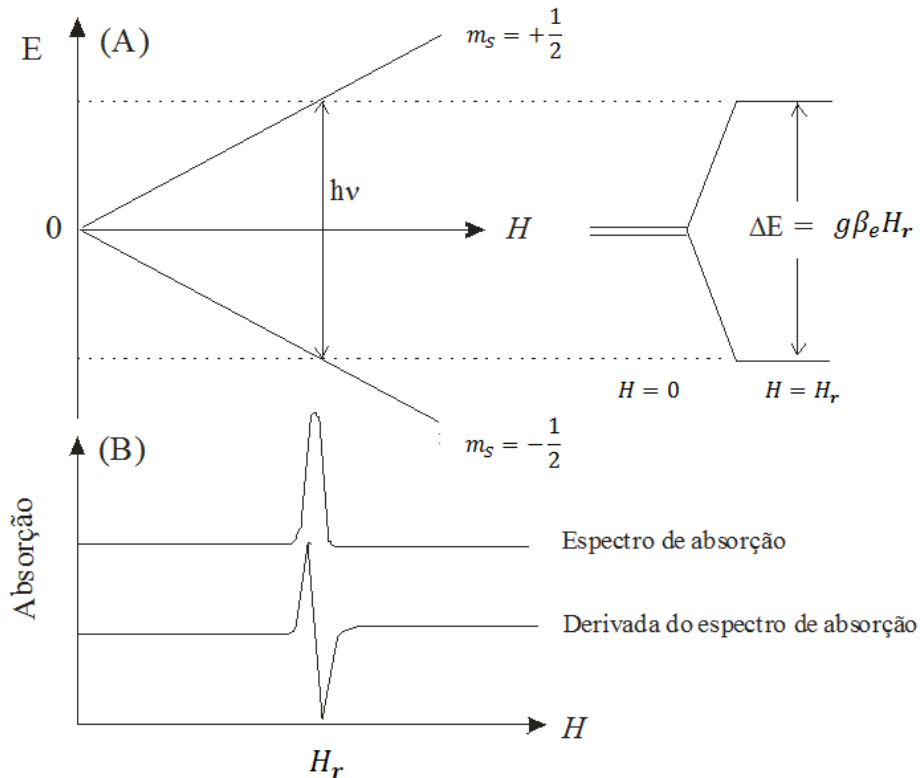


Figura 2.1: (A) Níveis de energia Zeeman em função do campo magnético para $S = \frac{1}{2}$ e (B) espectro de RPE. A energia de separação em $H = H_r$ é $\Delta E = g\beta_e H_r$, que é igual a $h\nu$ de acordo com a condição de ressonância.

A aplicação de uma radiação eletromagnética com polarização perpendicular a direção do campo magnético estático (\vec{H}) e com frequência adequada, ν (geralmente na faixa de micro-ondas para um campo de 0,35 T), resulta na absorção de energia da radiação pela espécie paramagnética em um dado valor de H_r , conhecido como campo de ressonância. Esta absorção induz transições entre as duas orientações de spin ($m_s = +1/2$ e $m_s = -1/2$) que satisfazem a condição de ressonância,

$$\Delta E = h\nu = g\beta_e H_r. \quad (2.6)$$

Na Figura 2.1 é mostrado um esquema onde estão representados os níveis de energia Zeeman e o espectro de absorção para um elétron na presença de um campo magnético estático H .

Para que o fenômeno de ressonância aconteça é necessário que haja diferença entre as populações de spin dos níveis Zeeman. A distribuição dos elétrons nesses dois níveis de energia obedece a lei de distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\left(\frac{-\Delta E}{k_B T}\right)} = e^{\left(\frac{-g\beta H}{k_B T}\right)} \quad (2.7)$$

onde N_+ e N_- são as populações dos níveis $m_s=+1/2$ e $m_s=-1/2$, respectivamente, ΔE é a diferença de energia entre esses estados, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta. Como ΔE é muito pequeno em comparação com a energia térmica $k_B T$, a expressão (2.7) pode ser reescrita como

$$\frac{N_+}{N_-} \cong 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{g\beta H}{k_B T}, \quad (2.8)$$

mostrando que há um ligeiro excesso da população N_- , o que é suficiente para detectar a absorção de energia quando a condição de ressonância é alcançada [47].

Essa diferença entre as populações de spin precisa ser mantida, caso contrário o equilíbrio se estabelece (saturação), impossibilitando a detecção de qualquer sinal de RPE. Para que isto não ocorra existem dois mecanismos que contribuem para que a energia absorvida pelos spins possa ser dissipada, permitindo assim que eles possam retornar ao estado de menor energia. Estes mecanismos são a relaxação spin-rede e a relaxação spin-spin. Na relaxação spin-rede o sistema de spins libera energia para vizinhança, na forma de calor, através de movimentos aleatórios das moléculas. Este processo de relaxação é mais eficiente quando as frequências de difusão rotacional das moléculas são similares à frequência de precessão de Larmor ou de ressonância. As linhas do espectro de RPE se tornam largas para tempos de relaxação (T_1) muito curtos. Este resultado pode ser verificado através da seguinte expressão

$$\Delta H = \frac{\hbar}{g\beta} \left(\frac{1}{2T_1}\right) \quad (2.9)$$

Já na relaxação spin-spin não há dissipação de energia, o mecanismo se dá através da interação magnética entre dois momentos magnéticos, o que pode produzir mudanças no estado dos spins, limitando seus tempos de vida no estado excitado e, conseqüentemente, afetando a largura de linha do espectro de RPE. O período de tempo necessário para que este processo ocorra é chamado de tempo de relaxação spin-spin (T_2). A largura de linha dos

espectros de ressonância é facilmente alterada pelo tempo de relaxação spin-spin, quanto maior for a largura de linha do espectro menor será T_2 . O tempo de relaxação spin-spin (T_2) se relaciona com a largura de linha da seguinte forma [48]

$$\Delta H = \frac{\hbar}{g\beta} \left(\frac{1}{T_2}\right). \quad (2.10)$$

2.1.2 Interação Hiperfina e Hamiltoniana de Spin

Um parâmetro muito importante para a técnica de RPE é o desdobramento hiperfino, o qual é proveniente da interação do momento magnético de spin do elétron desemparelhado (\vec{S}) com o momento magnético de spin nuclear de um núcleo vizinho (\vec{I}). A interação nuclear Hiperfina é a responsável pelo aparecimento de múltiplos picos nos espectros de RPE. Isto ocorre porque o elétron desemparelhado “sente” a presença não apenas do campo magnético externo, mas também do campo magnético gerado pelo momento magnético nuclear (\vec{H}_{local}). A soma vetorial desses dois campos produz um campo efetivo (\vec{H}_{ef}):

$$\vec{H}_{ef} = \vec{H}_{ext} + \vec{H}_{local} \quad (2.12)$$

A interação magnética entre os spins nuclear e eletrônico é representada pela Hamiltoniana

$$\mathcal{H} = -g_e\beta_e g_N\beta_N \left\{ \frac{(\vec{I}\cdot\vec{S})r^2 - 3(\vec{I}\cdot\vec{r})(\vec{S}\cdot\vec{r})}{r^5} - \frac{8\pi}{3} (\vec{I}\cdot\vec{S})\delta(\vec{r}) \right\} \quad (2.13)$$

onde r é a distância do elétron ao núcleo, $\delta(\vec{r})$ é a função delta de Dirac. A partir desta equação obtemos, a Hamiltoniana que descreve a interação hiperfina entre os spins nuclear e eletrônico, atuando nas variáveis de spin.

$$\hat{\mathcal{H}}_{hf} \cong \vec{I} \cdot (\vec{A}_d + a) \cdot \vec{S} = \vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{S} \quad (2.14)$$

onde \vec{A}_d é um tensor de segunda ordem, com elementos dados por

$$A_{d_{ij}} = -g_e \beta_e g_N \beta_N \left\langle \frac{r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j}{r^5} \right\rangle. \quad (2.15)$$

No segundo termo de (2.14), a é a constante de acoplamento hiperfino isotrópico e é definida por

$$a = \left(\frac{8\pi}{3} \right) g_e \beta_e g_N \beta_N |\psi(0)|^2, \quad (2.16)$$

e $|\psi(0)|^2$ é a probabilidade de se encontrar o elétron desemparelhado no núcleo. Portanto, vemos que a interação hiperfina é resultante de dois tipos de interação: a interação dipolar anisotrópica (primeiro termo de 2.13), que descreve a interação dipolar entre o momento magnético eletrônico μ_e e o momento magnético nuclear μ_N . E a interação de contato de Fermi isotrópica (segundo termo de 2.13), que está relacionada à probabilidade de se encontrar o elétron na posição do núcleo.

Para melhor ilustrar esta interação, numa aproximação clássica, o campo local paralelo ao campo externo pode ser escrito como

$$\vec{H}_{local} = \mu_{N_z} \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{r^3} \quad (2.17)$$

onde μ_{N_z} é a componente do momento magnético nuclear ao longo da direção do campo externo e θ é o ângulo entre a direção do campo magnético externo e a linha que liga o elétron ao núcleo [47]. É esta dependência angular que confere o caráter anisotrópico (ou dipolar) a esta interação. Sendo assim, para um elétron em um orbital do tipo s , onde o valor médio de $\cos^2\theta$ é igual a $1/3$, não deveria haver interação hiperfina. O que não ocorre na prática, pois é preciso considerar ainda a interação hiperfina isotrópica, que ocorre para orbitais do tipo s . Já para orbitais do tipo p , d , f ,... há apenas interação hiperfina anisotrópica, proveniente do segundo termo da eq. (2.13). Se o elétron é descrito por uma função de onda que é uma mistura de estados s e p , as interações dipolar e de contato estarão presentes simultaneamente. Na maioria dos radicais livres orgânicos, como o nitróxido, a distribuição do elétron é descrita por um orbital do tipo- p [49].

A Hamiltoniana total pode ser escrita somando a eq. (2.3) com a eq. (2.14):

$$\hat{\mathcal{H}} = \beta_e \vec{S} \cdot \vec{g} \cdot \vec{H} + \vec{I} \cdot \vec{A} \cdot \vec{S} \quad (2.18)$$

Para uma espécie paramagnética dissolvida em um solvente de baixa viscosidade, devido ao rápido movimento molecular, a anisotropia desaparece, pois ocorre uma média temporal e os valores dos desdobramentos hiperfinos são determinados considerando os valores médios dos elementos da diagonal dos tensores \vec{g} e \vec{A} , isto é, $g = \frac{1}{3} \text{Tr} \vec{g}$, e $a'_0 = \frac{1}{3} \text{Tr} \vec{A}$. Neste caso os níveis de energias para um sistema de spin $S = 1/2$ são determinadas a partir da eq. (2.18)

$$E = \pm \left(\frac{1}{2}\right) g \beta_e H \pm \left(\frac{1}{2}\right) m_I a'_0, \quad (2.19)$$

onde m_I é a componente do spin nuclear, que pode assumir os valores $-I, -I + 1, \dots, I - 1, I$, isto é, $(2I + 1)$ possíveis estados de spin nuclear.

Uma radiação de micro-onda aplicada ao sistema induz transições entre os subníveis eletrônicos. Entretanto, apenas as transições que satisfazem às regras de seleção $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta m_I = 0$ são permitidas. Então, a diferença de energia dos níveis permitidos segundo a condição de ressonância é

$$\Delta E = g \beta_e H + m_I a'_0 = h\nu \quad (2.20)$$

e o campo de ressonância será

$$H_r = \frac{h\nu}{g \beta_e} - m_I a_0, \quad (2.21)$$

Vemos então que o campo de ressonância será deslocado de $m_I a_0$, onde $a_0 = \frac{a'_0}{g \beta_e}$ representa o desdobramento (em Gauss) entre duas linhas hiperfinas, veja Figura 2.2.

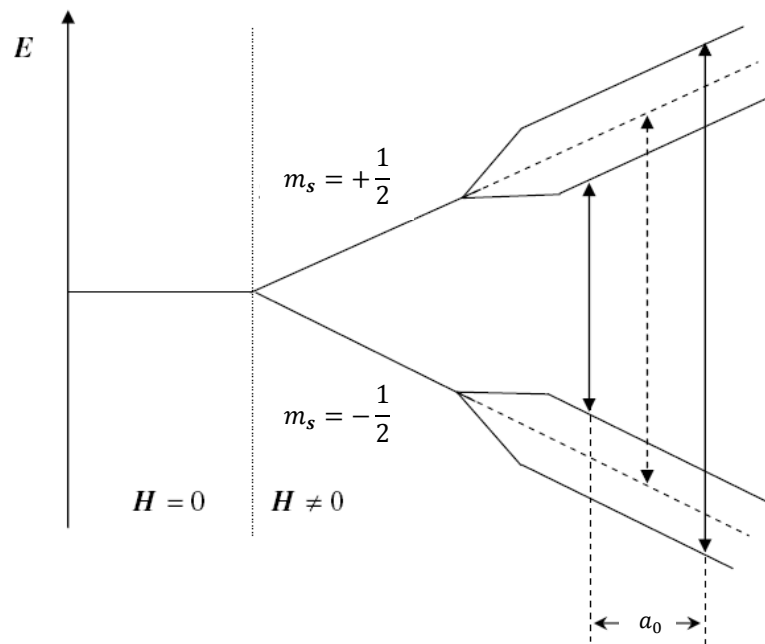


Figura 2.2: Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = \frac{1}{2}$ como uma função do campo magnético em uma frequência constante. Caso $a_0 = 0$ somente as linhas pontilhadas serão observadas.

2.1.3 Análise dos Espectros de RPE

Em alguns casos os espectros de RPE possuem características muito complexas. Nestes casos, a experiência do pesquisador é fundamental para análise adequada das formas das linhas espectrais, pois elas representam o único modo de se extrair informações acerca do ambiente molecular em estudo. Pensando nisso, apresentaremos aqui de forma sucinta os principais aspectos do sinal de RPE.

Uma sonda muito usada no estudo de sistemas biológicos é o radical nitróxido (Figura 2.3), que basicamente consiste de uma molécula que contém uma porção paramagnética. Os quatro grupos metilas presentes nesta molécula faz com que o radical livre seja estável e inerte, [49]. A distribuição do elétron desemparelhado do radical nitróxido se encontra no orbital $2p\pi$ da ligação nitrogênio-oxigênio [48].

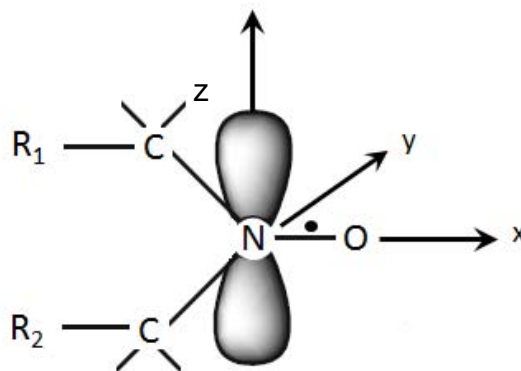


Figura 2.3: Definição dos eixos moleculares do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o objetivo.

Se os radicais nitróxidos são orientados como em um monocristal, o espaçamento das linhas hiperfinas no espectro varia de acordo com a orientação do cristal no campo magnético em relação aos eixos moleculares. A anisotropia espectral, a qual tem um papel muito importante na interpretação dos espectros, é especificada pelos valores do fator g e da constante de desdobramento hiperfino obtidos nas direções paralelas aos eixos principais: g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} . Quando o campo magnético é aplicado ao longo do eixo z do nitróxido, onde está localizado cerca de 80% da densidade eletrônica, há um maior desdobramento da constante de acoplamento hiperfino isotrópico, Figura 2.4. Ao passo que um valor menor para esta constante é observado quando o campo magnético é aplicado ao longo dos eixos x e y . Devido à anisotropia do fator g , a posição da linha central do espectro de RPE depende da orientação do nitróxido em relação ao campo.

O espectro de RPE de um radical nitróxido, no qual o elétron desemparelhado interage com o núcleo de nitrogênio, em um solvente de baixa viscosidade (girando rapidamente) consiste de três linhas finas (espectro isotrópico), bem resolvidas e de intensidades iguais. Por outro lado, se este solvente é congelado o espectro resultante (espectro de pó) é uma superposição dos espectros de todas as orientações possíveis. O espectro isotrópico e o espectro de pó representam as duas situações extremas do movimento do nitróxido conhecidas [50]. Devido ao fato do radical livre ser sensível à distribuição eletrônica na molécula e nas vizinhanças, a forma dos espectros de RPE é influenciada pela natureza do meio no qual está o radical nitróxido esta dissolvido. Esta sensibilidade pode ser visualizada por meio da constante de acoplamento isotrópico [51].

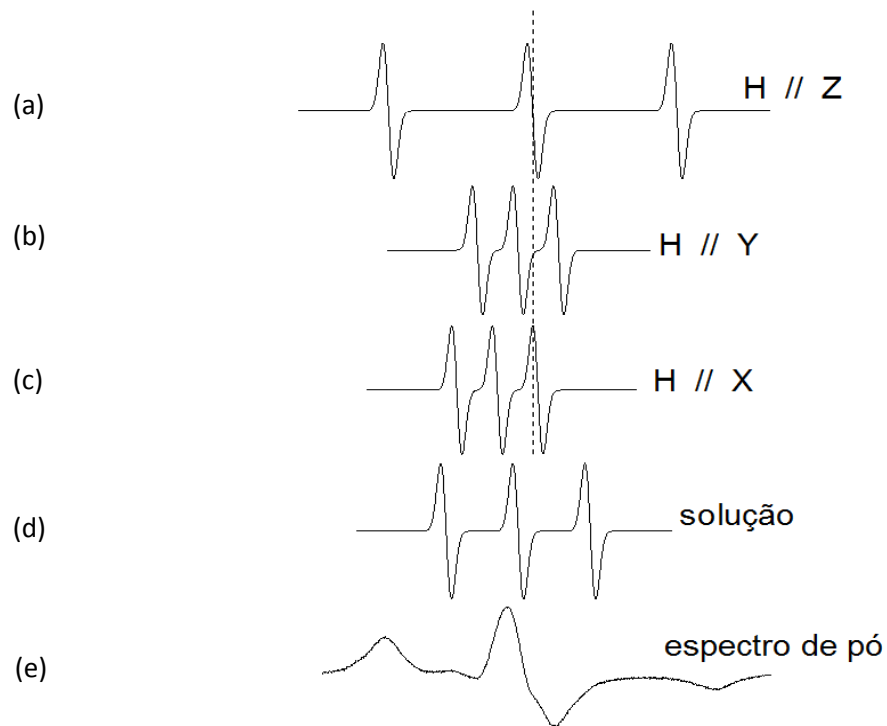


Figura 2.4: Anisotropia espectral do nitróxido ligado a um ácido graxo orientado em um cristal. (a), (b) e (c) com o campo ao longo dos eixos principais de \vec{g} e \vec{A} . (d) espectro isotrópico, radical nitróxido em uma solução não viscosa e (e) espectro de pó.

2.1.4 Marcadores de Spin

Para que a técnica de RPE possa ser estendida aos sistemas biológicos, carentes de grupos paramagnéticos, é necessário introduzir neles uma espécie de sonda, ou seja, moléculas que contém um radical livre com estabilidade suficiente para permitir a realização de estudos espectroscópicos em condições semelhantes às fisiológicas. O método de inserção dessas sondas foi desenvolvido em 1965 por Ohmish e McConnell e é conhecido como *Método dos Marcadores de Spin*. Atualmente existem centenas de marcadores de spin que podem se ligar a membranas, proteínas, enzimas. Os marcadores de spin mais utilizados são os que contém o radical nitróxido (Figura 2.3), especialmente pela sua alta estabilidade química.

O desdobramento hiperfino (Figura 2.5) dos marcadores de spin que contém o radical nitróxido deve-se à interação do momento magnético eletrônico com o núcleo vizinho

do nitrogênio ($I = 1$). Neste caso, são possíveis três orientações igualmente prováveis do spin nuclear em relação ao campo magnético, correspondendo a $m_I = +1, 0, -1$ (m_I é a projeção do spin nuclear na direção do campo que origina as três linhas hiperfinas no espectro de RPE).

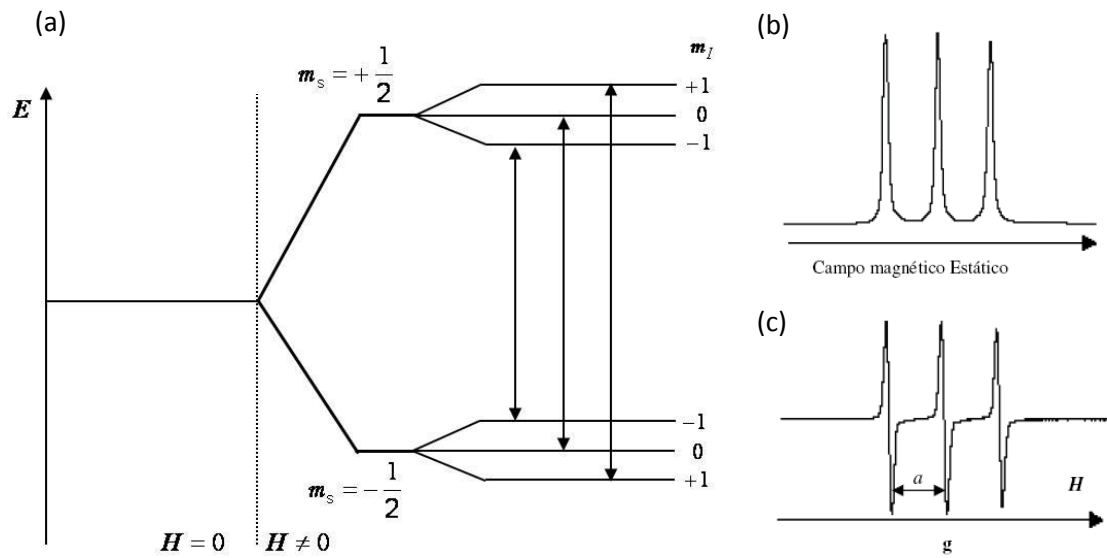


Figura 2.5: (a) Níveis de energia observados para interação de um elétron com um núcleo de $I = 1$ como uma função do campo magnético. As transições de ressonância do spin eletrônico, $S = \frac{1}{2}$, são indicadas. O número de linhas do desdobramento é característico do valor do spin nuclear I ; m_I é a projeção do spin nuclear na direção do campo magnético H e m_s é a projeção do spin eletrônico. (b) espectro de absorção e (c) primeira derivada da curva de absorção do radical nitróxido; a é a constante de desdobramento hiperfino. A posição da linha central é definida pelo fator g .

O sinal de RPE produzido pelo radical é extremamente sensível à dinâmica molecular, polaridade, viscosidade, pH, estrutura e ordem do meio. Além disso, a partir do método dos marcadores de spin é possível obter informações diretas sobre a estrutura, mobilidade, micro polaridade, oxidação e potencial eletrostático de certa região de uma molécula. Por estes motivos, esta metodologia tem sido amplamente utilizada para investigar a mobilidade molecular e a estrutura de líquidos, polímeros, materiais inorgânicos e sistemas biológicos.

O movimento de rotação e o movimento intramolecular de um marcador de spin em um sistema condensado são modulados pela dinâmica das moléculas vizinhas, isto é, do micro ambiente no qual o nitróxido está inserido. Assim, a combinação de uma análise precisa dos espectros de RPE juntamente com simulação computacional permite ao pesquisador estudar em detalhes o movimento molecular do nitróxido. Um dos parâmetros mais importantes neste tipo de estudo é o tempo de correlação rotacional (τ_c), que reflete a dinâmica do meio onde o marcador de spin se encontra. Graças às anisotropias do fator g e do desdobramento hiperfino, o cálculo do τ_c pode ser feito a partir de medidas diretas nos espectros. Três intervalos relativos ao grau de movimento dos marcadores de spin são usados para descrever os espectros de RPE: o regime de movimento rápido, o regime de movimento lento e o limite rígido. No regime de movimento rápido, para tempos de correlação rotacionais menores que 10^{-9} s, os espectros de RPE apresentam grande sensibilidade e é possível calcular o valor de τ_c diretamente do espectro. O regime de movimento lento, $10^{-9} < \tau_c < 10^{-6}$ s, engloba sistemas em que os radicais nitróxidos estão presentes em fluidos de fase ordenada tais como cristais líquidos e membranas biológicas, ou mesmo quando ligados a macromoléculas [52]. Neste regime não é possível estabelecer uma função que permita o cálculo de τ_c diretamente a partir do espectro, apesar de haver certa sensibilidade do espectro a este regime. Por fim, no limite rígido ($\tau_c > 10^{-6}$) praticamente não há sensibilidade dos espectros ao movimento. Tanto para o regime de movimento lento quanto para o limite rígido a dinâmica dos marcadores de spin é mais bem obtida por meio da técnica de simulação computacional.

À medida que o microambiente onde o nitróxido se encontra muda de viscosidade ou de empacotamento o desdobramento hiperfino sofre alterações, veja Figura 2.6. Como comentado anteriormente, a anisotropia do tensor \vec{A} é caracterizada por três valores principais: A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} . No caso de simetria axial, $A_{//} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$. De modo que no limite isotrópico $A_{//} = A_{\perp}$. Outro indicativo de movimento é a largura de linha dos espectros, as quais se tornam mais estreitas para movimentos rápidos (Figura 2.6 C). [53].

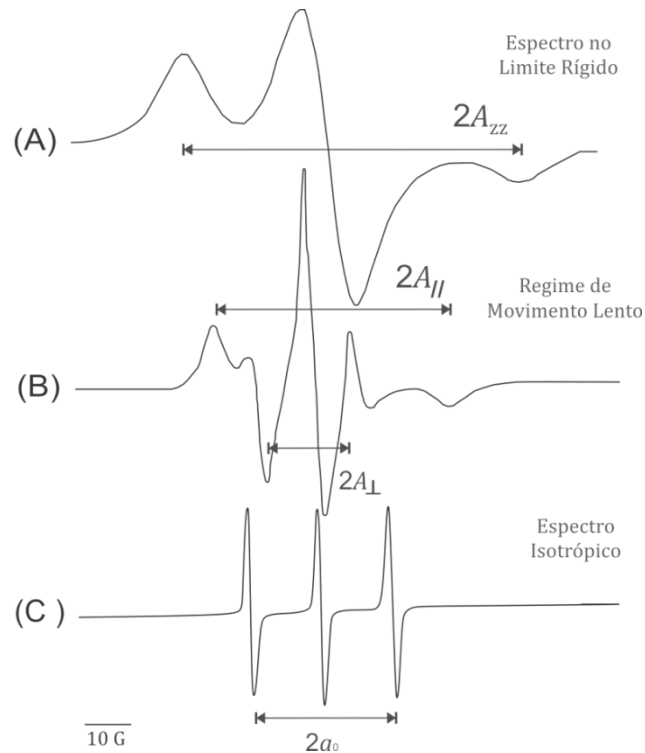


Figura 2.6: Anisotropia do espectro de RPE do marcador de spin sob várias condições: (A) limite rígido – rotação em torno do eixo z somente. (B) aumento na amplitude de movimento devido a inclinação e oscilação das cadeias lipídicas na bicamada, e (C) movimento isotrópico rápido [48].

2.1.5 Estudo de Proteínas: estrutura e dinâmica

Variações de temperatura, pH, polaridade, presença de íons, ou de moléculas exógenas alteram o ambiente em torno do marcador de spin e, conseqüentemente, o sinal de RPE. Nos sistemas biológicos essas variações geram modificações na estrutura de membranas celulares e/ou promovem mudanças conformacionais nas proteínas. Desta forma, um marcador de spin inserido em um ambiente celular terá seu movimento alterado e, assim, poderá reportar através dos espectros as alterações de estrutura e de conformação. Características como estas fazem com que a RPE seja uma técnica de seleção quando se pretende avaliar as interações e efeitos de moléculas sobre membranas e proteínas.

Nos estudos de membranas o marcador de spin, que na maioria dos casos consiste de um lipídio contendo um radical nitróxido, é inserido por intercalação física nas bicamadas lipídicas. Supõe-se que o espectro de RPE reproduz fielmente o comportamento do sistema biológico, uma vez que as moléculas usadas como sondas são, em geral, derivados nitróxidos de ácidos graxos ou de fosfolipídios, principais constituintes de membranas.

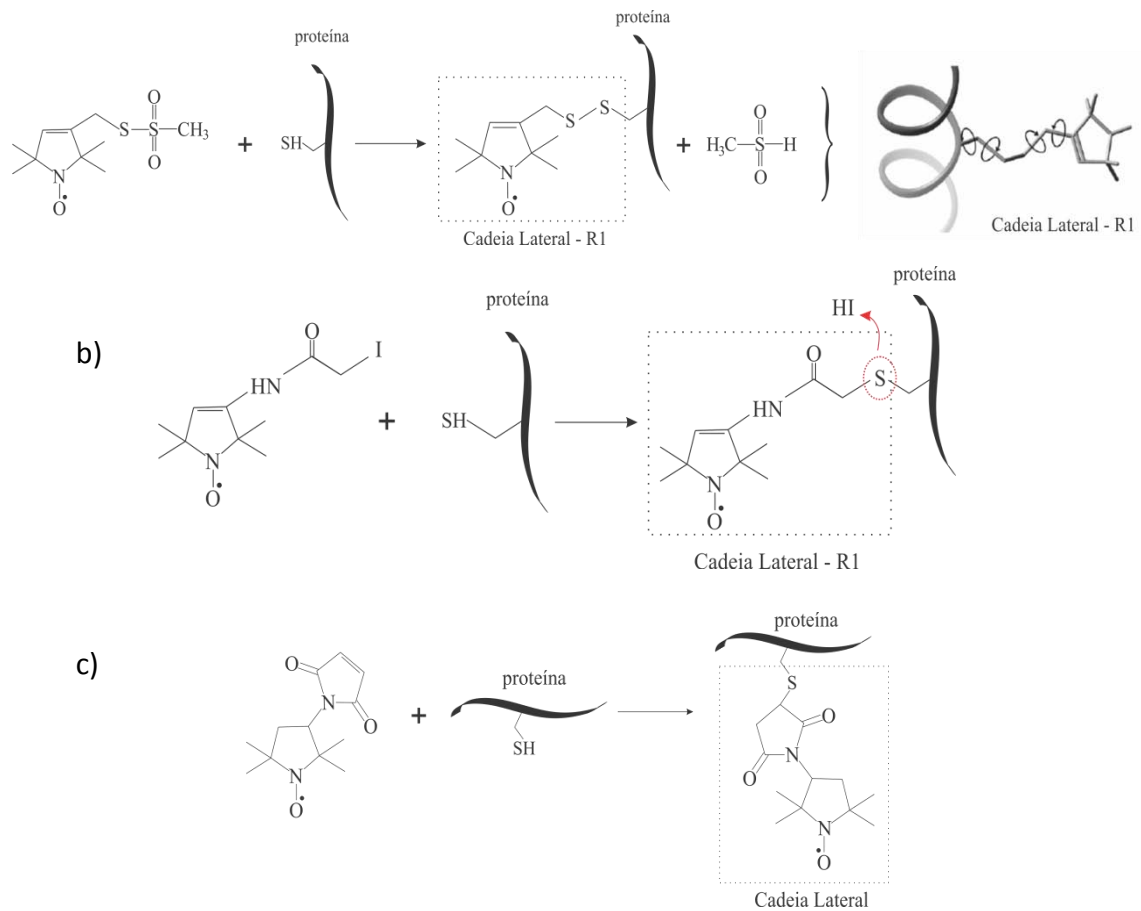


Figura 2.7: Reação do marcador de spin metanotiosulfonato (MTSL), a); iodoacetamida, b); e maleimido (mal-5) com o grupo sulfidríla da cadeia lateral da cisteína, c), gerando uma cadeia lateral marcada R1. É indicado também a flexibilidade da cadeia lateral R1. Figura adaptada de [54].

Já nas proteínas o processo de marcação consiste em ligar um marcador de spin aos sítios da proteína por afinidade ou utilizar um resíduo de aminoácido da cadeia polipeptídica e fazê-lo reagir covalentemente com um grupamento orgânico contendo o radical nitróxido. Geralmente esses resíduos são o grupo sulfidríla da cisteína, o grupo imidazol da histidina e o grupo ϵ -amina da lisina [55]. É ainda possível utilizar a técnica de mutação sítio dirigida (*SDSL – do inglês Site Directed Spin Labeling*), no qual um resíduo nativo qualquer da proteína é trocado por um de cisteína, para posterior reação do seu grupo sulfidrílico com um marcador de spin adequado. A RPE é muito utilizada para investigar a estrutura, orientação molecular, dinâmica de segmentos e mecanismos de ligação de proteínas e peptídeos. A especificidade do marcador de spin é conferida pelo grupo funcional anexado

ao nitróxido. Por exemplo, maleimido, iodoacetamida e metanotiosulfonato (MTSL) que reagem com os resíduos de cisteína (Figura 2.7).

A estrutura global de uma proteína é geralmente pouco afetada após o processo de marcação. Marcadores do tipo nitróxido são relativamente pequenos, e um marcador que se liga à cisteína não é muito maior que um resíduo de triptofano. A estabilidade da proteína muda também muito pouco após o processo de marcação. Entretanto, quando os resíduos mais “embutidos” da proteína são marcados, a cadeia polipeptídica pode se modificar para acomodar o nitróxido e reestabelecer o empacotamento do núcleo da proteína [56]. Já em uma bicamada lipídica, a reorientação dos lipídios está vinculada às moléculas da vizinhança; desta forma, as restrições ao movimento do marcador, inserido em uma membrana biológica, depende da liberdade rotacional do marcador no seu interior, que correspondem ao parâmetro de ordem orientacional (S). Já para um marcador de spin em uma proteína, o movimento pode ser devido ao seu giro em torno do eixo de ligação à cadeia polipeptídica ou devido ao movimento global da proteína como um todo. [57]. O parâmetro de ordem é definido como

$$S = 1 + \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_0}{a_0^*} \quad (2.22)$$

onde A_{\parallel} e A_{\perp} são medidos diretamente do espectro experimental e A_{zz} , A_{xx} e A_{yy} são os valores obtidos do espectro rígido (espectro de pó). O termo de anisotropia a_0 é a constante hiperfina isotrópica (eq. 2.21) num sistema molecular rígido, enquanto o termo a_0^* é o fator de correção da polaridade do solvente e pode ser escrito da seguinte forma [49].

$$a_0^* = \frac{A_{\parallel} + 2A_{\perp}}{3}. \quad (2.23)$$

Em geral o parâmetro de ordem experimental é obtido entre os valores zero e um, isto é, quando a ordem dos lipídios na membrana é grande $S = 1$, já quando o movimento é completamente isotrópico $S = 0$ [53].

O parâmetro experimental $2A_{\parallel}$ (Figura 2.8), em geral, é mais bem definido nos espectros de RPE a baixas temperaturas, por este motivo ele é comumente utilizado para inferir sobre o grau de restrição ao movimento do marcador de spin.

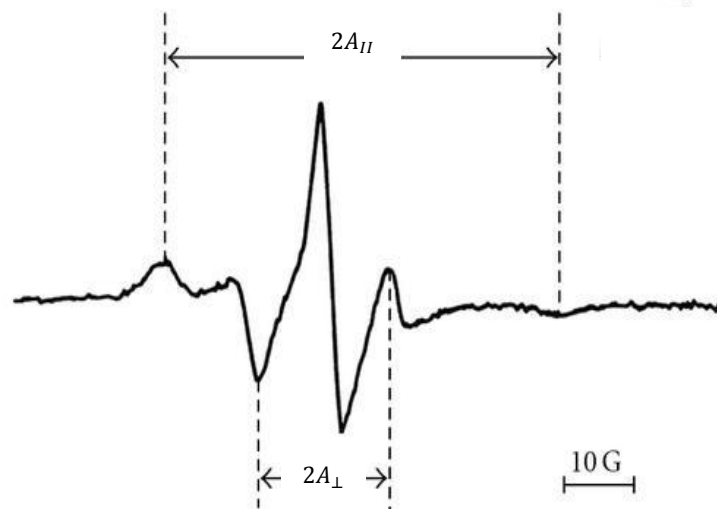


Figura 2.8: Representação de um espectro de RPE do marcador de spin lipídico 5-doxil stearato em membranas de hemácias.

Como enfatizado anteriormente, os nitróxidos são altamente sensíveis à natureza do meio no qual estão dissolvidos. Isto se deve ao fato de que o campo elétrico local e a formação de ligações de hidrogênio deslocam a nuvem de elétrons da ligação N – O do nitróxido afetando sua densidade eletrônica, alterando assim a constante de desdobramento isotrópico (a_0), que pode aumentar mais que 10% do seu valor ao passar de um ambiente hidrofóbico para um ambiente hidrofílico. Alterações no fator-g isotrópico também são observadas. Assim, para cada marcador de spin em um solvente específico, é possível inferir sobre a polaridade do microambiente em torno do nitróxido. Alternativamente, os efeitos do solvente podem ser avaliados a partir das medidas dos parâmetros magnéticos do espectro de RPE [51].

A determinação da ligação de pequenas moléculas (substrato), e a agregação de grandes, com os sítios de uma proteína podem ser acompanhadas por alterações na dinâmica de marcadores de spin não-covalentemente ligados. Isto porque os marcadores de spin apresentam espectros estreitos quando livres em solução (Figura 2.9), porém, quando estão ligados a um alvo maior, como uma proteína, por exemplo, seu movimento é lento e o espectro é alargado. Portanto, a resolução espectral entre o estado ligado (espectro largo) e o livre (espectro estreito) permite quantificar espécies que interagem com a proteína e, assim traçar o perfil de sua ligação.

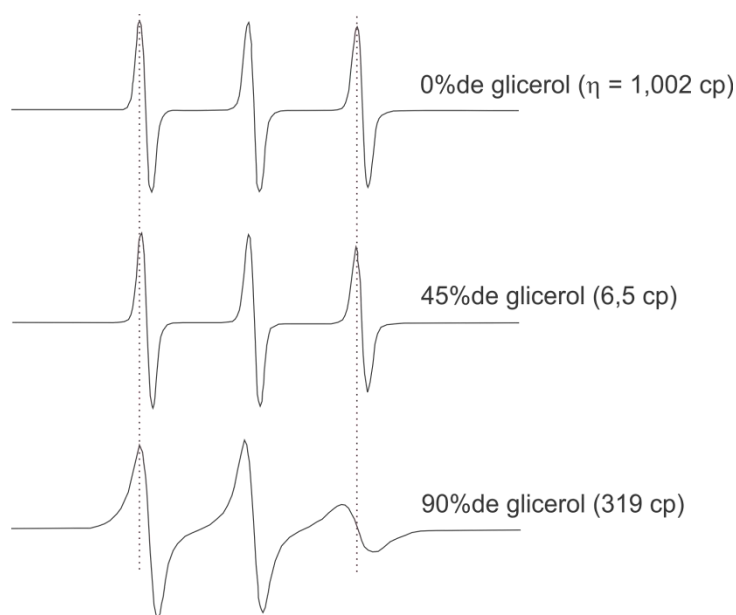


Figura 2.9: Espectros de RPE do marcador de spin TEMPOL livre em solventes com diferentes concentrações de glicerol. Os valores de viscosidade (η) estão indicados.

Os nitróxidos também são sensíveis à presença de outras espécies paramagnéticas. A partir da frequência de colisões, entre a cadeia lateral do marcador de spin (R1 da Figura 2.7) e um agente paramagnético, pode-se obter informações como a acessibilidade da cadeia lateral ao solvente, mobilidade da cadeia lateral e topografia da cadeia polipeptídica [58, 45]. O movimento da cadeia lateral contendo o nitróxido (com tempos na escala de 10^{-12} a 10^{-8} s) resulta em relaxação magnética que determina a forma de linha do espectro de RPE. A dinâmica da proteína, que ocorre nesta faixa de escala de tempo, resulta de três movimentos executados pela estrutura proteica: rotação da proteína inteira (“*tumbling*”), rotação em torno das ligações que conectam o nitróxido à cadeia principal da proteína e movimento local da cadeia principal onde o nitróxido se encontra.

Entretanto, em proteínas de massa molecular elevada, a contribuição do *tumbling* para o espectro de RPE é pequena. Assim, informações dinâmicas são obtidas apenas pelos movimentos em torno das ligações que conectam o nitróxido à cadeia de aminoácidos e do movimento local da cadeia principal. Nestes casos, os espectros de RPE são geralmente compostos por duas componentes espectrais, com dois tempos de correlação rotacional distintos, que estão relacionadas a diferentes graus de mobilidade do marcador de spin.

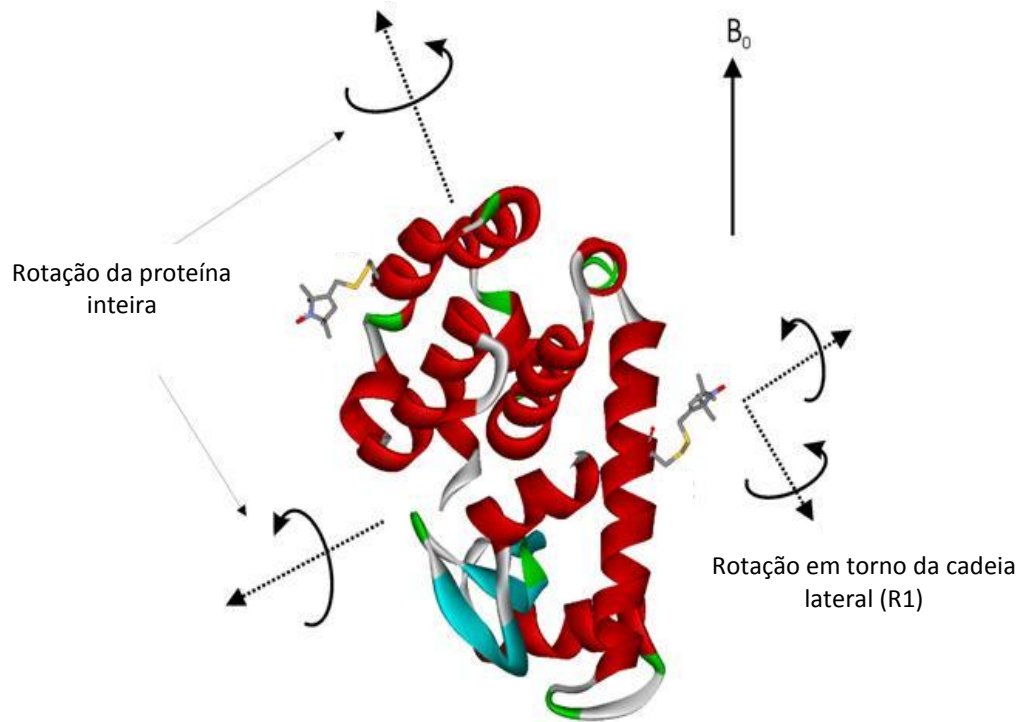


Figura 2.10: Desenho esquemático ilustrando o movimento global de uma proteína e o movimento da cadeia lateral do nitroxídeo. Figura adaptada da referência [154].

O enovelamento proteico gera restrições estéricas devido ao contato entre estruturas secundárias e terciárias, diferentemente de uma proteína desnaturada onde essas restrições não estão presentes. Por isso, o enovelamento ou desnaturação da proteína afeta significativamente a dinâmica dos marcadores de spin e, portanto, estes fenômenos podem ser também estudados por RPE. É possível ainda ligar vários marcadores de spin em diferentes sítios de uma proteína e acompanhar o processo de desnaturação de região por região. A estabilidade de cada região pode ser determinada por meio de titulação com um agente de desnaturação ou por aquecimento [45].

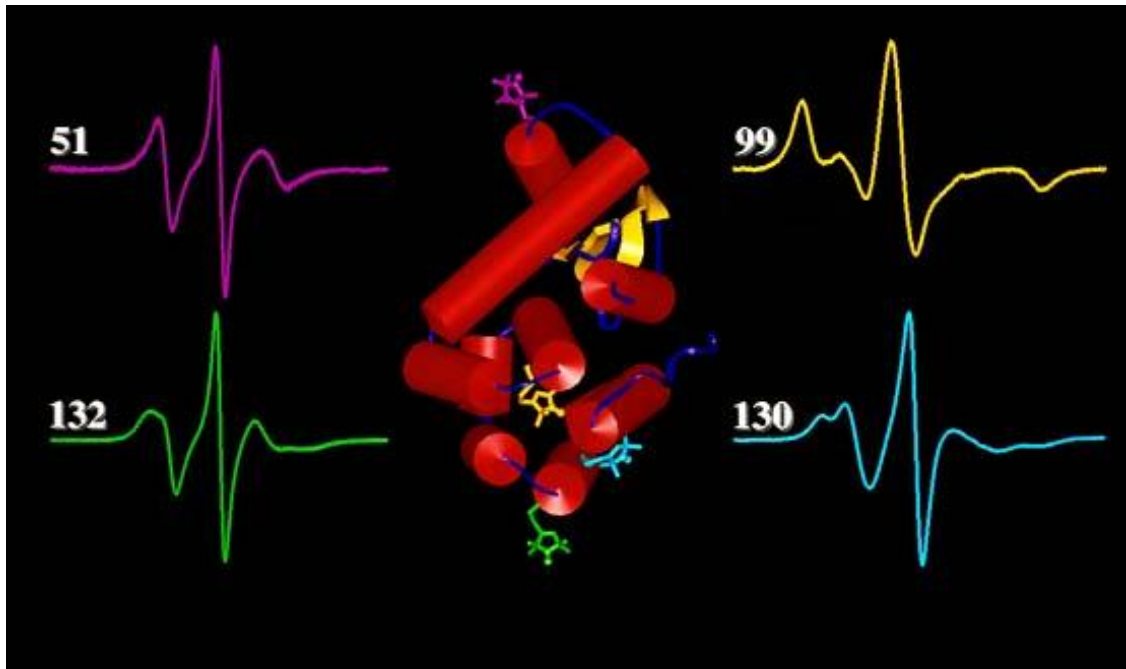


Figura 2.11: Representação de uma lisozima T4 ilustrando as mudanças na forma das linhas espectrais para marcadores de spin ligados em diferentes posições da estrutura proteica. Os espectros são coloridos de acordo com a cor correspondente ao marcador de spin. Figura adaptada da referência [59].

2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

O espalhamento de luz ocorre quando ao incidir uma radiação eletromagnética sobre um sistema qualquer, o campo elétrico da radiação induz uma polarização nos elétrons das moléculas que oscila no tempo com a mesma frequência da radiação incidente. As moléculas, por sua vez, passam a ser fontes secundárias de radiação e, por consequência, emitem radiação. As mudanças de frequência, a distribuição angular, a polarização e a intensidade da radiação espalhada dependem do tamanho, forma e das interações moleculares dentro do material irradiado. Ao atravessar uma amostra, uma dada radiação interage com as moléculas do meio e, a partir das características da radiação espalhada, é possível obter informações sobre a estrutura e a dinâmica molecular do meio espalhador [60]. A intensidade total da luz espalhada em certo ângulo (ângulo de espalhamento) em relação ao feixe incidente é o resultado da superposição do campo elétrico irradiado por todas as cargas do volume iluminado e, portanto, seu valor depende da posição exata das cargas. Esse é o princípio da técnica de espalhamento estático de luz (SLS do termo em inglês “*Static Light Scattering*”).

O espalhamento de luz dinâmico (DLS do termo em inglês “*Dynamic Light Scattering*”) baseia-se nas flutuações da intensidade da luz espalhada ao longo do tempo. No DLS as flutuações da intensidade de espalhamento de luz detectada estão relacionadas ao movimento Browniano das partículas, que por sua vez são relacionadas ao tamanho das partículas. Isto é, partículas grandes tem movimento Browniano lento e a luz espalhada apresenta flutuações lentas. Já pequenas partículas se movem rapidamente no solvente, de modo que o feixe de luz espalhada mostra flutuações rápidas. Além disso, o espalhamento de luz dinâmico mede a dependência da luz espalhada em um ângulo fixo em função do tempo. Sendo assim, a medida de espalhamento de luz é muito útil na determinação de características estruturais de partículas, envolvendo uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento [61].

Para que informações úteis sobre o tamanho das partículas sejam obtidas, é necessário examinar as propriedades estáticas das flutuações da luz espalhada, o que é feito através da função de autocorrelação, $C(\tau)$. Esta função descreve o quão rápido o sinal varia, e quanto tempo o mesmo leva para perder a “memória” do valor anterior, em decorrência do movimento Browniano das partículas.

$$C(\tau) = \langle I(0)I(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(0)I(t + \tau) dt, \quad (2.24)$$

onde T é o tempo total do experimento, $I(0)$ é a intensidade da luz espalhada no tempo $t = 0$ e $I(t + \tau)$ é a intensidade para um tempo τ após a medida em t .

Para dispersões de partículas onde não há nenhuma interação significativa entre elas, a função de correlação está diretamente relacionada com o tamanho de partícula da amostra e é dada por:

$$C(\tau) = A + B e^{-2\gamma\tau}, \quad (2.25)$$

onde A e B são parâmetros de ajuste e γ é a taxa de decaimento da exponencial. Flutuações lentas da intensidade, caso de partículas grandes, levam a uma exponencial que precisa de um longo período de tempo para aproximar-se do valor assintótico, ou seja, com uma taxa de decaimento baixa, Figura 2.12 abaixo. Por outro, flutuações rápidas levam a exponenciais com uma taxa de decaimento elevada.

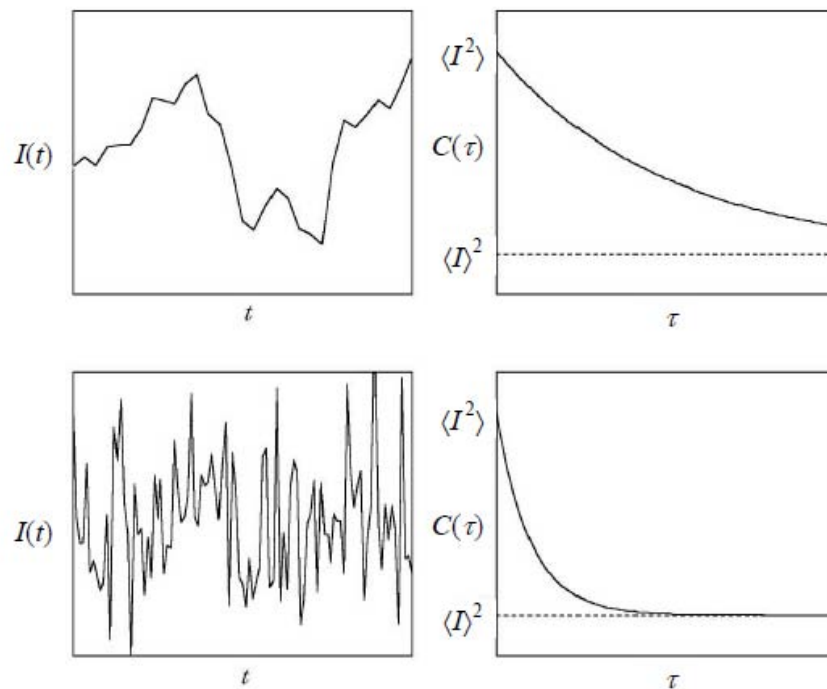


Figura 2.12: Exemplo de funções de auto-correlação para flutuações lentas e rápidas. A velocidade das flutuações reflete-se na taxa de decaimento de $C(\tau)$ [62].

A taxa de decaimento relaciona-se com a difusividade das partículas em solução pela equação

$$\gamma = Dq^2, \quad (2.26)$$

com D sendo o coeficiente de difusão das partículas e q o módulo do vetor de espalhamento com

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (2.27)$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação e θ o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente na amostra [61].

Portanto, a velocidade das flutuações de espalhamento de luz está relacionada pelo coeficiente de difusão das espécies espalhadoras. Assim, uma vez obtida a curva de autocorrelação de intensidade, é possível obter o raio de uma esfera, equivalente à partícula espalhadora, como sendo o raio hidrodinâmico (R_h) a partir do coeficiente de difusão dado pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}, \quad (2.28)$$

onde k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta e η a viscosidade do meio.

Vale mencionar, que em DLS é importante conhecer a temperatura local, uma vez que a viscosidade de um líquido depende da temperatura, e quanto mais viscoso for o solvente menor será o movimento da partícula. A estabilidade desta temperatura também deve ser levada em consideração, caso contrário correntes de convecção na amostra podem gerar erros de interpretação dos resultados.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho visa obter informações detalhadas sobre a interação da BSA com três surfactantes: SDS, CTAC e N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato (HPS), usando a espectroscopia de RPE de um marcador de spin derivado do maleimido que se liga ao resíduo Cys-34 da proteína.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar as características dos espectros de marcadores de spin em BSA utilizando a espectroscopia de RPE.
- Analisar os espectros por meio do programa de simulação NLLS.
- Utilizar a espectroscopia de RPE para avaliar possíveis mudanças na dinâmica e conformação da BSA na presença de três surfactantes iônicos: um aniônico (SDS), um catiônico (CTAC) e um zwitteriônico (HPS).
- Avaliar as alterações no raio hidrodinâmico da BSA sob aquecimento e na presença dos surfactantes.
- Traçar o perfil termodinâmico da cadeia lateral do nitróxido ligado à proteína na presença e na ausência dos surfactantes.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

A Albumina de Soro Bovino (BSA), o marcador de spin derivado do maleimido 3-maleimido-PROXYL (Mal-5), Figura 4.1, e os sais usados na preparação do tampão foram adquiridos da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI). O surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*), o zwitteriônico N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato (HPS) e as membranas para diálise foram obtidos da Sigma Chem. Co. (USA) e o catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC, do inglês *cetyltrimethylammonium chloride*) da Acros Organics (New Jersey, USA). É importante mencionar que todos os surfactantes foram utilizados sem passar por qualquer processo de purificação.

Os valores de pH das soluções foram determinados por meio de um pHmetro Hanna modelo HI-2221-01 equipado com eletrodo semi-micro de vidro combinado com o eletrodo de referência de Ag/AgCl. Os valores de pH das soluções foram verificados sempre antes de cada experimento.

4.2 Métodos

4.2.1 Marcação da BSA com o marcador de spin derivado do maleimido

Para marcação da proteína, a BSA pura foi diluída a concentração de 0,3 mM usando água mili-Q como solvente. Em seguida 1 mM de marcador de spin Mal-5 (dissolvido em etanol) foi incubado com a solução de BSA por 1 h à temperatura ambiente para garantir a reação do marcador de spin com os grupos sulfidrilas das proteínas. Tendo em vista que cada proteína se liga a apenas um marcador de spin, haverá marcadores livres na solução, ou seja, marcadores de spin que não reagiram. Para remover os marcadores de spin livres, a solução de albumina foi dialisada, usando membrana de diálise (Cellulose tubing Sigma-Aldrich, 34 mm x 21 mm d.i., capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 12000 Da), por cerca de 24 h a 4°C em tampão salino fosfato (PBS: 10 mM de fosfato, 150 mM de NaCl e 0,2 mM de EDTA, pH 7,4). A efetividade da diálise foi avaliada através dos espectros de RPE, isto é, a cada diálise a concentração de marcadores livres na amostra foi verificada

através dos espectros de RPE de alíquotas desta amostra. As quatro primeiras diálises (trocas do tampão de diálise) foram realizadas de hora em hora e as demais de duas em duas horas até que o sinal característico de marcadores livres fosse removido do espectro.

Para introduzir os surfactantes em concentrações apropriadas, a solução de BSA foi inicialmente diluída a 0,3 mM em tampão PBS (pH 7,4). Uma solução estoque para cada surfactante (Figura 4.1) foi preparada em tampão PBS para obter uma concentração de 40 mM. Em seguida alíquotas da solução estoque foram misturadas com as soluções contendo BSA e ao final desse processo amostras em concentrações de surfactantes variando de 0,2 a 20 mM, num volume total de cada 50 μ l, foram obtidas. A solução final de BSA-surfactante foi incubada à temperatura ambiente, protegida da luz, por aproximadamente 2h, a cada 20 minutos as amostras eram moderadamente agitadas. A concentração final de BSA, após mistura com a solução de surfactante, foi de 0,15 mM antes das medidas de RPE. Por fim, as amostras foram recolhidas em tubos capilares de quartzo e levadas para o espectrômetro de RPE. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes e os resultados foram apresentados com média e desvio padrão.

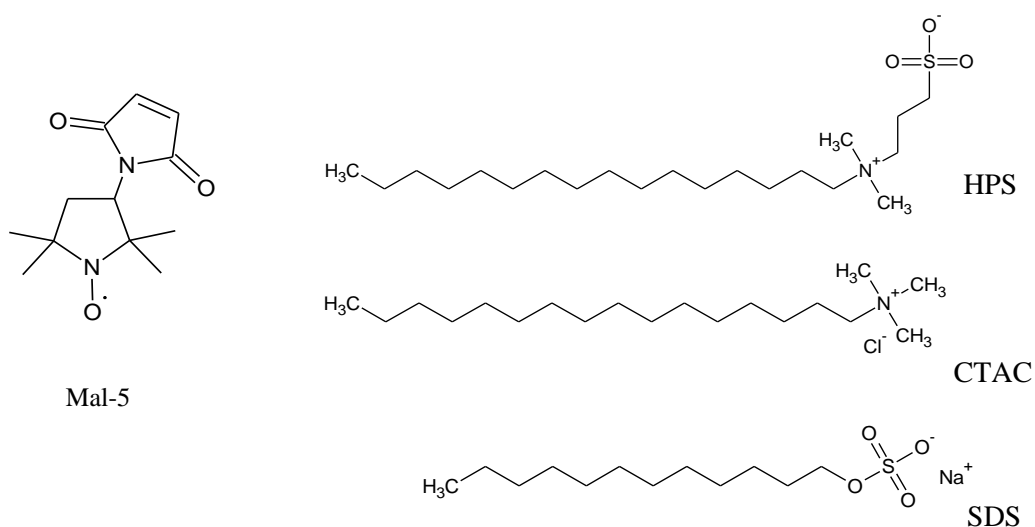


Figura 4.1: Estruturas químicas do marcador de spin Mal-5 e dos três surfactantes utilizados neste trabalho.

4.2.2 Medidas de RPE

Os espectros de RPE foram obtidos no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Física da UFG. Foi utilizado em nossos experimentos um espectrômetro Bruker

ESP 300 equipado com um ressonador ER 4102 ST operando em banda-X (9,4 GHz). Os parâmetros espectrais foram: potência de micro-onda, 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz, amplitude de modulação, 1,024 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e tempo de detecção, 41 ms. A temperatura das amostras no espectrômetro foi controlada, com precisão de $\pm 0,3^\circ\text{C}$, por um sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Alemanha).

As simulações dos espectros de RPE foram realizadas com o programa *nonlinear least-squares* (NLLS), usando o programa geral para baixo movimento [63, 64]. Este programa permite simular um único espectro com duas componentes tendo diferentes estados de movimento e diferentes parâmetros de tensores magnéticos. Com o auxílio da simulação, podemos ainda determinar as populações relativas e as constantes de difusão rotacional associada aos marcadores de spin na proteína. Os parâmetros considerados para o radical nitróxido estão intimamente relacionados com a dinâmica do marcador de spin no meio em que este se encontra. Os tensores magnéticos \vec{g} e \vec{A} são definidos em um sistema fixo na molécula, onde as constantes de taxa de difusão rotacional em torno dos eixos x, y e z estão incluídas [64]. Os parâmetros de entrada dos tensores \vec{g} e \vec{A} (G) foram determinados por uma análise geral de todos os espectros para duas componentes espectrais, S e W (Tabela 4.1). Todos os espectros foram simulados usando os mesmos valores pré-fixados.

Tabela 4.1 Componentes dos tensores g (fator g) e A (desdobramento hiperfino) usados no programa de simulação NLLS.

Parâmetro	Componente S	Componente W
g_{xx}	2.0092	2.0082
g_{yy}	2.0060	2.0060
g_{zz}	2.0026	2.0026
A_{xx} (G)	7.5	7.5
A_{yy} (G)	8.4	7.5
A_{zz} (G)	35.1	35.0

$a_0 = 17.0$ G

4.2.3 Medidas de DLS

Os experimentos de DLS foram realizados no Instituto de Química da USP de São Carlos, utilizando um equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Malvern, UK). Este instrumento é equipado com um laser de He-Ne com uma fonte de luz com comprimento de onda em 633 nm. A intensidade da luz espalhada em um ângulo de 173° é medida por um fotodiodo do tipo avalanche.

As soluções de BSA foram colocadas na câmara de amostra contendo um termostato e submetidas a variações de temperatura de 25–65°C, controladas com precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Cada ponto das curvas obtidas nas medidas de DLS é o resultado da média de cerca de 10 pontos. As medidas das flutuações na intensidade da luz espalhada foram avaliadas utilizando o software de análise DTS (do inglês *Dispersion Technology Software*) nano (Malvern). Os diâmetros hidrodinâmicos das partículas, D_h , e a largura da distribuição (índice de polidispersibilidade – PDI) foram estimados a partir da função de auto-correlação, utilizando o método de Cumulantes com base em um único ajuste exponencial da função correlação. Além disso, uma análise alternativa baseada em um ajuste exponencial múltiplo da função de correlação, dando a distribuição de tamanhos de partícula e suas contribuições para a intensidade global de espalhamento (*non-negative least squares* – NNLS – ou CONTIN) também foi realizada. O algoritmo de análise NNLS, que encontra o melhor ajuste por mínimos quadrados, consiste de um método de análise de alta resolução muito eficiente para analisar misturas.

O coeficiente de difusão médio foi obtido a partir da Equação 2.28. As amostras utilizadas em nossos experimentos correspondem a 10 mg/ml de BSA, preparada por diluição do pó liofilizado, no mesmo tampão usado nos experimentos de RPE (PBS, pH 7.4). Após a diluição da BSA, a solução foi centrifugada e em seguida filtrada, em filtros *Milipore 0,4 μm* , para remover qualquer partícula não solubilizada. A solução concentrada de surfactante foi filtrada separadamente e uma apropriada alíquota desta solução foi cuidadosamente adicionada às cubetas de DLS contendo BSA. Todas as medidas foram realizadas pela Profa. Dra. Patricia S. Santiago durante seu pós-doutorado.

5 Resultados

5.1 Espectros de RPE de BSA marcada com MAL-5

Na Figura 5.1 o espectro de RPE do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo-SH da BSA é mostrado. Este espectro é composto, basicamente, por duas componentes espectrais ou duas populações de marcadores de spin, associadas a diferentes graus de mobilidade. Estas duas componentes tem sido denominadas na literatura como fortemente (componente S) e fracamente (componente W) imobilizadas. Na Figura 5.1a o espectro simulado (linha vermelha) está superposto ao espectro experimental (linha preta) para mostrar a qualidade do ajuste. O parâmetro ($2A_{//}$) que está relacionado com o grau de restrição ao movimento do marcador de spin da componente S e o desdobramento hiperfino isotrópico (a_0), que é sensível à polaridade do ambiente no qual o nitróxido está dissolvido, também estão indicados. Na Figura 5.1b as componentes espectrais simuladas W e S são mostradas separadamente. Note que a componente espectral que representa a população de marcadores de spin com maior mobilidade (W), com tempo de correlação rotacional na escala de nanosegundos, apresenta três linhas de ressonância finas com um desdobramento hiperfino isotrópico, $2a_0 = 17,1 \text{ G} \pm 0,5 \text{ G}$, consistente com um nitróxido dissolvido em tampão. Por outro lado, nossos dados mostram que a componente relacionada à população de marcadores de spin com menor mobilidade (S), na escala de tempo do RPE para radicais nitróxidos em banda X (9,4 GHz), apresentou tempo de correlação rotacional cerca de uma ordem de magnitude maior que a população da componente W, sugerindo fortes interações entre a cadeia lateral do marcador de spin e a cadeia polipeptídica.

O parâmetro $2A_{//}$ é altamente sensível à mobilidade do nitróxido. Valores de $2A_{//}$ em torno de 65 G a 18°C para componente S são um indicativo de que os nitróxidos estão formando ligações de hidrogênio com a proteína [65]. Outros fatores que alteram o valor do $2A_{//}$ são as ligações de hidrogênio que o grupo N-O do nitróxido faz com as moléculas do meio e também as interações de Van der Waals [65], ambas as interações podem alterar a densidade eletrônica da ligação N-O.

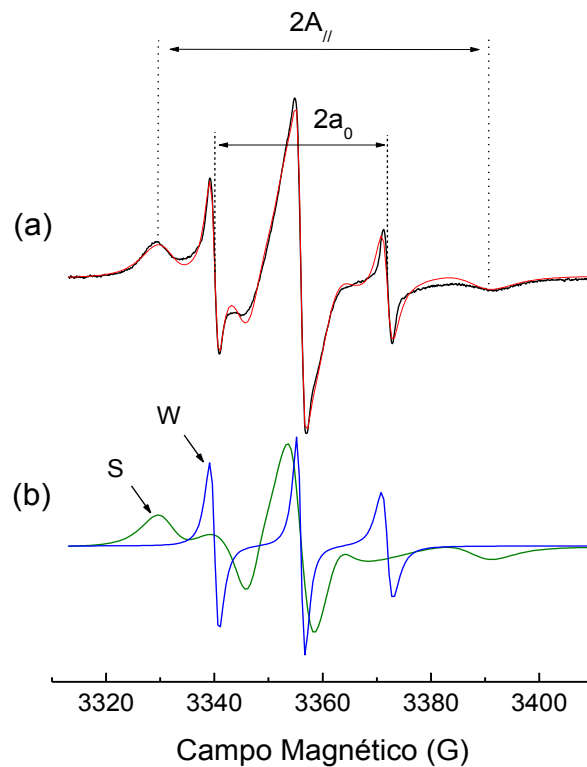


Figura 5.1: (a) Espectros de RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha) a 38°C do marcador de spin mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidrila da BSA (0,2 mM) em tampão fosfato pH 7,4. Os espectros de melhor ajuste foram obtidos através do programa NLLS, usando um modelo de duas componentes para todos os espectros. (b) as componentes espectrais fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. Os parâmetros de RPE $2A_{//}$ e o desdobramento hiperfino isotrópico $2a_0$ são indicados. Campo magnético total: 100 G.

Na Figura 5.2, um modelo molecular ilustra a acomodação do Mal-5 ligado ao grupo sulfidrila. As ligações de hidrogênio dos átomos de oxigênio do grupo maleimido com a cadeia polipeptídica também estão indicadas. Estas ligações, que provavelmente favorecem a alta reatividade do maleimido com o grupo sulfidrila, poderiam prender o grupo maleimido à dobra da proteína, explicando a baixa mobilidade do marcador de spin. A ligação que une o maleimido ao nitróxido é extremamente importante, pois é graças a ela que o marcador de spin pode executar movimentos rotacionais. Como em um dos lados o marcador de spin está covalentemente ligado ao átomo de enxofre da cisteína e do outro lado está ligado ao hidrogênio do grupo amida ou a algum grupo das cadeias laterais da proteína, o estado de baixa mobilidade do marcador da componente S pode ser explicado pela forte interação do nitróxido com a proteína. Já o estado de alta mobilidade do marcador da componente W é

explicado pela interação do nitróxido com o solvente.

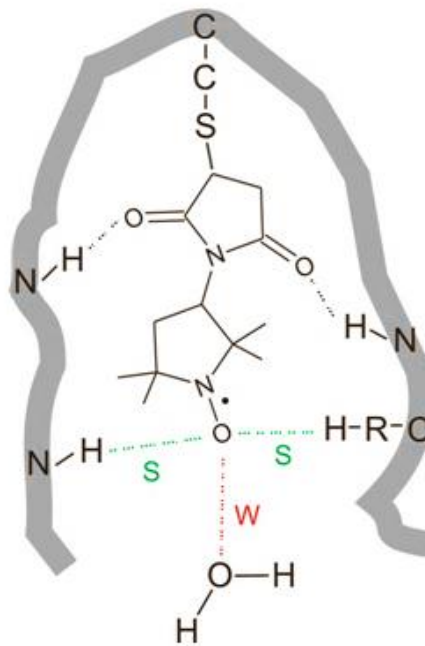


Figura 5.2: Modelo esquemático do marcador Mal-5 ligado covalentemente ao grupo sulfidril da proteína. Neste modelo o átomo de oxigênio do nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente S, ou com as moléculas de água do solvente, formando a componente W. Os dois átomos de oxigênio do anel maleimido também formam ligações de hidrogênio com a proteína prendendo fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica.

Essa interpretação das duas componentes, que é muito importante para a análise dos espectros de RPE de proteínas em geral, pode ser mais bem entendida com os espectros mostrados na Figura 5.3. Para verificar a acessibilidade das componentes S e W, o agente de relaxação paramagnético cloreto de níquel II (NiCl_2), o qual é solúvel em água, foi introduzido na soluções com BSA marcada. Quanto maior a disponibilidade do NiCl_2 nas amostras, maior é a probabilidade de colisões do agente de relaxação com o nitróxido, o que acarreta em perda do sinal paramagnético e, conseqüentemente, a uma redução da intensidade do sinal de RPE. Este efeito pode ser notado a partir dos espectros da Figura 5.3. A uma concentração de 50 mM de NiCl_2 é possível notar a ausência da componente fracamente imobilizada no espectro de RPE, enquanto a componente fortemente imobilizada permanece essencialmente inalterada. Já quando a concentração de NiCl_2 aumenta drasticamente, como no espectro de BSA tratada com 200 mM de NiCl_2 , há uma moderada redução da intensidade do sinal de RPE em relação a amostra tratada com 50 mM de NiCl_2 . Quando o nitróxido

interage por ligações de hidrogênio com a proteína, dando origem a componente S, (Figura 5.2) ele fica menos exposto ao solvente e, conseqüentemente, ao níquel II. Deste modo, a redução dos marcadores da componente S só se torna considerável para altas concentrações de NiCl_2 , como evidenciado na figura abaixo. Por outro lado, os marcadores de spin que realizam ligações de hidrogênio com o solvente, originando a componente W, têm mais liberdade para se mover e, portanto, mais contato com o agente de relaxação.

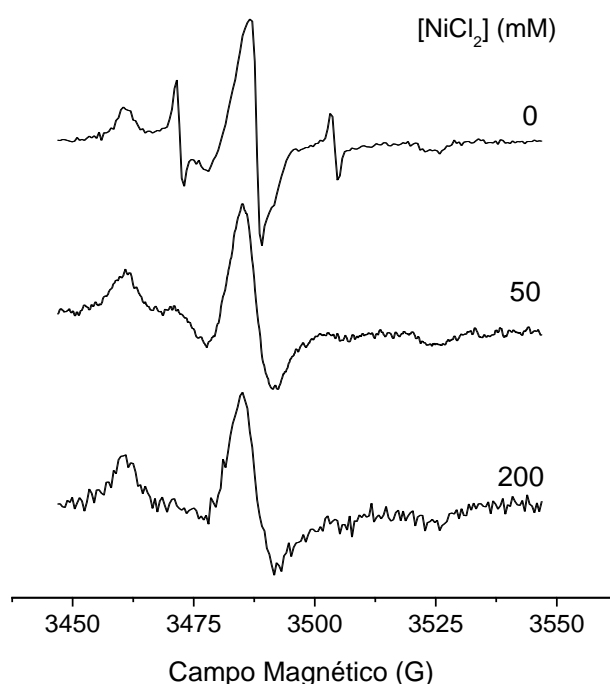


Figura 5.3: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (0,2 mM; pH 7,4) tratada com diferentes concentrações do agente de relaxação paramagnética (NiCl_2). O sinal de RPE tende a desaparecer com o aumento da frequência de colisões entre o nitróxido e os íons de níquel. Os íons de níquel acessam os marcadores de spin da componente W mais facilmente. Campo magnético total: 100 G.

Essa interpretação pode ser mais bem entendida a partir dos valores observados da componente-z do tensor hiperfino- ^{14}N (A_{zz}), isto é, podemos obter outro indicativo de que a população de marcadores da componente S se deve às interações de hidrogênio entre o nitróxido e a proteína. Isto porque o campo elétrico local, em torno do nitróxido, pode afetar a densidade do elétron desemparelhado no núcleo de nitrogênio e, conseqüentemente, a interação de contato de Fermi, o que altera o valor do A_{zz} . Este valor por sua vez pode ser obtido por simulação dos espectros de RPE ou por medidas diretas nos espectros a -70°C.

Quando o nitróxido interage por ligações de hidrogênio no estado cristalino, com alta restrição de movimento, o parâmetro A_{zz} assume valor em torno de 35 G, enquanto em um ambiente hidrofóbico este valor tende a diminuir cerca de 3 G [66]. Em nossos experimentos, obtivemos valores de A_{zz} desta magnitude para marcadores de spin em BSA, veja seção 5.2, em acordo com nossa interpretação. Por isso, os parâmetros dinâmicos obtidos a partir dos espectros de RPE podem ser associados aos marcadores de spin em que a cadeia lateral encontra-se livre no solvente ou ligada à cadeia polipeptídica da proteína.

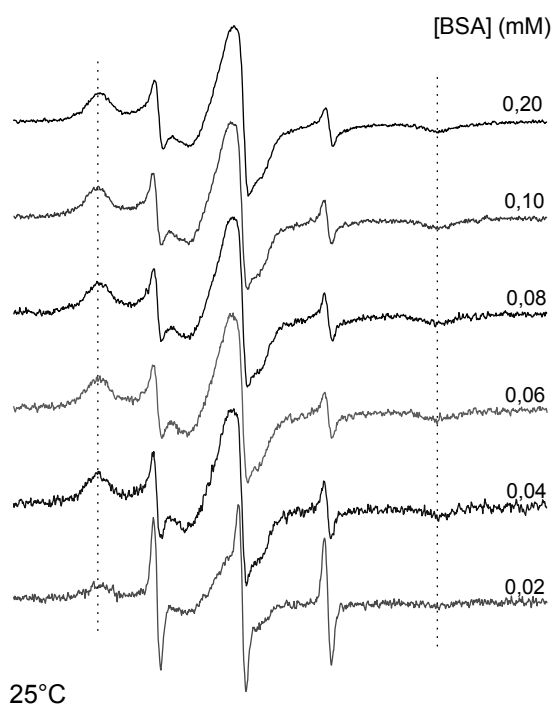


Figura 5.4: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (pH 7,4) em diferentes concentrações. O sinal de RPE tende a reduzir de intensidade com o aumento do conteúdo de água disponível, contribuindo para a formação da componente W. A precisão das medidas e da simulação dos espectros fica comprometida para concentrações de BSA abaixo de 0,08 mM. Campo magnético total: 100 G.

Na Figura 5.4 acima, os espectros de RPE do marcador Mal-5 ligado covalentemente à BSA à temperatura ambiente são mostrados para várias concentrações de BSA em tampão (pH 7,4). À medida que a concentração de proteína diminui, isto é, o conteúdo de água disponível aumenta, há um acréscimo significativo da componente W no espectro de RPE, ao passo que nenhuma alteração no $2A_{//}$ é notada. Em concentrações abaixo de 0,08 mM, o número de moléculas de proteínas nas amostras cai bastante e, conseqüentemente, a quantidade de marcadores de spin também. Deste modo, a qualidade dos

espectros começa a ficar comprometida devido à diminuição da intensidade do sinal de RPE. Estes resultados são um indicativo de que quanto maior a disponibilidade de solvente, maior será a chance do marcador de spin realizar ligações de hidrogênio com as moléculas de água e assim contribuir para o aumento da componente W. Em soluções diluídas a atividade da água é maior (aumenta sua capacidade de solubilização) e isto deve favorecer conformações da BSA mais expandidas e expostas ao solvente (aumento da fração de componente W no espectro). Além disso, devemos considerar o fato de que para concentrações mais altas pode haver agregações entre as proteínas. Sendo assim, consideramos mais adequado trabalhar com concentrações de BSA acima de 0,08 mM, para que pudéssemos obter sinais de EPR de melhor resolução que nos permitisse realizar medidas diretamente dos espectros de RPE sem cometer erros. Baseado nos resultados da Figura 5.4, foi escolhido trabalhar em uma concentração final de 0,15 mM de BSA.

5.2 Efeitos de Surfactantes na Dinâmica da BSA

Na Figura 5.5 são mostrados os espectros experimentais (linhas pretas) e simulados (linhas vermelhas) de BSA tratada com diferentes concentrações de SDS, CTAC e HPS. A simulação de todos os espectros foi realizada a partir do software NLLS (do inglês, *Non Linear Least Square*), desenvolvido pelo grupo do Dr. Jack H. Freed da Universidade de Cornell, o qual usa os modelos de Levenberg–Marquardt e os mínimos quadrados. Vale a pena mencionar que o processo de simulação de espectros com duas componentes superpostas é trabalhoso e exige certa experiência do pesquisador na análise dos dados. Para otimizar os parâmetros magnéticos de entrada com base no conjunto de espectros do trabalho, com o intuito de fixá-los para todas as simulações, pode levar dias de trabalho árduo.

Para cada um dos espectros, as populações de marcadores da componente fortemente imobilizada, N_S , bem como os tempos de correlação rotacional desta componente, $\tau_c(S)$ foram obtidos e também estão indicados na figura. Como pode ser visto da Figura 5.5, as convergências dos ajustes foram boas, resultando em espectros simulados bem próximos dos espectros experimentais. A qualidade destas convergências garante a confiabilidade dos parâmetros obtidos a partir das simulações. É importante notar da Figura 5.5 as mudanças que ocorrem na forma de linha dos espectros, indicando uma tendência à formação da componente

W e, conseqüente, desaparecimento da componente S à medida que se aumenta a concentração dos surfactantes na solução contendo BSA (0,15 mM). O primeiro ombro, referente à população da componente S, diminui drasticamente nos espectros das amostras tratadas com 10 mM de SDS e CTAC. Já os espectros de amostras tratadas com HPS sofreram poucas alterações. Podemos notar ainda que este efeito é mais evidente nos espectros relacionados às amostras tratadas com CTAC, onde o primeiro ombro no espectro além de diminuir, sofre um deslocamento em direção ao pico central.

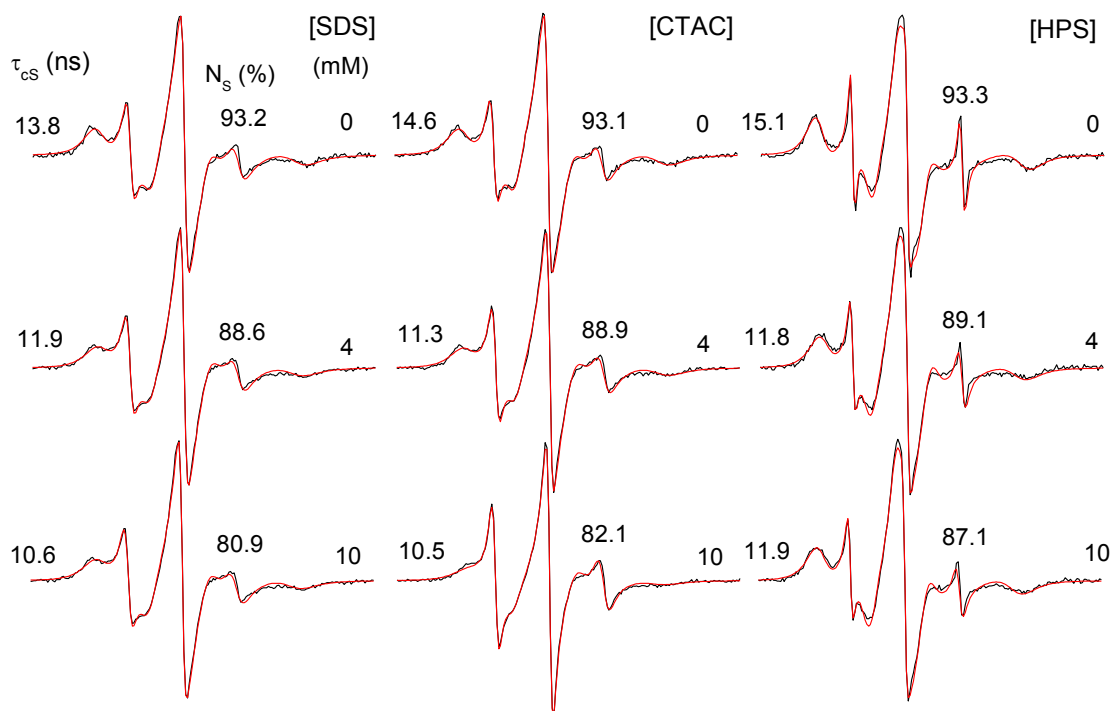


Figura 5.5: Espectros de RPE experimental (linha pretas) e simulado (linhas vermelhas) a 25°C do marcador de spin Mal-5 covalentemente ligado ao grupo sulfidril da BSA (pH 7,4) para várias concentrações de surfactantes. Os valores dos parâmetros, obtidos do melhor ajuste através do programa NLLS, estão indicados: $\tau_c(S)$ é o tempo de correlação rotacional da componente fortemente imobilizada e N_s a percentagem de marcadores desta componente. A concentração de surfactante (0, 4 e 10 mM) também está indicada no lado direito de cada espectro. A concentração final de BSA foi de 0,15 mM. Campo magnético total: 100 G.

Como comentado na seção 4.2, em todos os experimentos, as amostras de BSA foram incubadas com os surfactantes por 1,5 h antes de serem levadas ao espectrômetro de RPE. Entretanto, para chegar a este tempo de incubação adequado, foi realizado um experimento prévio usando o SDS, no qual avaliamos os efeitos deste surfactante sobre a

BSA para diferentes períodos de incubação. O objetivo deste experimento, além de obter um tempo adequado, era o de evitar trabalhar com amostras em que o efeito dos surfactantes, em cada concentração, sobre as proteínas ainda não tivesse atingido seu máximo, o que poderia comprometer nossa interpretação. Na Figura 5.6 são mostrados os espectros resultantes deste estudo para amostras tratadas com 10 mM de SDS. Nossos resultados mostraram que nenhuma alteração significativa na forma de linha dos espectros ocorre em amostras incubadas por mais de 1,5 h, mesmo para incubações de até 27 h, sugerindo que o efeito do SDS sobre as cadeias polipeptídicas da BSA se estabiliza para uma incubação em torno de 1,5 h. O mesmo resultado foi obtido para as outras concentrações usadas neste trabalho.

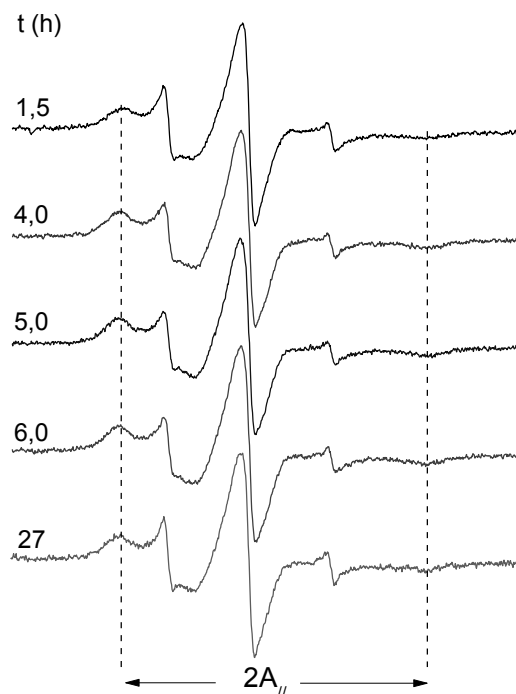


Figura 5.6: Espectros de RPE experimental a 25°C do marcador de spin Mal-5 em BSA (pH 7,4) tratada com 10 mM de SDS para diferentes tempos de incubação. As linhas pontilhadas delimitam o intervalo de campo magnético do $2A_{//}$. Campo magnético total: 100 G.

Os espectros de RPE do marcador Mal-5 estruturado na BSA submetida a diferentes concentrações de surfactantes demonstraram que a adição de surfactantes produz um acréscimo na mobilidade das cadeias polipeptídicas da proteína, evidenciado pelo parâmetro espectral $2A_{//}$. A dinâmica da BSA avaliada pelo parâmetro $2A_{//}$ resulta em uma curva caracterizada por um decréscimo acentuado em baixas concentrações de surfactantes e um decréscimo ligeiramente menor para concentrações acima de 10 mM de surfactante, como

mostrado na Figura 5.7. Além disso, podemos notar que em concentrações de até 2 mM não há distinção entre os efeitos do SDS, do CTAC e do HPS. Já para concentrações maiores, um efeito similar é observado para os surfactantes aniônico SDS e o catiônico CTAC sobre a cadeia polipeptídica da BSA, ao passo que para o surfactante zwitteriônico HPS o efeito observado é bem menor. Estes resultados são um indicativo de que as alterações na dinâmica da cadeia polipeptídica da proteína não é um fator que depende apenas das interações entre as cargas dos surfactantes e as cargas dos aminoácidos.

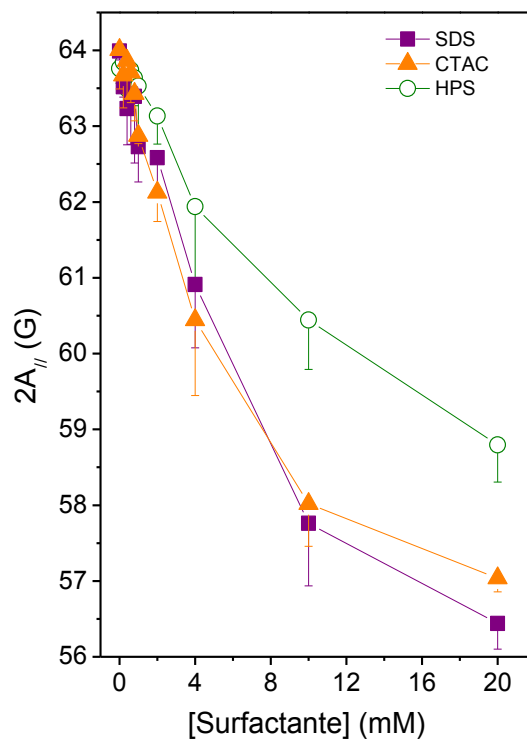


Figura 5.7: Parâmetro espectral $2A_{//}$ de BSA marcada com Mal-5 em função da concentração dos três surfactantes estudados. O $2A_{//}$ é altamente sensível à mobilidade do nitróxido e é obtido por medida direta no espectro de RPE. A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

A grande vantagem de se usar o parâmetro $2A_{//}$ é que ele pode ser medido diretamente a partir do espectro de RPE, além de permitir uma análise imediata da dinâmica do nitróxido inserido na proteína. Por outro lado, o $2A_{//}$ não permite uma análise isolada do comportamento das duas populações de marcadores de spin na proteína. Uma análise mais precisa dos espectros é feita a partir dos parâmetros obtidos por simulação computacional. O tempo de correlação rotacional (τ_c), o qual reflete a dinâmica do meio onde o marcador de spin se encontra, pode ser obtido separadamente para cada população dos marcadores de spin

através da simulação dos espectros. Os tempos de correlação rotacional para as componentes S e W, em função da concentração dos surfactantes, são mostrados na Figura 5.8. Podemos notar através dos valores de $\tau_c(S)$, painel superior, que a mobilidade da cadeia polipeptídica da BSA aumentou na presença dos três surfactantes, similar ao indicado pelos valores de $2A_{//}$.

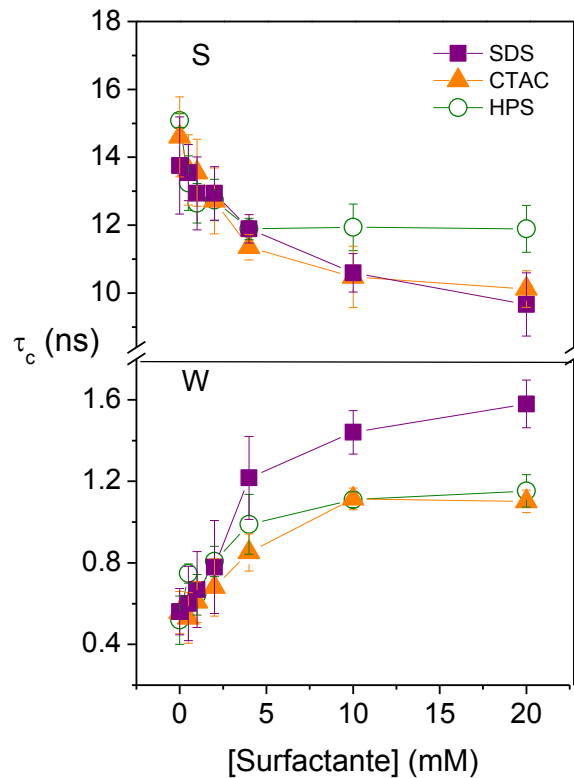


Figura 5.8: Tempo de correlação rotacional, τ_c , em função da concentração de surfactante, para as componentes fortemente $\tau_c(S)$, painel superior, e fracamente imobilizada $\tau_c(W)$, painel inferior, para os três surfactantes estudados. Estes valores foram obtidos a partir do espectro simulado do marcador Mal-5 na BSA (pH 7,4). A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

Embora os surfactantes SDS e CTAC possuam grupos polares com cargas opostas, ambos apresentaram efeitos similares sobre a dinâmica do marcador de spin na proteína, enquanto que o surfactante zwitteriônico HPS mostrou um efeito moderado, principalmente para concentrações acima de 10 mM. A similaridade entre os resultados da Figura 5.7 e os resultados da Figura 5.8, mostram que as simulações dos espectros de RPE foram satisfatórias. Da Figura 5.8 (painel inferior) vemos ainda que os três surfactantes estudados foram capazes de aumentar a viscosidade do microambiente em torno do aminoácido Cys-34 da BSA, como indicado pelos valores de $\tau_c(W)$. Neste caso, as amostras

tratadas com CTAC ou HPS apresentaram comportamentos similares em todo intervalo de concentração, com um moderado aumento do $\tau_c(W)$. Por outro lado o SDS restringiu drasticamente o movimento do nitróxido para concentrações de 10 a 20 mM. Estes resultados mostram claramente que todos os surfactantes perturbam o microambiente local do nitróxido, e também indicam que os efeitos dos surfactantes sobre os marcadores de spin da componente S têm origem diferente dos efeitos sobre os marcadores da componente W.

Na Figura 5.9 é mostrado o comportamento da população relativa de marcadores de spin da componente S (N_S) com o aumento da concentração dos surfactantes. Analogamente ao observado na Figura 5.7 e painel superior da Figura 5.8, a população de marcadores de spin contatando a proteína também sofreu um significativo decréscimo com o aumento da concentração dos surfactantes. E, novamente, o HPS apresentou um menor efeito na redução da população N_S para concentrações entre 10 e 20 mM. Este resultado sugere que os surfactantes alteram a conformação local da BSA onde o nitróxido está ligado, rompendo as pontes de hidrogênio e dificultando o contato da cadeia lateral do nitróxido com a proteína.

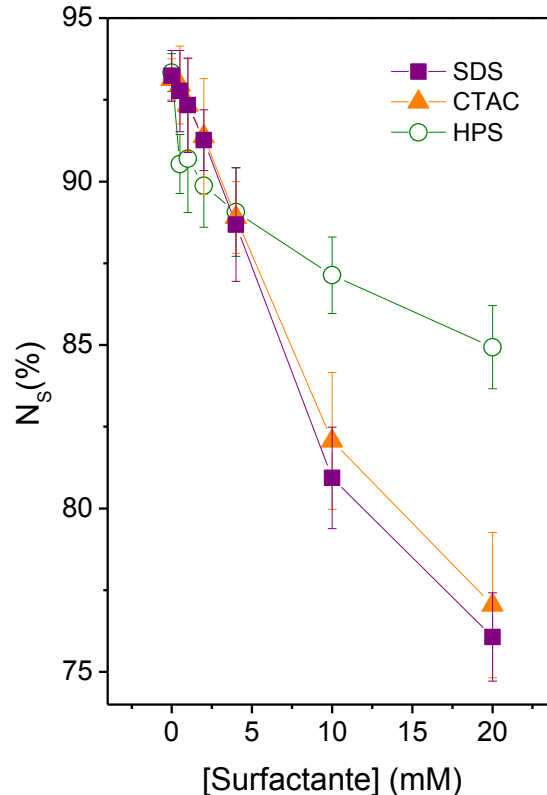


Figura 5.9: População relativa da componente S no espectro de RPE de BSA marcada com Mal-5 em função da concentração de surfactante. Estes resultados foram obtidos a partir da curva de melhor ajuste dos espectros, utilizando o programa NLLS. A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

Outro parâmetro importante obtido a partir da simulação dos espectros com o programa NLLS é o $2A_{zz}$, ou seja, a componente principal z do tensor hiperfino, que pode ser usado para avaliar a polaridade do meio no qual o nitróxido está dissolvido. No estado congelado, devido à imobilização do nitróxido, na escala de tempo de RPE, é observada uma aproximação entre os valores de $2A_{//}$ e $2A_{zz}$, a qual é modulada pela distância média entre a densidade de elétrons desemparelhados no núcleo de nitrogênio [65]. Quando as cargas positivas nas vizinhanças do nitróxido polarizam a ligação N-O o átomo de nitrogênio se torna mais eletropositivo, a distância média é reduzida e o $2A_{zz}$ aumenta. Na Figura 5.10 é mostrado o comportamento do parâmetro $2A_{zz}$ em função da concentração de surfactante.

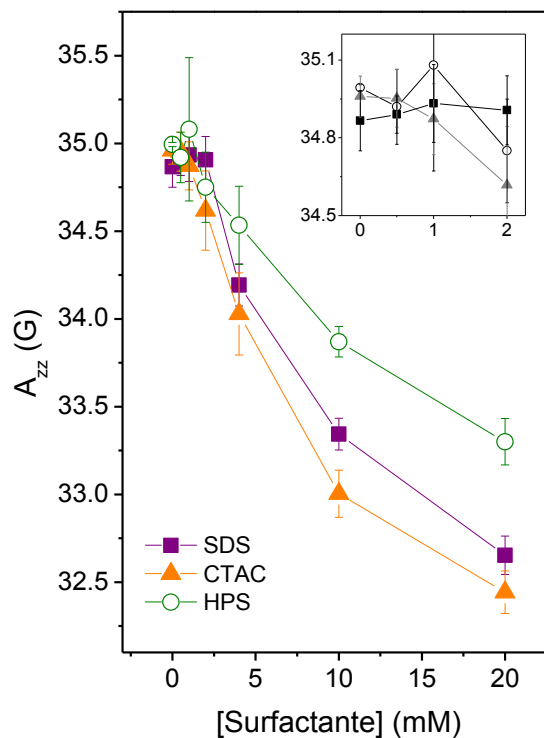


Figura 5.10: Componente principal z do tensor hiperfino $2A_{zz}$ para a componente S em função da concentração de surfactante, obtida a partir da curva de melhor ajuste dos espectros de RPE, utilizando o programa NLLS. Em destaque, no canto superior direito da figura, é mostrado o perfil das curvas em baixas concentrações de surfactantes. A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

O ambiente em torno do marcador de spin contatando a cadeia polipeptídica da BSA (S) torna-se menos polar com o aumento da concentração dos surfactantes, como indicado pelos valores de A_{zz} . Além disso, a polaridade do meio, monitorada pela componente

S do Mal-5, foi reduzida consideravelmente em concentrações acima de 10 mM, porém de forma diferente para cada um dos surfactantes, seguindo a ordem: HPS < SDS < CTAC. E, assim como indicado pelos outros parâmetros comentados anteriormente, o nitróxido sentiu um menor efeito, quando a BSA foi submetida ao surfactante zwitteriônico, indicando que a distribuição do HPS na região em torno da cisteína acontece de forma a não expor tanto a cadeia hidrofóbica desta molécula, quando comparado aos outros surfactantes.

5.3 Perfil Termodinâmico do Marcador de Spin

O logaritmo natural da razão da população de marcadores de spin nos dois estados de movimento, N_w/N_S , em função do recíproco da temperatura absoluta (T^{-1}) para amostras tratadas com 10 mM de SDS, CTAC e HPS, é apresentado na Figura 5.11. O gráfico mostra um comportamento linear bimodal para os três surfactantes estudados. Para temperaturas de até cerca de 26°C as curvas possuem inclinação negativa acentuada, e a partir deste ponto a inclinação diminui. Esta inclinação negativa nas curvas do $\ln N_w/N_S$ já era esperada, uma vez que a população de marcadores da componente S aumenta nos espectros de proteínas marcadas com maleimido para baixas temperaturas; o aumento da temperatura induz um acréscimo no número de marcadores da componente W.

Como esperado, podemos notar da Figura 5.11 que as alterações promovidas pelos surfactantes SDS e CTAC na BSA foram similares em todo intervalo de temperatura, enquanto que o HPS teve um efeito menor. Como a BSA está em constante movimento e sofrendo mudanças conformacionais quando a temperatura muda, este resultado é um indicativo de que a ligação de cada surfactante na proteína não depende simplesmente de sua capacidade em penetrar nos sítios de ligação da BSA, mas é processo um pouco mais complexo e que envolve outros fatores. Vale a pena mencionar que os espectros de RPE se mostraram completamente reversíveis no intervalo de temperatura estudado (dados omitidos) mostrando que as duas configurações da cadeia lateral do nitróxido no domínio I da BSA estão em equilíbrio termodinâmico. Neste contexto, Moriyama e colaboradores estudaram extensivamente os processos de renovelamento (do inglês *refolding*) de proteínas [67]. Seus resultados mostraram que a desnaturação térmica de BSA tem um aspecto característico: a mudança conformacional é reversível para temperaturas até 50°C, mas é apenas parcialmente

reversível acima desta temperatura, em acordo com nossos resultados.

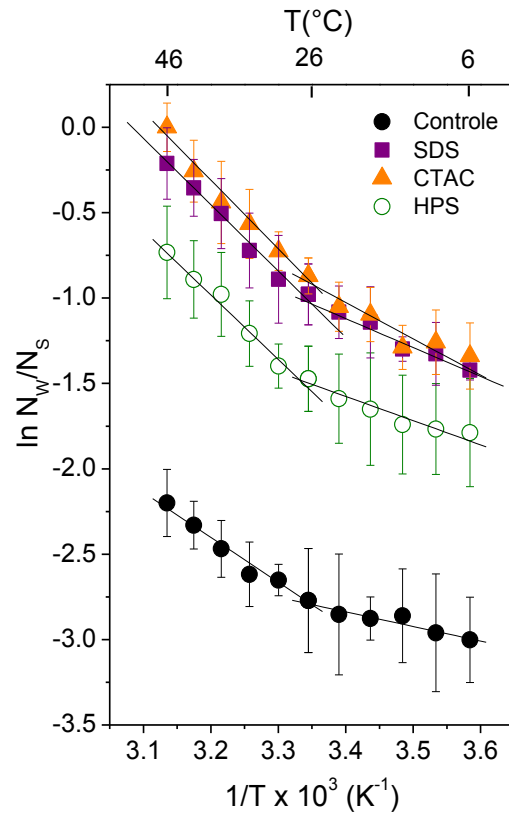


Figura 5.11: Logaritmo natural da razão entre as populações de marcadores de spin das componentes fracamente e fortemente imobilizadas, N_w/N_s , obtidas a partir do melhor ajuste dos espectros de RPE do Mal-5 estruturado em BSA na presença e na ausência de 10 mM de surfactante, como função do recíproco da temperatura absoluta. A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

Para obter informações mais precisas acerca da estabilidade e interação da BSA com os surfactantes submetidos a diferentes temperaturas (6-46°C), o perfil termodinâmico do sistema foi traçado. Os parâmetros termodinâmicos podem ser determinados considerando que a população relativa das componentes S e W satisfaz a função de distribuição de Boltzmann, com apenas dois níveis de energia em que cada um possui n estados de degenerescência, ou n maneiras de se obter este nível de energia, podemos escrever a seguinte expressão para a razão entre as populações [68]:

$$N_w = \left(\frac{n_w}{n_s}\right) \cdot N_s \cdot e^{-(E_w - E_s)/RT} \quad (5.1)$$

ou

$$\ln \frac{N_w}{N_s} = \ln \frac{n_w}{n_s} - \frac{(E_w - E_s)}{RT} \quad (5.2)$$

onde N_w/N_s é um fator pré-exponencial que reflete a razão entre o número de configurações para formar as componentes W e S, respectivamente. E_w e E_s são as energias do nitróxido em suas duas configurações na proteína.

Em equilíbrio termodinâmico $\Delta G = 0$, e a energia livre padrão de Gibbs (ΔG^0) está relacionado à constante de equilíbrio K entre os dois estados dos marcadores de spin através da relação

$$\ln K = \ln \frac{N_w}{N_s} = -\frac{\Delta G^0}{RT}, \quad (5.3)$$

onde R é a constante universal dos gases e T a temperatura absoluta em Kelvin. Como ΔG^0 pode ser escrito como a soma

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0, \quad (5.4)$$

onde ΔH^0 e ΔS^0 são as variações de entalpia e entropia na temperatura em que ΔG^0 está sendo avaliado. Assim, podemos escrever

$$\ln K = -\frac{\Delta G^0}{RT} = \frac{\Delta S^0}{R} - \frac{\Delta H^0}{RT}, \quad (5.5)$$

A equação 5.5 mostra que, na prática, os valores numéricos de ΔS^0 e ΔH^0 podem ser determinados a partir do gráfico de van' t Hoff ($\ln N_w/N_s$ versus $1/T$), como o apresentado na Figura 5.11. Neste gráfico, o coeficiente angular da curva é dado por $-\Delta H^0/R$ e o coeficiente linear por $-\Delta S^0/R$. Na Tabela 5.1 estão apresentados os valores calculados para as variações nos parâmetros termodinâmicos $\Delta G_{S \rightarrow W}^0$, $\Delta H_{S \rightarrow W}^0$ e $\Delta S_{S \rightarrow W}^0$. Convém ressaltar que energia livre de Gibbs foi calculada para uma temperatura fixa de 30°C. Como já mencionado, nossos resultados mostraram que tanto as amostras controle, quanto as amostras

tratadas com surfactantes apresentaram mudanças na inclinação nas curvas em torno de 26°C (Figura 5.11), o que provavelmente se deve às mudanças conformacionais locais, isto é, na cavidade onde se localiza o sítio sulfidril. Por este motivo, a caracterização termodinâmica do sistema foi dividida em dois intervalos de temperatura para cada curva, 6-26°C e de 26-46°C.

Da Tabela 5.1 podemos notar que tanto a amostra controle quanto as amostras tratadas com surfactantes sofreram grandes variações de entalpia no intervalo de temperatura de 26-50°C. O aumento da temperatura faz com que o sistema absorva calor e fique menos organizado, indicando que a troca de S para W é um processo endotérmico com aumento de entropia. Por outro lado, a diferença na entalpia é também a energia necessária para dissociar a fração de marcadores com movimento restrito da proteína. Em outras palavras, esta diferença representa o ganho energético do nitróxido para formar ligações de hidrogênio com a proteína ao invés de ser exposto ao tampão. A espontaneidade da ligação dos surfactantes à BSA pode ser verificada pelos baixos valores de ΔG apresentados na tabela. Podemos ver ainda que as amostras tratadas com SDS mostraram altos valores de N_w/N_s em todo intervalo de temperatura (Figura 5.11), indicando que a presença do surfactante contribui para o equilíbrio $s \leftrightarrow w$ junto à formação da componente W, que representa a configuração de maior energia ou menor estabilidade. Por outro lado, baixas temperaturas contribuem para que haja uma estabilização da configuração S com mudanças irrisórias na entropia para BSA pura, e pequenas mudanças para BSA tratada, quando comparado aos valores de ΔS^0 em altas temperaturas.

Tabela 5.1: Alterações na energia livre padrão de Gibbs (a 30°C), entalpia e entropia para dissociar a cadeia lateral do nitróxido da cadeia polipeptídica da proteína. A BSA (0,15 mM) foi marcada com o marcador de spin derivado do maleimido Mal-5. Os surfactantes foram adicionados em uma concentração de 10 mM.

Amostras	$\Delta G_{S \rightarrow W}^0$ (kJ/mol)	$\Delta H_{S \rightarrow W}^0$ (kJ/mol)		$\Delta S_{S \rightarrow W}^0$ (J/mol. K)	
		Intervalo de Temperatura (°C)			
		6-26	26-46	6-26	26-46
BSA	6.7	7.1	21.7	0.4	49.8
BSA + HPS	3.3	11.7	31.4	26.8	92.5
BSA + SDS	2.1	14.2	32.2	38.5	98.4
BSA + CTAC	1.7	17.6	33.9	51.5	106.3

* Os valores numéricos foram calculados utilizando a Equação 5.5 e os dados do gráfico apresentado na Figura 5.11, veja detalhes no texto.

Na Figura 5.12 são mostrados os dois tempos de correlação rotacional para as duas componentes espectrais, $\tau_c(W)$ e $\tau_c(S)$, em função da temperatura. Como era de se esperar, houve uma diminuição nos valores de τ_c , ocasionado pelo aumento da mobilidade da cadeia polipeptídica da BSA à medida que a temperatura era aumentada. Podemos notar ainda que, similarmente ao que foi observado na Figura 5.11, ambos os parâmetros foram totalmente sensíveis ao aumento da temperatura e aos efeitos dos surfactantes a 10 mM. Os efeitos dos surfactantes sobre a mobilidade da cadeia lateral da proteína foram maiores, como pode ser visto pelo comportamento do $\tau_c(S)$ (Figura 5.12A), ao passo que as mudanças notadas na viscosidade local causadas pelos surfactantes, as quais foram monitoradas pelos valores de $\tau_c(W)$, mostraram uma diferença maior em relação à amostra controle somente em altas temperaturas (Figura 5.12B). Podemos observar ainda que o indicativo de mudança conformacional observado anteriormente na Figura 5.11 é também refletido nos parâmetros de mobilidade $\tau_c(W)$ e $\tau_c(S)$, com efeito modesto na dinâmica dos marcadores da componente W.

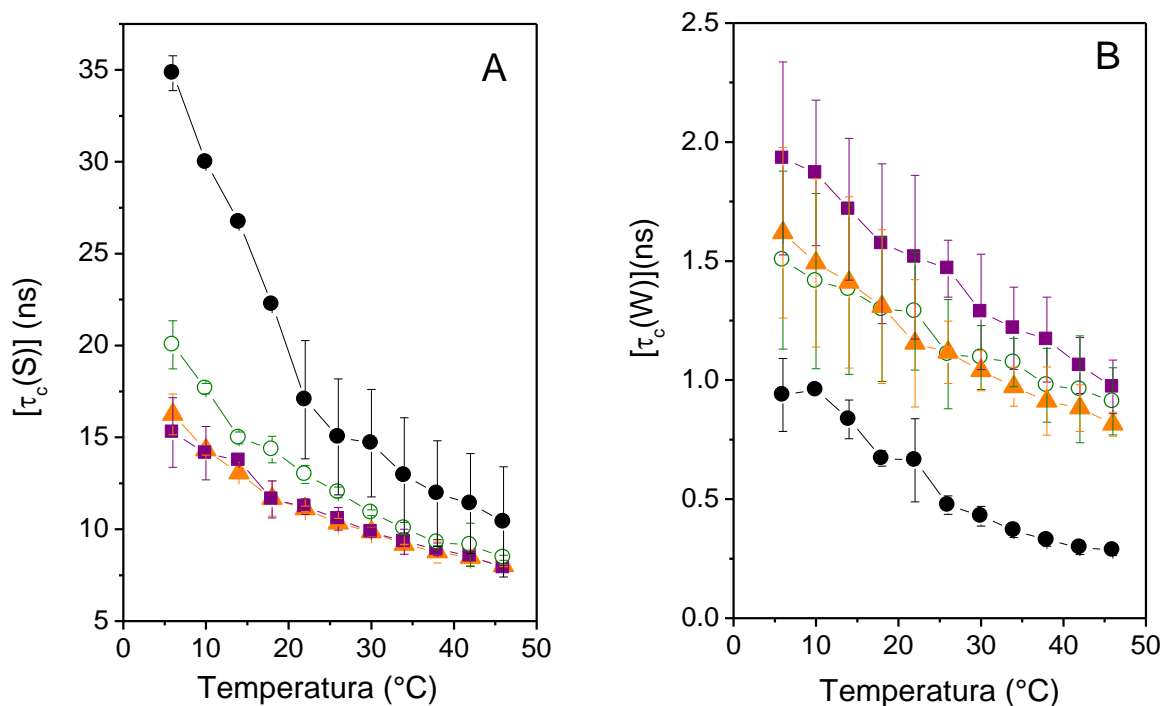


Figura 5.12: Dependência do tempo de correlação rotacional com a temperatura para as componentes fortemente ($\tau_c(S)$, painel A) e fracamente ($\tau_c(W)$, painel B) imobilizadas, obtida do espectro de melhor ajuste do marcador Mal-5 em BSA pura (círculos fechados) e BSA tratada com 10 mM de SDS (quadrados), de CTAC (triângulos) e de HPS (círculos abertos), de surfactantes.

A dinâmica da BSA e do complexo BSA-surfactantes submetido às variações da temperatura foi também avaliada pelo parâmetro $2A_{//}$, Figura 5.13. Vemos então que o parâmetro $2A_{//}$ também é altamente sensível ao aumento da temperatura. Entretanto, não foi possível notar a “quebra”, indicativa de mudança conformacional, observada nas duas últimas figuras apresentadas, na inclinação das curvas do $2A_{//}$. Isto ocorre porque este parâmetro, diferente de τ_c , não tem uma relação linear com a temperatura, sendo menos adequado para analisar o comportamento térmico da dinâmica molecular. Resultados como este mostram a importância da simulação dos espectros, uma vez que pequenas alterações na conformação de uma proteína são de extrema importância na caracterização de sua capacidade em ligar pequenas moléculas.

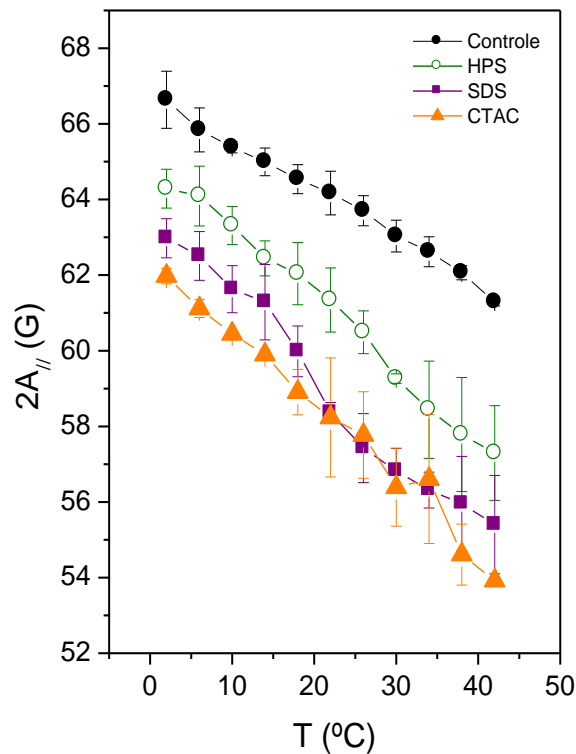


Figura 5.13: Dependência do parâmetro espectral $2A_{//}$ com a temperatura, obtida diretamente do espectro experimental do marcador Mal-5 em BSA pura e BSA tratada com 10 mM de surfactantes. O $2A_{//}$ é altamente sensível às variações de temperatura, refletindo as mudanças na mobilidade do nitróxido. A incerteza nos pontos representa o desvio na medida entre três experimentos independentes.

5.4 Efeitos dos Surfactantes Avaliados por Espalhamento de Luz Dinâmica

A Figura 5.14 mostra o comportamento do diâmetro hidrodinâmico médio, D_h , em função da temperatura para BSA (10 mg/ml) em pH 7,4. Na ausência dos surfactantes a BSA apresentou um valor de D_h muito estável, em torno de 9,2 nm a 25°C, em concordância com resultados reportados na literatura [69, 70]. Sendo assim, sob estas condições experimentais a alta estabilidade da proteína foi confirmada e o tamanho da partícula não foi modificado. No entanto, quando altas temperaturas são alcançadas (~54°C) a desnaturação da proteína ocorre, seguida por algumas agregações das proteínas, como denotado pelo alto valor do diâmetro hidrodinâmico até 24 nm (veja Tabela 5.2). Como mencionado acima, a temperatura de desnaturação crítica foi definida em torno de 54°C em pH 7.4, ponto onde houve mudança drástica na dimensão do espalhamento das partícula, sugerindo a presença de agregados na solução como resultado do processo de desnaturação de proteína. Resultados de DSC em que a BSA é submetida a variações térmicas, mostram uma temperatura crítica de desnaturação em torno de 64°C, com estágio inicial em 55°C [71].

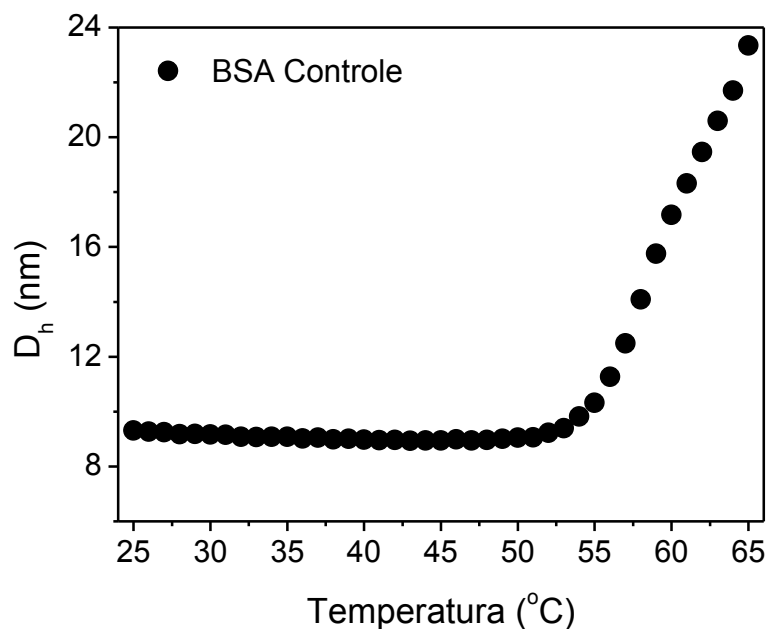


Figura 5.14: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA pura, num intervalo de temperatura de 25-65°C. O aumento dos valores de D_h em torno de 53°C indica o início da desnaturação da proteína.

Na Figura 5.15 podemos notar claramente a alta estabilidade da proteína na presença do surfactante aniônico SDS. O diâmetro hidrodinâmico da BSA, tratada com 4 e 10

mM de SDS, não sofreu qualquer alteração significativa em todo o intervalo de temperatura avaliado. Este resultado sugere que o SDS em concentrações na faixa de milimolar promove uma estabilização térmica da estrutura global da BSA, fazendo com que a temperatura crítica de desnaturação seja deslocada para valores maiores. Este resultado mostra que, de alguma forma, o SDS modifica a estrutura da BSA diminuindo seu grau de flexibilidade e, conseqüentemente alterando sua temperatura de desnaturação.

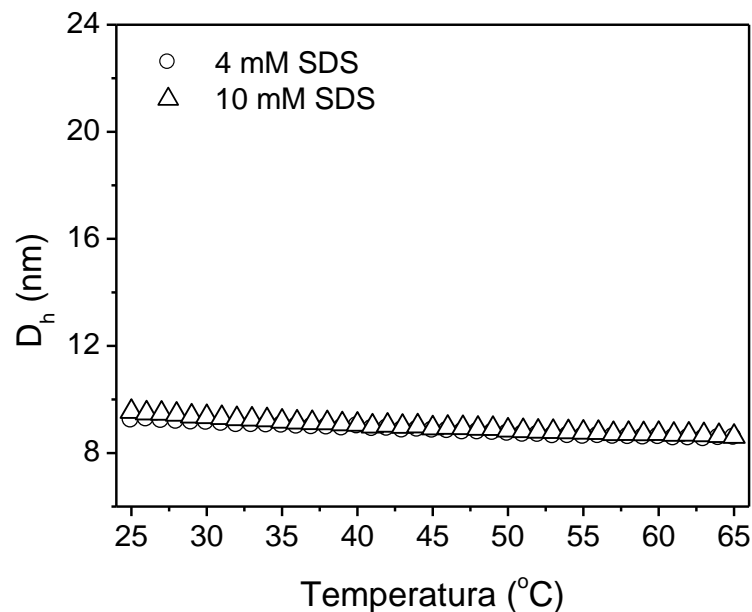


Figura 5.15: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 4 mM (círculos) e 10 mM (triângulos) de SDS, num intervalo de temperatura de 25-65°C.

Convém mencionar que os experimentos de DLS avaliam a estrutura oligomérica total da BSA, enquanto que os resultados de RPE mostram o comportamento da região da proteína em torno do radical nítróxido. Nossos resultados de DLS estão consistentes com dados de difração circular (CD) sobre o renovelamento da BSA na presença de surfactantes [67] e com resultados de DSC [71, 72] obtidos em estudos do efeito da estabilização do SDS. Os resultados mostraram que a desnaturação térmica de BSA pura é apenas parcialmente reversível para temperaturas acima de 50°C, o que não ocorre quando a proteína é tratada com SDS, indicando que a estrutura da proteína é quase que totalmente protegida das mudanças conformacionais irreversíveis causadas pela desnaturação térmica na presença de altas quantidades de SDS [67]. Por outro lado, Santos e colaboradores mostraram que numa razão

de SDS:BSA abaixo de 10:1, o surfactante estabiliza a proteína, elevando a temperatura crítica de desnaturação para 70-85°C [71], e que, diferentemente da BSA pura, duas transições separadas são observadas. Interessante que esta concentração de SDS corresponde à região de alta afinidade de ácidos graxos e surfactantes pelos sítios da BSA [73, 74, 72]. Por outro lado, em altas taxas de SDS:BSA uma única transição é observada, e, mesmo em razões da ordem de 35:1, a temperatura crítica de desnaturação está em torno de 78°C [71]. Como em nossos experimentos a temperatura máxima alcançada foi de 65°C, nós não pudemos observar a temperatura crítica de desnaturação.

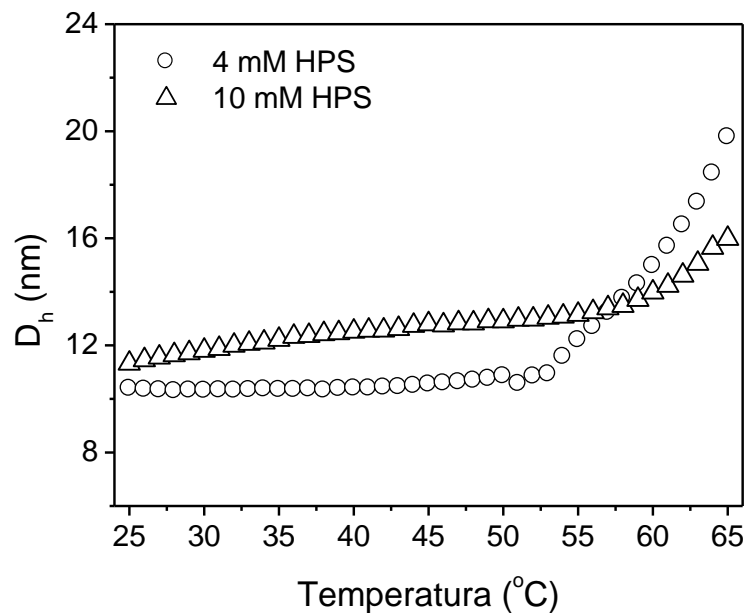


Figura 5.16: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 4 mM (círculos) e 10 mM (triângulos) de HPS, num intervalo de temperatura de 25-65°C.

Na Figura 5.16 são mostradas as curvas do diâmetro hidrodinâmico em função da temperatura, para BSA tratada com 4 e 10 mM do surfactante zwitteriônico HPS. O valor do diâmetro hidrodinâmico da BSA na presença de 4 mM de HPS a 25°C é de 10,4 nm. Este aumento relativamente pequeno de D_h , já evidente em 25 °C, quando comparado ao valor em BSA pura, indica que há uma pequena expansão da proteína na presença das micelas de HPS. Uma vez que a cmc do HPS encontra-se em concentrações bem pequenas, abaixo de 0,1 mM, tal que em 10 mM uma quantidade significativa de micelas está presente na solução. É importante mencionar que os valores de D_h medidos para micelas puras de HPS em 4 e

10 mM foram de aproximadamente 8,5 nm, em concordância com resultados reportados em experimentos de SAXS (8,4 nm, [75]). A desnaturação da proteína, induzida pela temperatura, na presença de 4 mM de HPS, é percebida pelo gradual aumento do D_h , tendo início em temperaturas próximas às observadas para BSA pura, isto é, em torno de 54°C. As temperaturas correspondentes às temperaturas do início do processo de desnaturação (T_{den}) são apresentadas na Tabela 5.2. Na presença de 10 mM de HPS, o estágio inicial de D_h observado foi de 11,3 nm, indicando maior expansão da proteína em relação às amostras tratadas com 4 mM de HPS.

Tabela 5.2: Valores do diâmetro hidrodinâmico médio ($\langle D_h \rangle$) e temperatura crítica (T_{den}) associados aos efeitos da concentração dos surfactantes na BSA (10 mg/ml). Todos os valores listados nesta tabela foram obtidos diretamente das curvas mostradas nas Figuras 5.14-5.17, para intervalos de temperatura de 25-65°C.

[Surfactante] (mM)	$\langle D_h \rangle$ (nm)	T_{den} (°C)	$\langle D_h \rangle_{den}$ (nm)
SDS			
0	9.3±0.5	53±1	24±1
4	9.3±0.5	-	-
10	9.5±0.5	-	-
HPS			
4	10.4±0.5	53±1	20±1
10	11.3±0.5	58±1	16±1
CTAC			
0,5	9.6±0.5	50±1	28±1
2	11.0±0.5	52±1	850±20
4	11.2±0.5	54±1	1340±20
10	11.6±0.5	56±1	15±1

$\langle D_h \rangle$ diâmetro hidrodinâmico médio a 25°C; T_{den} temperatura crítica de desnaturação (início do processo de desnaturação); $\langle D_h \rangle_{den}$ raio hidrodinâmico médio em altas temperaturas.

Podemos notar claramente da Figura 5.16 que os valores de D_h aumentam lentamente com a elevação da temperatura até o valor crítico em torno de 58°C, onde uma mudança drástica na inclinação da curva é observada, o que, provavelmente, está associado a desnaturação da BSA. Os valores médios de D_h obtidos em nossos experimentos para altas

temperaturas, na presença de HPS, foram similares aos observados para BSA pura (Tabela 5.2).

Por fim, na Figura 5.17 as curvas do D_h , para BSA tratada com 4 e 10 mM dos surfactante catiônico CTAC, em função da temperatura são mostradas. Os valores do diâmetro hidrodinâmico da BSA na presença de 0,5 mM de CTAC tiveram um leve aumento a 25°C quando comparado ao D_h da BSA pura, e alcançando valores em torno de 11,0-11,6 nm para concentrações entre 2 e 10 mM. Este aumento, similar ao observado nas amostras tratadas com HPS, pode ser também associado a uma expansão da proteína. Para 2 e 4 mM de CTAC (figura omitida), são observados agregados de proteína em altas temperaturas, caracterizados pelos altos valores de D_h (Tabela 5.2). Os valores de D_h obtidos para micelas puras de CTAC a 4 e 10 mM foram de aproximadamente 6,5 nm, resultado idêntico aos valores obtidos nos experimentos de SAXS (6,5 nm [75]). Nestes experimentos, uma distribuição bimodal foi observada, com uma pequena contribuição de centenas de grandes partículas, especialmente a 4 mM, o que contribui para o alto valor de D_h .

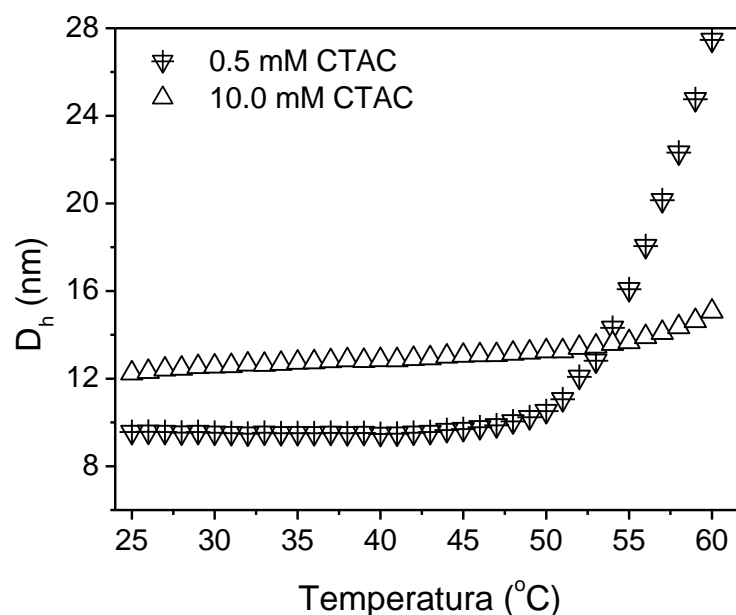


Figura 5.17: Variação no diâmetro hidrodinâmico (D_h) da BSA tratada com 0,5 mM (triângulos invertidos) e 10 mM (triângulos) de CTAC, num intervalo de temperatura de 25-65°C.

6 Discussão

De acordo com trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório [16], a desidratação das proteínas do estrato córneo aumenta a energia livre padrão de Gibbs $\Delta G_{S \rightarrow W}^0$, estabilizando a interação da cadeia lateral do nitróxido com a cadeia polipeptídica das proteínas. Baixas temperaturas, ou pouco conteúdo de água, deslocam o equilíbrio $s \leftrightarrow w$ para maior formação da componente S, liberando calor e diminuindo a entropia. No presente trabalho, efeito contrário foi observado quando as proteínas foram submetidas aos surfactantes (Tabela 5.1), sugerindo que a redução nos valores de $\Delta G_{S \rightarrow W}^0$ corresponde a uma maior exposição da BSA ao solvente. Isto sugere que a presença do surfactante, interagindo com as cadeias polipeptídicas, diminui o número de sítios para formação de ligação de hidrogênio nitróxido-proteína. Por outro lado, a desidratação da proteína acarreta em um aumento da entalpia $\Delta H_{S \rightarrow W}^0$ [16], indicando que a energia necessária para dissociar a cadeia lateral do marcador de spin da proteína é maior quando o conteúdo de água é reduzido, ou seja, quando há menor atividade da água (menor capacidade de solubilização). Neste contexto, o efeito dos surfactantes foi similar à desidratação da BSA (Tabela 5.1). Este resultado é um forte indicativo de que as micelas dos surfactantes também reduzem a atividade do solvente do sistema, levando a uma menor capacidade em dissolver a cadeia lateral do nitróxido. Convém mencionar ainda resultados obtidos em trabalhos (não publicados) realizados por nosso grupo, no qual o perfil termodinâmico de marcadores de spin derivados do maleimido, mas com diferentes espaçadores entre o grupo maleimido e o anel pirrolidone do nitróxido, foi determinado. Ambas as quantidades $\Delta G_{S \rightarrow W}^0$ e $\Delta H_{S \rightarrow W}^0$ diminuíram com o aumento do comprimento da cadeia lateral do nitróxido. Aumentando a cadeia lateral do nitróxido, a distância entre o resíduo Cys-34 e o fragmento N-O do nitróxido também aumenta, resultando em uma maior exposição ao solvente (menor valor de $\Delta G_{S \rightarrow W}^0$), reduzindo a energia necessária para transferir os marcadores de spin do estado contatando a proteína (S) para o estado do nitróxido contatando o solvente (W, menor valor de $\Delta H_{S \rightarrow W}^0$). Sendo assim, os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos fortalece a interpretação de que os surfactantes, a 10 mM, contribuem para a estabilidade da BSA em uma conformação mais expandida e mais exposta ao solvente, e também, produz a diminuição na atividade do solvente, o que pode ser explicado pela

presença de micelas no ambiente do nitróxido, isto é, nas vizinhanças do resíduo Cys-34.

Neste contexto, é útil comparar nossos dados com resultados reportados por Santos e colaboradores, em que foi investigada a interação da BSA com surfactantes iônicos, baseado em estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) [76]. Neste trabalho foi reportado que, para concentrações de até 2 mM de SDS, a BSA não sofre qualquer alteração em sua conformação global detectada pelos experimentos de SAXS. Entretanto, algumas alterações foram observadas para amostras tratadas com 5 mM de SDS, alterações consistentes com a expansão da proteína, evidenciado tanto pelo aumento do raio de giro, que passou de $32,1 \pm 0,2$ Å (BSA pura) para $39,1 \pm 0,5$ Å (na presença de 5 mM de SDS), quanto pela dimensão máxima da proteína, que aumentou de 100 Å para 130 Å. Por outro lado, para concentrações maiores que 10 mM, foi necessário analisar os dados de SAXS usando o modelo do “colar de pérolas” (Figura 1.7) [77, 73], no qual foi considerado a ligação de agregados micelares à proteína. Os autores estimaram que cerca de 5-6 destes agregados se ligam a cada molécula de proteína, número semelhante ao da ligação de ácidos graxos específicos (e surfactantes) aos sítios da BSA [78]. Além disso, a 10 mM de surfactante, estas estruturas micelares apresentavam formatos esféricos, enquanto que em altas concentrações elas foram mais bem descritas por estruturas elipsoidais. O modelo, o qual é baseado em uma descrição fractal do sistema proteína-surfactante, também sugere que, acima de 10 mM de SDS, ocorre a desnaturação da proteína, ao passo que a 50 mM há uma saturação dos sítios de ligação da BSA. Embora esta estabilidade reduzida pareça contradizer nossos dados de DLS descritos acima, é importante ressaltar que todos estes experimentos de SAXS foram realizados em pH 5,4, no qual a intensidade iônica é baixa e as condições são favoráveis para a desnaturação de proteínas, diferentemente do tampão salino (pH 7,4) utilizado em nosso trabalho. Nossos resultados, apresentados nas Figuras 5.7-5.10, foram totalmente consistentes com interpretação descrita neste parágrafo. Como o HPS, em solução aquosa pura, tem um valor de cmc de $\sim 0,09$ mM, muito menor que o valor da cmc do SDS ($\sim 8,0$ mM) e do CTAC ($\sim 1,3$ mM), mesmo em concentrações baixíssimas ele já se encontra em sua forma micelar. Provavelmente, isto influencia no efeito gradual sobre os parâmetros de RPE do Mal-5 na BSA, e no fato da ligação deste surfactante à proteína, atingir a saturação em concentrações menores que o SDS e o CTAC.

Wang e colaboradores [79] inseriram o marcador fluorescente *6-acryloyl (dimethylamino) naphthalene (acrylodan)* na BSA, que, assim como o marcador de spin Mal-5, também reage covalentemente com o grupo tiol do único resíduo de cisteína livre (Cys-34) da proteína. Um resultado interessante sobre a intensidade fluorescente do *acrylodan* na BSA foi observada e o espectro de emissão pôde ser descrito também por um decaimento duplo-exponencial (dois processos distintos). Este resultado foi interpretado com uma forte evidência de que a relaxação espectral do *acrylodan* no interior da BSA é explicada por dois processos independentes com taxas constantes caracterizadas pelos valores de $1/k_1 = 6.7 \cdot 10^{-10}$ s e $1/k_2 = 6.7 \cdot 10^{-9}$ s, os quais diferem entre si por uma ordem de magnitude. Estes valores de taxas foram independentes da temperatura, enquanto que a contribuição fracionária da taxa de maior movimento aumentou com o aumento da temperatura. Além disso, entre as temperaturas de 10 e 25°C, estas contribuições permaneceram essencialmente constantes, ao passo que uma mudança mais rápida foi observada para um intervalo de temperatura entre ~30 e 55°C. Estes resultados estão em total acordo com nossos resultados de RPE, apresentados na Figura 5.11, nos quais um aumento na inclinação das curvas foi observado no intervalo de temperatura de 26-46°C, mesmo para amostras tratadas com surfactantes. Este comportamento sugere que mudanças estruturais na região do grupo sulfidril da BSA ocorrem, devido à configuração conformacional mais exposta ao solvente. Estas alterações, provavelmente, estão associadas a uma abertura na cavidade do domínio I (onde se encontra o grupo-SH) da BSA em temperaturas maiores que 25°C, ocorrendo também na presença dos surfactantes. Esta interpretação corrobora com medidas de fluorescência de BSA marcada com *acrylodan* na presença de SDS, em que um aumento no semiângulo, θ , através do qual a cadeia lateral do *acrylodan* é capaz de precessionar durante o tempo de vida do estado excitado. Especificamente, neste estudo foi determinado que o ângulo aumenta cerca de 15° em relação à BSA nativa para uma estrutura mais "aberta" quando a concentração de SDS é 1 mM [80].

A espectroscopia de Fluorescência no estado estacionário (*steady-state*) tem sido usada para estudar a interação da BSA com o surfactante aniônico SDS, o catiônico CTAB e o não-iônico TX-100, usando a fluorescência intrínseca do triptofano e a fluorescência de um marcador externo, anilino-naftalina-sulfato (ANS), que se liga de forma não covalente a muitas proteínas [81]. Os resultados deste estudo mostraram que todos os surfactantes estudados são capazes de induzir mudanças conformacionais na

BSA; embora, entre eles, o surfactante não-iônico mostrou um efeito menor, sugerindo uma menor interação com a proteína. Curioso que o número médio de moléculas de SDS ligada por molécula de BSA, determinada pela titulação do surfactante e monitorada por fluorescência do triptofano, foi cerca de 160 [81]. Neste contexto, nossos resultados, obtidos por espectroscopia de RPE, mostraram que o efeito do SDS na BSA atinge a saturação em cerca de 10 mM (67 moléculas de SDS por BSA) quando olhamos para o tempo de correlação rotacional (Figura 5.8), mas quando olhamos para a população relativa das componentes S e W (Figura 5.9), ou para a polaridade do radical nitróxido ligado a cadeia lateral da proteína (Figura 5.10), esta saturação é alcançada para concentrações maiores que 20 mM (133 moléculas de SDS por BSA).

A espectroscopia de RPE, usando marcadores de spin derivados de ácidos graxos, também tem sido extensivamente usada para investigar a interação da BSA com surfactantes [82, 83, 84]. Foi reportado que os marcadores de spin derivados de ácidos graxos competem com os surfactantes pelos sítios de ligação da proteína, e que estes marcadores na proteína resultam em espectros compostos também por duas componentes espectrais, porém, com interpretações diferentes das componentes aqui propostas. Por exemplo, no caso do marcador de spin 16-doxil ácido esteárico, no sistema BSA-CTAC, duas populações de marcadores de spin foram observadas: 1) componente 1, associada aos nitróxidos ligados às regiões hidrofóbicas da BSA, com τ_c (1) = 2,8 ns e uma constante de acoplamento ^{14}N -hiperfino isotrópico, a_0 , de 15,7 G, que aumenta a medida que a polaridade do ambiente em torno do radical nitróxido também aumenta; 2) componente 2, associada aos nitróxidos estruturados nas micelas dos surfactantes, com τ_c (2) = 1,2 ns e $a_0 = 14,8$ G [83]. Nesta mesma linha de raciocínio, Christodoulou e colaboradores [85, 86] propuseram um modelo em que, o grupo tiol Cys-34 possui duas conformações, no qual predomina a conformação mais inserida do grupo tiol na forma reduzida. Por outro lado, o grupo tiol Cys-34 se torna mais exposto ao ser oxidado, e sua reatividade é altamente afetada pela presença de ligantes na proteína. Por exemplo, ácidos graxos que se ligam a sítios relativamente distantes do Cys-34, induzem mudanças conformacionais na região em torno do grupo tiol, e, conseqüentemente, expõe mais este grupo ao solvente [1, 87].

No presente trabalho, mostramos que o marcador de spin derivado do maleimido covalentemente ligado ao resíduo Cys-34 da BSA apresenta também um espectro de RPE com duas componentes superpostas: 1) uma componente mais restrita

(S), quando a cadeia lateral do nitróxido interage com a cadeia polipeptídica da proteína; e 2) uma componente menos restrita (W), para os marcadores de spin mais expostos ao solvente e sem interação da cadeia lateral com a proteína. Para o sistema BSA-CTAC, os valores de τ_c e a_0 para as duas componentes são, respectivamente, τ_c (S) = 11,8 ns e a_0 (S) = 17,0 G, e τ_c (W) = 0,8 ns e a_0 (W) = 17,1 G, para o marcador nitróxido covalentemente ligado. Ficou claro que, para o Mal-5 covalentemente ligado a BSA submetida ao CTAC, a polaridade é muito similar para as duas componentes, e uma significativa diferença é observada apenas no tempo de correlação rotacional.

A interação de BSA, na sua forma intermediária (“*molten globule*”, estado intermediário entre BSA nativa e BSA desnaturada), com surfactantes iônicos foi estudada usando as técnicas de fluorescência e dicroísmo circular [88]. Os resultados mostraram que tanto o surfactante não-iônico (Tween-20), o catiônico (CTAB), quanto o aniônico (SDS) são capazes de induzir mudanças conformacionais na BSA intermediária de forma similar, e que quando o pH do meio encontra-se bem acima do ponto isoelétrico (pH~11,2) o surfactante catiônico (CTAB) interage com a BSA de forma mais intensa, uma vez que a carga da proteína neste pH é altamente negativa, e assim as interações eletrostáticas se tornam altamente relevantes. Em acordo com esses resultados, nossos dados mostraram que as alterações na dinâmica da cadeia polipeptídica da BSA foram similares para os três surfactantes estudados (Figura 5.8), e, interessante, os surfactantes de cargas opostas CTAC e SDS foram os que apresentaram maiores efeitos, sugerindo que a carga do grupo polar do surfactante não é determinante para sua ligação à proteína nestas condições experimentais. Como trabalhamos em uma faixa de pH em torno de 7,4 o papel da contribuição eletrostática não é determinante para o início da formação do complexo BSA-surfactante, mas sim pelas interações hidrofóbicas. Deste modo, pouca diferença pode ser notada no efeito de surfactantes com diferentes cargas sobre as proteínas, diferentemente do que ocorre em faixas extremas de pH,

Segundo resultados de Sousa Neto e colaboradores [83], em BSA a 0,15 mM tratada com 10 mM de surfactante, as frações do marcador de spin 5-DSA nos agregados de surfactantes foram de 0,82 para HPS, 0,15 para SDS e 0,0 para o CTAC. Estes resultados sugerem que o HPS, na presença de BSA, é capaz de formar grandes quantidades de estruturas micelares, em acordo com nossos resultados, o que pode ser explicado pelo seu pequeno efeito na proteína, e também pelos efeitos similares do SDS

e do CTAC. Além disso, estes dados são consistentes com o que observamos na redução da polaridade do ambiente em torno do marcador de spin à medida que a concentração de surfactante era aumentada (Figura 5.7), o que ocorre apenas para a cadeia lateral do nitróxido na conformação fortemente imobilizada (componente S). Da mesma maneira, reduções significativas nos valores da componente z do tensor de acoplamento ^{14}N -hiperfino foram observadas para concentrações de 20 mM de HPS (~1,5 G), SDS e CTAC (~2,5 G).

7 Conclusões

Nossos estudos usando a espectroscopia de RPE de um nitróxido ligado à cadeia lateral Cys-34 da BSA e medidas de DLS nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Soluções diluídas de BSA (0,005–0,2 mM) alteram os parâmetros espectrais de RPE indicando um sítio sulfidríla mais exposto ao solvente (maior população de componente W). Com a diluição a atividade da água aumenta tendo maior capacidade de solubilizar a cadeia lateral do nitróxido. Neste estudo foi utilizada uma concentração de BSA de 0,15 mM, sendo que a concentração sanguínea de HSA no organismo humano é de aproximadamente 0,6 mM.
- Usando a metodologia de simulação computacional dos espectros de ressonância paramagnética eletrônica, a albumina pode ser caracterizada. Os valores do tempo de correlação rotacional, obtidos por meio dos espectros de melhor ajuste, mostraram que a mobilidade da cadeia polipeptídica da proteína aumenta na presença dos surfactantes, evidenciado pelos valores de $\tau_c(S)$ da componente S. Já os marcadores da componente W sofrem diminuições em sua mobilidade, relacionada a presença dos surfactantes no solvente.
- Na presença dos surfactantes SDS, CTAC ou HPS a BSA assume uma conformação mais expandida com maior exposição ao solvente, acarretando no aumento da dinâmica da cadeia polipeptídica. A fração de cadeia lateral do nitróxido exposta ao solvente é maior na presença dos surfactantes.
- A viscosidade do solvente aumenta devido à presença de micelas, sendo isto indicado pela redução de mobilidade da componente W.
- Em baixas concentrações de surfactantes, para uma relação molar surfactante: BSA menor de (10:1), os três surfactantes estudados modificam o comportamento da proteína de forma semelhante, indicando que a metodologia aplicada não é capaz de discriminar as possíveis diferenças entre as ligações a sítios específicos de alta energia na proteína dos surfactantes aniônicos, catiônicos e zwitteriônicos.
- A presença de 10 mM dos surfactantes faz com que a temperatura de desnaturação da BSA seja deslocada para temperaturas maiores. Para HPS e CTAC a

desnaturação aparece em temperaturas de até 60°C, já para o SDS a desnaturação não é observada neste intervalo.

- Em altas concentrações de surfactante (razão molar de em torno de 60:1), efeito menor para HPS foi observado, quando comparado com os outros dois surfactantes, SDS e CTAC, sugerindo que, em concentrações elevadas, a interação surfactante-BSA é fortemente influenciada pela competição entre as afinidades do surfactante para formar suas próprias micelas e agregados micelares semelhantes na proteína.
- Os três surfactantes estudados causaram diminuições na energia livre de Gibbs ($\Delta G_{W \rightarrow S}^{\circ}$), quando em concentrações em torno de 10 mM, estabilizando a proteína em sua conformação mais expandida e exposta ao solvente. Também pôde ser notados aumentos na entalpia, o que pode ser atribuído à redução na atividade do solvente, devido à presença das micelas de surfactantes e conseqüente menor capacidade de solubilização por parte do solvente.
- Todos os detergentes aumentaram o movimento das cadeias polipeptídicas, mas a presença deles na forma micelar limitou o movimento rotacional da cadeia lateral do nitróxido, indicando maior viscosidade do solvente.

PARTE II

**OXIDAÇÃO E EFEITO ANTIOXIDANTE DE POLIFENÓIS
EM LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE
AVALIADAS POR RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA
ELETRÔNICA**

1 Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em todo o mundo. No Brasil, elas foram responsáveis por 29% dos óbitos no ano de 2009, apresentando quase o dobro de impacto em relação à mortalidade geral quando comparadas às neoplasias [89]. Dentre os fatores de risco associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares estão as dislipidemias, principalmente nos casos em que há altas concentrações plasmáticas de colesterol total, de lipoproteínas de baixa densidade (LDL, sigla do inglês *Low Density Lipoprotein*), e baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL, sigla do inglês *High Density Lipoprotein*) [90]. Estudos mostram que pessoas com altos níveis plasmáticos de LDL em sua forma oxidada (oxLDL) desenvolvem mais doenças coronarianas, tais como a aterosclerose (doença base das principais complicações cardiovasculares do que indivíduos com baixos níveis de LDL [91, 92].

A LDL é a principal partícula carreadora de colesterol no sangue humano e é composta por uma única proteína e lipídios. A modificação de LDL em oxLDL, *in vivo*, deve-se principalmente às espécies reativas de oxigênio (moléculas resultante da oxidação ou redução do oxigênio molecular) produzidas por células ativadas. Os compostos antioxidantes podem remover os radicais livres e proteger a LDL contra a oxidação. Há um grande interesse nos estudos relacionados ao comportamento biofísico das lipoproteínas, principalmente devido à sua complexa composição e estrutura, a qual é dependente de sua composição lipídica e da conformação de sua única proteína, a apolipoproteína (ApoB-100) [93]. Apesar disso, a grande maioria das pesquisas envolvendo LDL está relacionada à sua oxidação (*in vitro* e *in vivo*) e à consequente inflamação das artérias humanas; isto é, à busca de evidências que contribuam para diminuir os riscos de doenças cardiovasculares, em especial a aterosclerose. Embora ninguém saiba precisar ao certo onde ocorre, como ocorre e quais enzimas são essencialmente responsáveis pelo desenvolvimento dessas doenças, é de fundamental importância explorar os diversos modos pelos quais a LDL sofre oxidação e encontrar compostos de baixo custo com atividade antioxidante, e assim contribuir para elucidar os meios para o tratamento da aterosclerose e doenças relacionadas. Deste modo, estudos utilizando técnicas que permitem avaliar de forma específica os diversos compartimentos da LDL são de grande interesse. Esta é uma das principais

características da técnica de RPE e do método dos marcadores de spin. O potencial desta metodologia no estudo de processos oxidativos em sistemas lipídicos e proteicos tem sido recentemente comprovado em nosso laboratório, utilizando células de eritrócitos [94]. No presente trabalho, usando a técnica de RPE de marcadores de spin, buscamos contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos oxidativos ocasionados por íons de cobre na LDL humana, bem como avaliar o efeito antioxidante de três polifenóis, ou seja, resveratrol, (+)-catequina e quercetina.

1.1 Características Gerais da LDL

Durante décadas várias técnicas tais como calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear (RMN), SAXS e técnicas de espalhamento de nêutrons têm sido empregadas para caracterizar a estrutura da LDL. Entretanto, devido ao seu grande tamanho, isto é 4536 resíduos de aminoácidos na ApoB-100 e cerca de 3743 moléculas de lipídios constituindo uma massa molecular em torno de 2,5 MDa [95], um modelo tridimensional da LDL ainda não foi completamente determinado. Por outro lado, pesquisas apontam para uma LDL descrita como uma partícula quase-esférica organizada em camadas, isto é, uma camada externa de alta densidade, contendo uma única proteína e rica em fosfolipídios polares, e de uma camada interna lamelar de baixa densidade que separa o núcleo em compartimentos, contendo lipídios neutros predominantemente ésteres de colesterol (EC) e triacilgliceróis (TG) [96], veja Figura 1.1. De maneira mais específica, as partículas de LDL têm diâmetro médio de 22 nm, em que aproximadamente 22% de sua massa total é da ApoB-100, 38% de ésteres de colesterol, 25% de fosfolipídios, 9% de colesterol livres, 7% de triglicerídeos, entre outros. Além disso, a LDL também contém antioxidantes lipofílicos, tais como α -tocoferol (6 moléculas/LDL) e em menos quantidade γ -tocoferol, carotenoides, oxicarotenóides e ubiquinol-10 [95].

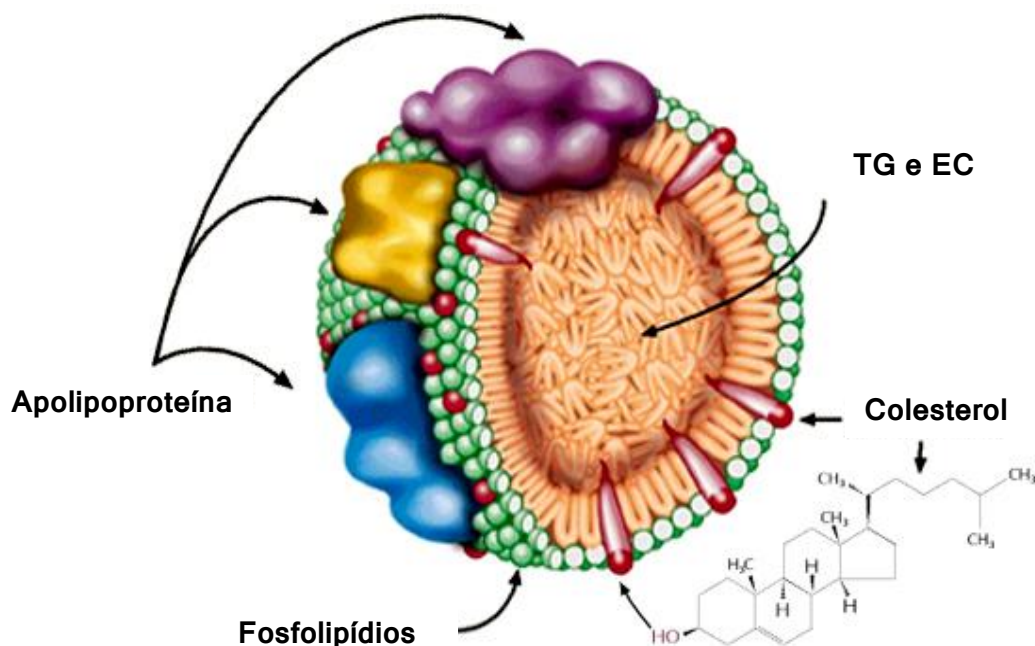


Figura 1.1: Estrutura esquemática tridimensional da LDL, mostrando os domínios lipídicos, compostos principalmente por Triglicerídeos (TG), ésteres de colesterol (EC) e fosfolípidios. A molécula de colesterol também é mostrada, bem como sua possível localização na partícula. É mostrado também um esquema de como é distribuída a Apolipoproteína (ApoB-100) na LDL. Figura adaptada do site <https://www.peprotech.com>.

Segundo resultados obtidos por Kroon, usando sondas fluorescentes, uma partícula de LDL pode ser dividida em duas regiões lipídicas estruturalmente distintas: um núcleo apolar e uma superfície com estados de movimento relativamente independentes [97]. Neste contexto, evidências para esta afirmação têm sido obtidas a partir de experimentos de RMN, os quais mostraram que enquanto o núcleo da LDL muda de um estado líquido para um estado mais ordenado líquido cristalino, os fosfolípidios da superfície permanecem relativamente fluidos [98]. Entretanto, experimentos mais detalhados, nos quais foram usadas sondas distribuídas em várias regiões da LDL, mostraram que o modelo núcleo-superfície é inconsistente, e que um novo ordenamento lipídico em três camadas é mais adequado [93]. Segundo este modelo, Figura 1.2, a LDL envolve a divisão da região superficial em uma camada externa consistindo principalmente de fosfolípidios, e uma camada interfacial consistindo de lipídios contatando tanto a superfície quanto o núcleo. Deste modo, as moléculas do núcleo único da LDL, o qual é composto principalmente de moléculas de EC e pequenas quantidades de TG e colesterol não-esterificado (CNE), não estão em contato direto com a superfície externa. Além disso, acredita-se que a ApoB-100, a qual

é de fundamental importância para manter a integridade estrutural da LDL e controlar suas interações, seja capaz de contatar cada uma das três regiões. Sendo assim, é plausível considerar que modificações relacionadas aos lipídios da LDL podem afetar a estrutura da ApoB-100, e vice-versa.

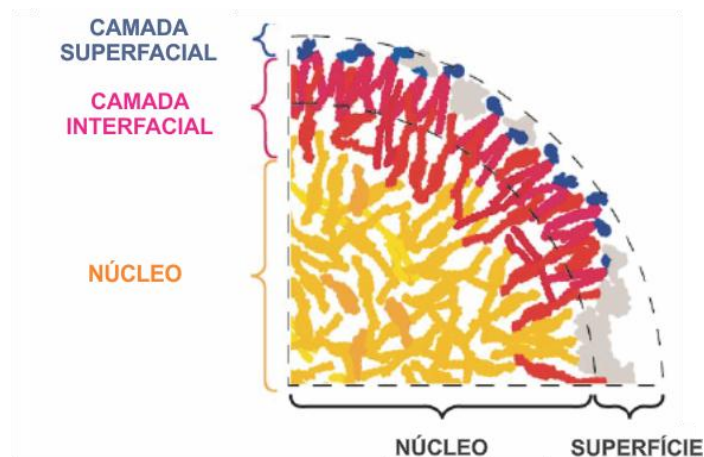


Figura 1.2: Divisão de uma partícula de LDL estruturada em três camadas lipídicas: uma camada externa superficial, uma camada interfacial, e o núcleo. Fragmento da ApoB-100 é descrito em cinza, fosfolípidios com grupos polares em azul, ácidos graxos e colesterol em vermelho (camada interfacial) ou em amarelo/laranja (núcleo). Figura adaptada da referência [93].

1.2 Consequências da Oxidação da LDL

Como mencionado anteriormente, a LDL em sua forma nativa tem grande importância para o organismo humano, isto porque ela é uma das principais transportadoras de colesterol no sangue, molécula esta que é extremamente importante para estabilidade das membranas celulares. Por outro lado, em sua forma oxidada, a LDL perde sua principal função e se torna altamente nociva. Deste modo, é de fundamental importância conhecer os meios pelos quais a LDL sofre modificação. Hoje é sabido que a LDL em sua forma oxidada (oxLDL) é a principal responsável pelo início do processo aterosclerótico. Isto ocorre porque a oxLDL não é reconhecida pelos receptores das membranas celulares, não podendo ser internalizada pela célula para liberação do colesterol e assim acabam migrando para a parede das artérias onde se acumulam [99]. A modificação de LDL em oxLDL, *in vivo*, deve-se a espécies reativas

de oxigênio (EROs), isto é, moléculas resultante da oxidação ou redução do oxigênio molecular, produzidas por células ativadas.

Como os lipídios insaturados das lipoproteínas são altamente sensíveis à oxidação, acredita-se que os ácidos graxos poli-insaturados são os primeiros alvos das EROs, o que pode acarretar em uma reação em cadeia, (Figura 1.3). Durante o estágio inicial de oxidação da LDL, as modificações oxidativas dos lipídios podem ocorrer na ausência ou na presença de pequenas modificações na ApoB-100. Neste caso a LDL é chamada de minimamente oxidada, a qual retém a afinidade pelo receptor de LDL, tem uma pequena carga negativa, ativa o mecanismo de sinalização anti-apoptótica, e induz alterações inflamatórias em sua vizinhança [100].

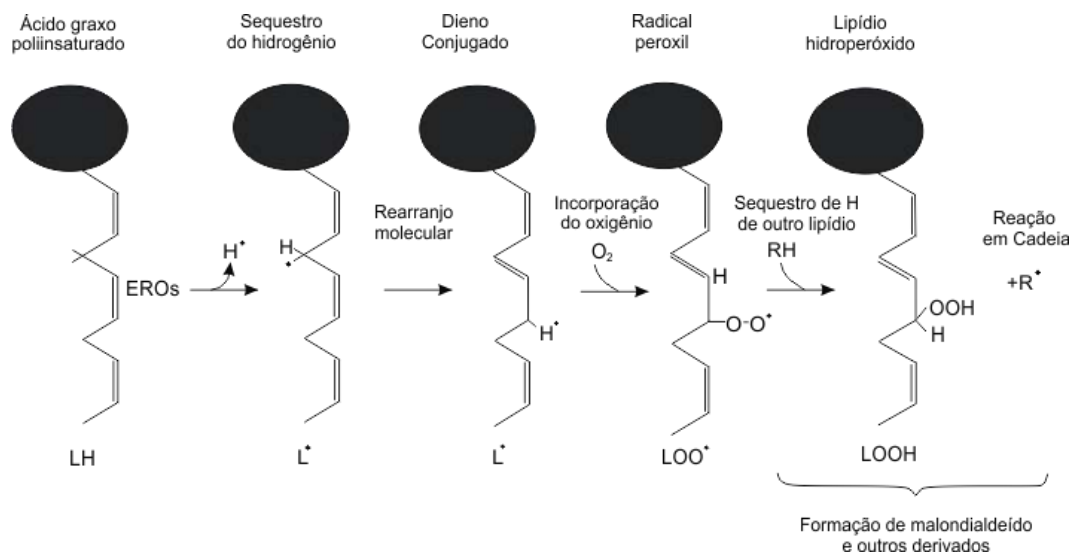


Figura 1.3: Estresse oxidativo e peroxidação lipídica. Na presença de EROs, a peroxidação lipídica é iniciada pelo sequestro de H• de um ácido graxo poliinsaturado, resultando em um lipídio radical que, em seguida, sofre um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Por sua vez, esta configuração reage com o oxigênio molecular para formar um radical peróxido (LOO•), o qual pode então capturar um H• de outro lipídio para formar um lipídio hidroperoxido (LOOH), resultando em uma reação em cadeia de peroxidação lipídica. Figura adaptada da referência [101].

A LDL minimamente oxidada pode se tornar aterogênica através de vários mecanismos, que estão esquematizados na Figura 1.4. Oxidação pode provocar uma atividade quimiotática induzindo a adesão de monócitos à monocamada endotelial e, em seguida, a migração para o espaço subendotelial, íntima. Na íntima, os monócitos são transformados em macrófagos que englobam a LDL altamente oxidada (oxLDL) via 'receptores scavengers' situados em sua superfície [100]. A LDL nativa não é

reconhecida por esses receptores e por isso não participam do processo aterosclerótico. Altas concentrações de oxLDL culminam na formação de células espumosas, isto é, macrófagos carregados de lipídios tóxicos, correspondendo a primeira fase do processo aterosclerótico. Para complementar, a LDL oxidada estimula as células das paredes dos vasos sanguíneos a produzir citocinas e fatores de crescimento. Este processo resulta, entre outras coisas, na proliferação de células musculares lisas e produção de proteínas fibrosas, o que corresponde ao próximo estágio do processo aterosclerótico, isto é, a formação de placas fibrosas na parede dos vasos. Essas citocinas produzidas pelos macrófagos e células T induzem apoptose nas células musculares lisas [102].

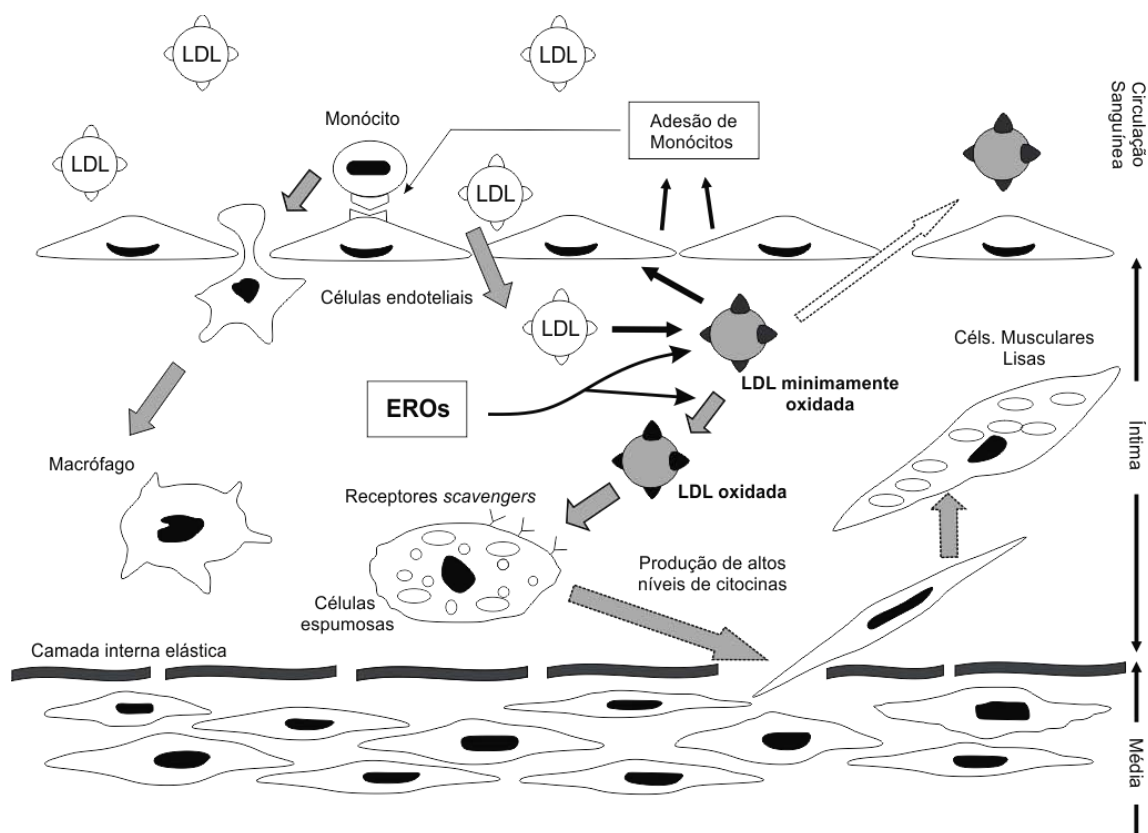


Figura 1.4: Mecanismos de oxidação da LDL e formação de células espumosas na parede da artéria. LDL entra na parede arterial através de endocitose nas células endoteliais. Estas LDLs podem sofrer oxidação, na ausência ou presença de íons metálicos (ferro ou cobre). Os receptores de macrófagos capturam as LDLs e a transformam em células espumosas. Estas células, em seguida, geram citocinas pró-inflamatórias e matrizes de metaloproteínas. Este mecanismo leva a um processo inflamatório e a aterogênese. Figura adaptada da referência [100].

As células espumosas, juntamente com linfócitos T e com as células musculares, se agrupam logo abaixo da camada íntima da parede das artérias formando estrias gordurosas e, conseqüentemente, levando à formação de placas – placas de ateroma – que gradualmente estreitam o lúmen vascular e dificultam o fluxo sanguíneo,

resultando na aterosclerose. Acredita-se que a oxidação de LDL não ocorra na circulação sanguínea, mas sim na parede arterial, pois, no soro, os lipídios das LDLs são bem protegidos contra oxidação por mecanismos de defesas antioxidantes inerentes ao organismo humano [99].

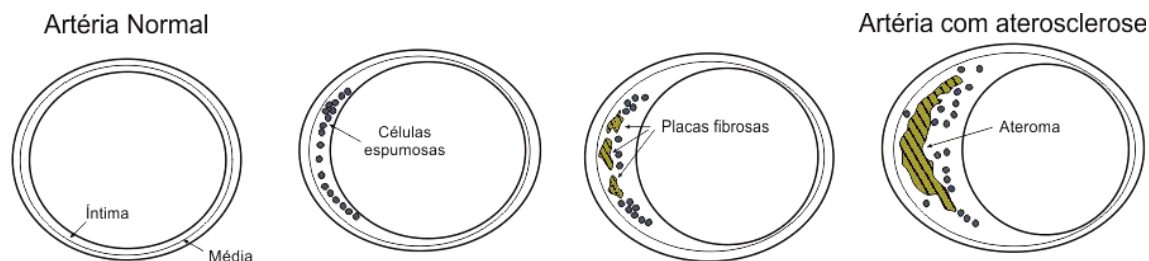
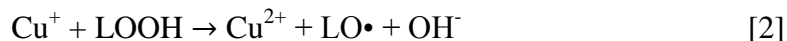
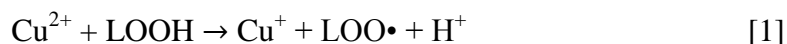


Figura 1.5: Visão frontal de uma artéria, mostrando a evolução do processo aterosclerótico.

1.2.1 Mecanismos de Oxidação da LDL

Embora as suposições feitas sobre os eventos químicos responsáveis pelo início da oxidação da LDL *in vivo* ainda sejam um tanto quanto alusivos, a oxidação da LDL *in vitro* tem sido extensivamente estudada usando uma variedade de agentes iniciadores, incluindo íons metálicos [103, 104]. Tem sido mostrado que na parede das artérias ateroscleróticas a concentração de cobre é grande, quando comparada a parede de artérias sadias [105]. Além disso, foi detectado em lesões ateroscleróticas ‘maduras’ que há uma grande concentração de cobre que contribui para a oxidação dos lipídios [106]. Neste contexto, a oxidação da LDL mediada por cobre serve como um apropriado modelo *in vitro*, uma vez que produz uma LDL oxidada com propriedades funcionais e estruturais similares as da oxLDL extraída das artérias [107, 108].

O primeiro estágio de oxidação da LDL mediada por íons de cobre se dá com uma fase de latência (*lag phase*), durante o qual os antioxidantes endógenos são consumidos pelos radicais livres produzidos. Os íons de Cu(II), por sua vez, reagem com os lipídios hidroperóxido (LOOH), veja reações [1] e [2], dando início a uma reação em cadeia, no qual os radicais peroxila (LOO•) e alcoxila (LO•) gerados desencadeiam a peroxidação lipídica, que pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação [109].



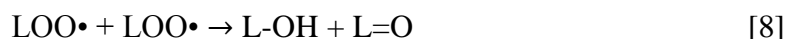
No estágio de iniciação os ácidos graxos poli-insaturados (LH) são rapidamente oxidados através do sequestro do átomo de hidrogênio (reações [3] e [4]).



Na fase de propagação (reações [5] e [6]), o radical lipídico (L•) reage com o oxigênio molecular formando novamente um radical peroxila, que por sua vez, sequestra um hidrogênio de outro lipídio, dando origem a um lipídio hidroperóxido e a um novo lipídio radical.



Por fim, na fase de terminação (reações [7] e [8]) os radicais lipídicos (LOO• e L•) se combinam e formam um lipídio não radical [110].



A peroxidação lipídica altera o ordenamento lipídico e a polaridade dos lipídios na LDL, o que conseqüentemente produz uma variedade de mudanças nas propriedades físicas da partícula, tais como: alteração no volume molecular, na microviscosidade e na fluidez lipídica. Diversas metodologias têm sido usadas para monitorar os processos de oxidação, a maioria delas baseia-se na análise direta da

produção de radicais livres ou da produção de produtos provenientes da peroxidação lipídica. Um método de fácil utilização, que fornece informações sobre a extensão da lipoperoxidação, *in vitro*, que tem sido amplamente utilizada é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA ($C_3H_4O_2$, P.M. = 72,07) é um produto secundário formado durante a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Em condições apropriadas de incubação (meio ácido e altas temperaturas), o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido (Figura 1.6) com alta absorvidade molar no visível (532-535 nm), podendo ser quantificado por espectrofotometria [111].

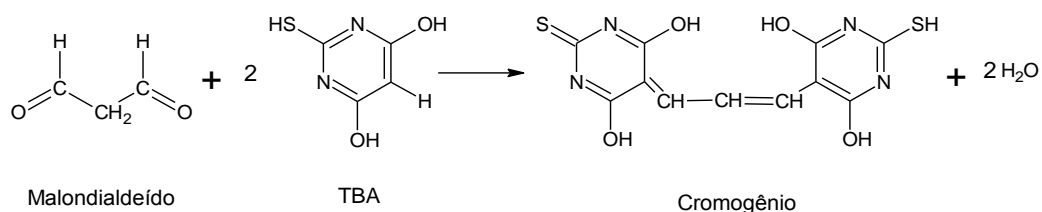


Figura 1.6: Teste de TBA. Reação do entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malondialdeído, formando o composto colorido (cromogênio), medido espectrofotometricamente a 532 nm.

Apesar de ser altamente usada, a avaliação do MDA pela reação com o TBA não é específica, pois muitas outras substâncias presentes em sistemas biológicos também podem reagir com o TBA. Além disso, outros aldeídos também podem reagir com TBA formando compostos similares ao do complexo MDA:TBA, os quais também absorvem em 532 nm. Por este motivo, muitas das vezes o teste do MDA é usado apenas como comparativo para outras metodologias mais específicas, tais como a espectroscopia de RPE. Neste contexto, a espectroscopia de RPE de marcadores de spin tem sido usada para avaliar as alterações na dinâmica molecular de membranas celulares devido à oxidação lipídica e proteica. Como exemplo, Nepomuceno e colaboradores, usando marcadores de spin, observaram um aumento no ordenamento lipídico associado a uma diminuição da fluidez de lipídios de membranas quando estas foram submetidas a estresse oxidativo. Este resultado foi associado aos danos provocados pela oxidação aos componentes das membranas [112]. Embora esta metodologia tenha sido pouco explorada ao longo dos anos no que se refere ao estudo das lipoproteínas, ela é

altamente vantajosa, no sentido em que ela permite ao pesquisador avaliar, de maneira específica, as alterações em diferentes domínios destas partículas.

1.3 Antioxidantes

Compostos antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Estes antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos [113]. Os enzimáticos, tais como a glutaciona peroxidase, catalase e superóxido dismutase, são enzimas que metabolizam o radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o lipídio hidroperóxido, respectivamente. Já os antioxidantes não-enzimáticos podem ter origem endógena (sintetizados pelo organismo) ou exógena (obtido de fonte externa). A maioria dos antioxidantes não-enzimáticos tais como o α -tocoferol (vitamina-E), ácido ascórbico (vitamina-C), β -caroteno e flavonóide, pode ser obtida através da alimentação [114, 113]. Além disso, conforme o mecanismo de ação sobre os radicais livres, os antioxidantes podem ainda ser classificados como primário ou secundário. Os antioxidantes primários (também conhecidos como *scavengers*) são compostos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, convertendo-os em produtos estáveis, reações [9] e [10]. Entre os antioxidantes desta classe estão os compostos o butil-hidroxi-tolueno (BHT), os tocoferóis e os polifenóis [115]. Já os antioxidantes secundários atuam por diferentes mecanismos, que incluem efeito quelantes (complexação com metais, principalmente cobre e ferro), sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radicalares, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Compostos como os agentes quelantes ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) e fosfato, o ácido ascórbico, sulfetos e os carotenoides são exemplos de antioxidantes secundários [115].



Atualmente existe uma grande variedade de excelentes antioxidantes frequentemente utilizados, principalmente, na preservação de alimentos. A grande maioria destes compostos é de origem sintética, tais como o BHT (Figura 1.7), galato de propila e o butil-hidroxi-anisol (BHA). Entretanto, o uso destes antioxidantes tem sido relacionado a vários riscos para saúde, devido a sua toxicidade e propriedades carcinogênicas [116]. Em geral, devido à baixa toxicidade, os antioxidantes naturais levam vantagens sobre os sintéticos, além de poderem ser encontrados em plantas e vegetais. Por este motivo, há uma busca crescente por antioxidantes naturais como forma de substituir os antioxidantes sintéticos. Entre os antioxidantes naturais destacam-se os polifenóis, isto é, compostos de baixo peso molecular, formados por hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, os quais são divididos em flavonoides e não-flavonoides, e dos quais fazem parte o resveratrol, a catequina e a quercetina.

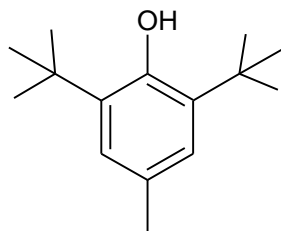


Figura 1.7: Estrutura molecular butil-hidroxi-tolueno (BHT).

1.3.1 Flavonóides

Flavonóides são um grande grupo de antioxidantes encontrados em muitas frutas, verduras e bebidas, como chá verde e vinho. Sua estrutura química básica consiste de dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma cadeia de três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel C), Figura 1.8(a). Mais de 4000 flavonóides foram identificados e são divididos em vários grupos de acordo com sua estrutura química [117, 118], Figura 1.8. Segundo Silva e co-autores [119], ação antioxidante dos flavonoides depende basicamente de sua estrutura química. A presença do grupo orto-catecol no anel B, o qual facilmente doa um hidrogênio para estabilizar uma espécie radical, e a presença da ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 e o grupo

hidroxila no anel C são determinantes para uma capacidade antioxidante efetiva. Além disso, a presença de grupos funcionais capazes de ligar íons de metais de transição também contribui para a capacidade antioxidante desta classe de moléculas [117]. Dentre os flavonóides mais estudados estão a catequina e a quercetina, polifenóis da família dos flavonóis, que estão presentes no chá e vinho tinto, aos quais tem sido atribuída uma relevante atividade antioxidante em nível biológico [117, 118].

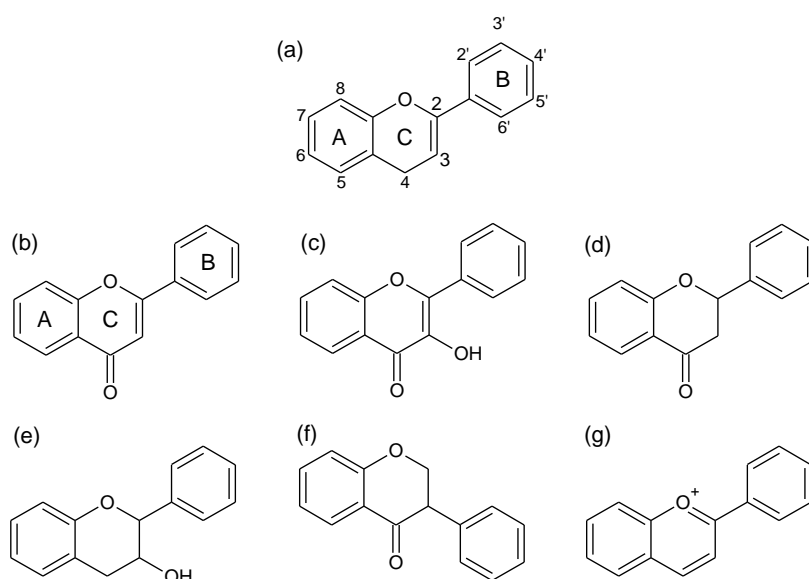


Figura 1.8: Estrutura química básica dos flavonoides (a) e suas subclasses: (b) flavona; (c) flavonol; (d) flavonona; (e) flavonol; (f) isoflavona; (g) antocianidina [118].

- **Catequina**

As catequinas, assim como todos os flavonóides, são constituídas por um anel floroglucinol (A), um anel pirânico (C) e um anel catecol (B) (Figura 1.8a). Os carbonos 2 e 3 desta unidade são assimétricos constituindo centros quirais, dos quais resultam quatro isómeros: (+), (-)-catequina e (+), (-)-epicatequina. Tem sido mostrado que as catequinas podem capturar o superóxido e os radicais hidroxila, bem como o radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), radical peroxila, óxido nítrico, oxigênio singleto e lipídios radicais [120, 121]. Além disso, a capacidade das catequinas como agentes quelantes de íons Cu (II) e Fe (III) também tem sido verificada [122]. Estudos sugerem que as catequinas possuem ação anticancerígena, anti-inflamatória e anti-

ploriferação de células cancerígenas independentemente das suas propriedades de eliminação de radicais livres [123]. O potencial terapêutico das catequinas, consignado com sua produção de baixo custo, faz com que esse composto seja um dos polifenóis mais usados na dieta para prevenção de doenças como câncer, doenças vasculares e obesidade. Entretanto, a eficiência individual de cada catequina para prática clínica e seus mecanismos de ação antioxidante ainda não está completamente esclarecida [123].

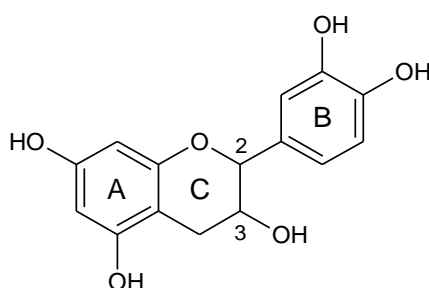


Figura 1.9: Estrutura molecular da (+)-catequina, antioxidante usado neste trabalho.

- **Quercetina**

Outro flavonóide muito utilizado no combate as EROs é a quercetina (Figura 1.10), um composto natural comumente encontrado no chá verde, frutas, verduras, legumes e vinhos. Devido a seu efeito antioxidante, anti-inflamatório e vasodilatador, a quercetina ainda é tida como um agente anticâncer em potencial [124]. Recentemente, a quercetina tem sido comercializada, principalmente, como um suplemento dietético. Assim como a maioria dos flavonóis, a quercetina também pode atuar como agente quelante, formando complexos com íons metálicos e afetando sua reatividade e toxicidade.

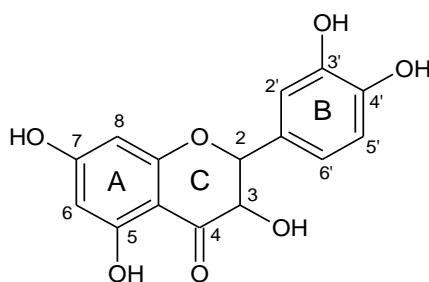


Figura 1.10: Estrutura molecular da quercetina.

Tem sido relatado que a quercetina, a qual é caracterizada por um padrão de hidroxilações de 3, 5, 7, 3' e 4' e um anel catecol-B, possui todos os elementos estruturais característicos de um bom antioxidante [119]; no entanto, exercendo a sua atividade antioxidante, devido a sua estrutura química e seu mecanismo de ação, estudos sugerem que a quercetina pode, sob certas condições, apresentar também efeitos pró-oxidantes [125].

1.3.2 Resveratrol

Além dos flavonóides, existem outras famílias de compostos polifenólicos importantes com potencial terapêutico tais como os estilbenos. A família dos estilbenos, da qual faz parte o resveratrol, tem revelado uma importante ação inibitória face à oxidação lipídica. O resveratrol é uma fitoalexina produzido por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucalipto, amendoim, amora e também está presente em grandes quantidades em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) e no vinho tinto. Na uva o resveratrol é sintetizado na casca como resposta ao stress causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta [126]. O resveratrol é sintetizado naturalmente na planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), Figura 1.11.

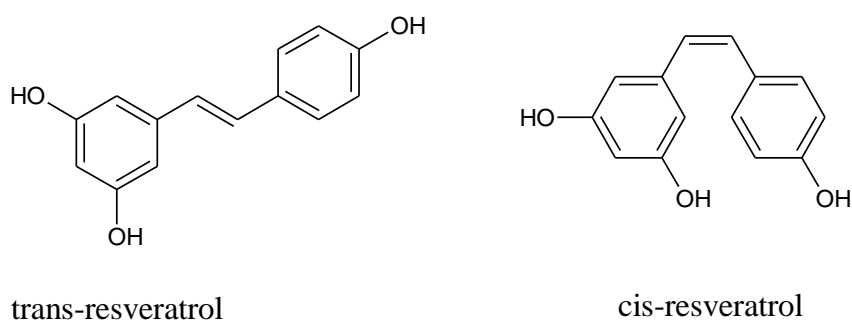


Figura 1.11: Estrutura molecular dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.

Estudos mostram que o resveratrol além de possuir uma intensa atividade antioxidante, também possui capacidade antienvhecimento, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e propriedades cardioprotetoras associadas à sua eficiência em

combater os radicais livres [127, 128]. Devido a seus benefícios para a saúde, o resveratrol é comercializado, atualmente, como suplemento alimentar e é comumente vendido em pílulas, que contém extrato de semente de uva, extrato de Kojo-kon e extrato de vinho tinto.

A redução da incidência de doenças cardiovasculares promovida pelo resveratrol parece estar associada a sua capacidade de proteger a LDL contra a oxidação por radicais livres ou íons metálicos. Dados mostram que sua atividade difere da atividade de outros polifenóis naturais, como a quercetina e a catequina, devido a sua melhor capacidade de se ligar ao cobre [129, 130]. Entretanto, estes resultados não passam de hipóteses e ainda carecem de estudos que contribuam para elucidar seus mecanismos antioxidantes.

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais:

Aplicar a espectroscopia de RPE de marcadores de spin para estudar as mudanças na dinâmica molecular envolvidas na oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), isolada de sangue humano, e avaliar o potencial antioxidante de três polifenóis naturais com potencial farmacêutico. Visando obter informações científicas que contribuam para esclarecer quais são os processos que induzem a oxidação das lipoproteínas *in vivo*, bem como contribuir para a caracterização de compostos que visam diminuir os riscos de doenças cardiovasculares, tais como a aterosclerose.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar as propriedades dinâmicas dos lipídios da LDL usando o marcador de spin derivado do ácido esteárico 5-DSA e as mudanças promovidas na LDL quando as partículas são submetidas a estresses oxidativos por íons de cobre;
- b) Avaliar a peroxidação da LDL pelo método de formação de MDA, o qual fornece uma medida indireta da peroxidação lipídica;
- c) Avaliar a partir dos espectros do 5-DSA incorporado na LDL e pelo método de formação de MDA o potencial antioxidante dos polifenóis resveratrol, quercetina e (+)-catequina;
- d) Avaliar o comportamento dos lipídios da LDL submetida a diferentes temperaturas.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Para obtenção da LDL utilizamos bolsas de sangue obtidas do banco de sangue do Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) e do Hemolabor. Todas as bolsas de sangue foram armazenadas por no máximo 7 dias sob refrigeração para realização dos experimentos. Para determinarmos a concentração de proteínas nas amostras, utilizamos um kit de Lowry modificado (Pierce – Thermo Scientific). Os sais usados na preparação do tampão foram adquiridos da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI). O brometo de potássio (KBr) foi adquirido da Sigma Chem. Co. (USA), bem como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e o sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os antioxidantes, BHT, quercetina, catequina e resveratrol, e também os reagentes usados nos testes de MDA foram obtidos da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI). Todos os antioxidantes foram utilizados sem passar por qualquer processo de purificação. Para as medidas de RPE foi utilizado o marcador de spin derivado do ácido esteárico, 5-doxil estearato (5-DSA), Figura 3.1, o qual foi adquirido da Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, WI).

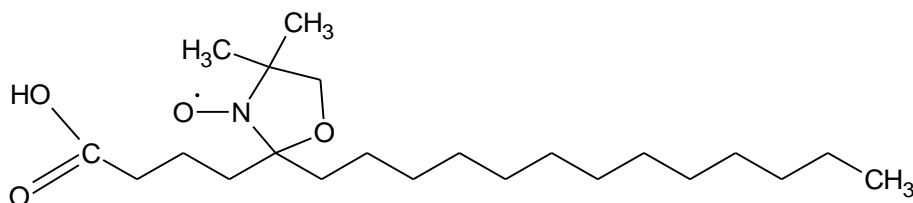


Figura 3.1: Estrutura molecular do marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA).

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento da LDL

O sangue obtido de banco de sangue foi distribuído em tubos e centrifugado a 150xg a 4°C por 10 minutos para separar o plasma das hemácias. Após a centrifugação, ao plasma (sobrenadante) foram adicionados 5 μL de um coquetel

antioxidante, isto é, solução contendo 2 µg/mL de aprotinina, 400 mM de benzamidina, 200 mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*) e 4 mM de BHT, para cada mL de plasma. A adição do coquetel é necessária tanto para inibir a oxidação da lipoproteína como para inibir a ação de possíveis proteases presentes no plasma. Em seguida o plasma foi submetido a sequências de ultracentrifugações a 200.000xg à temperatura de 4°C em uma ultracentrífuga Sorvall®, modelo Discovery M150, com um rotor S100AT4, para o isolamento da LDL.

Foram realizadas duas ultracentrifugações de 7 horas cada: na primeira o objetivo foi separar a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, sigla do inglês *Very Low Density Lipoprotein*) do plasma, para isso foi adicionado ao plasma uma solução salina de densidade igual a 1,019 numa relação de 2:1. Após este processo, a VLDL formou um halo branco na superfície da solução e pode ser retirada cuidadosamente com uma pipeta Pasteur. O restante do plasma foi então transferido para um recipiente e uma segunda centrifugação foi realizada. Nessa segunda centrifugação o objetivo foi de separar a LDL total do restante do plasma, para isso a densidade da solução foi medida em balança de precisão e corrigida com brometo de potássio (KBr) para que o plasma chegasse à densidade da LDL, isto é 1,063. Corrigida a densidade, o plasma foi novamente distribuído em tubos e levados para a última ultracentrifugação. Após esta etapa, a LDL formou um halo alaranjado e translúcido na superfície da solução, sendo que toda a LDL foi então retirada com pipeta Pasteur e transferida para um recipiente adequado e ao abrigo da luz. Todo processo de isolamento foi cuidadosamente realizado em ambiente refrigerado. A LDL isolada foi quantificada e armazenada em geladeira até o uso.

3.2.2 Oxidação da LDL por Íons de Cobre

Para obter partículas de LDL oxidadas por íons de cobre, a LDL foi inicialmente dialisada a 4°C por 4 h contra tampão PBS rico em argônio/nitrogênio e sem EDTA. Em seguida a LDL (6.9 mg/ml em PBS 7,4) foi incubada por 3 h a 37°C com sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em concentrações de 0-800 µM. Durante a incubação as amostras permaneceram em contato com o oxigênio do ambiente e foram cuidadosamente agitadas a cada 30 minutos. O processo de oxidação foi interrompido, imediatamente após o período de oxidação, pela adição de 0,5 mM de

EDTA. Para avaliar o efeito antioxidante, os polifenóis resveratrol, quercetina e catequina foram dissolvidos em etanol e distribuídos no fundo de tubos nas concentrações desejadas. Um filme fino dessas moléculas foi formado no fundo dos tubos após a evaporação do etanol com gás de nitrogênio. Em seguida alíquotas de 40 µl de LDL e 10 µl de água destilada (mili-Q) foram adicionadas aos tubos, sobre os filmes de antioxidantes, e estes incubados por 30 min a 37°C. Ao final do processo a concentração final de LDL foi de 5.5 mg/ml. O antioxidante BHT foi usado como padrão para referência.

3.2.3 *Determinação da formação de Malondialdeído (MDA)*

A formação de MDA, avaliada pelo ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), foi usada como índice da peroxidação lipídica da LDL e medida de acordo com [131]. Após a oxidação da LDL, 20 µl de amostra foram misturadas a 37°C com reagente TBARS (980 µl, 15% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA); 0,375% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 0,25 N de HCl) e agitada. A solução foi então aquecida em banho maria a 95°C por 15 min e, imediatamente após o aquecimento, foi refrigerada. O precipitado foi removido por centrifugação (1000 x g, 10 min) e o MDA do sobrenadante foi determinado espectrofotometricamente a 532 nm usando um coeficiente de extinção molar igual a $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e comparado com o MDA padrão. As concentrações de MDA foram obtidas por meio da equação de Beer-Lambert [110]:

$$A = c\epsilon l \quad (3.1)$$

onde A é a medida da absorbância, c é a concentração de MDA em unidade molar, l é o caminho ótico em centímetros e ϵ é o coeficiente de extinção molar.

3.2.4 *Marcação dos lipídios da LDL*

Uma quantidade adequada (cerca de 2 µl) de marcadores de spin 5-DSA (5 mg/mL em etanol) foi adicionada em tubos e o etanol evaporado com fluxo de nitrogênio gasoso. Cerca de 40 µl de LDL oxidada, exceto a amostra controle, foram

colocados sobre o filme seco de marcadores de spin por 15 min e agitados moderadamente. A razão molar de marcadores de spin para lipídios da LDL foi de 1:100 ou menos. Feito isso, as amostras já marcadas foram transferidas para tubos capilares, os quais foram selados e levados ao espectrômetro de RPE.

3.2.5 Medidas de RPE

A obtenção dos espectros de RPE foi feita no laboratório de Ressonância Magnética do Instituto de Física da UFG. Utilizamos em nossos experimentos um espectrômetro Bruker ESP 300 equipado com um ressonador ER 4102 ST operando em banda-X (9,4 GHz). Os parâmetros espectrais foram: potência de micro-onda, 20 mW; frequência de modulação, 100 KHz, amplitude de modulação, 1,024 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e tempo de detecção, 41 ms. A temperatura foi controlada, com precisão de $\pm 0,3^\circ\text{C}$, por um sistema de fluxo de nitrogênio (Bruker, Rheinstetten, Alemanha). Além de medidas diretas das formas de linha dos espectros, foram realizadas análises espectrais por meio das simulações dos espectros de RPE utilizando o programa *nonlinear least-squares* (NLLS). Este programa permite simular um único espectro com mais de uma componente tendo diferentes estados de movimento e diferentes parâmetros de tensores magnéticos. Os parâmetros considerados para o radical nitróxido estão intimamente relacionados com a dinâmica do marcador de spin no meio em que esse se encontra. Analogamente ao trabalho anterior (Parte I), os parâmetros magnéticos foram determinados com base em uma análise geral de todos os espectros obtidos neste trabalho, uma vez determinados, os espectros de RPE foram simulados usando os mesmos valores de entrada para os tensores magnéticos $\vec{g}(t)$ e $\vec{A}(t)$.

4 Resultados

4.1 Espectros de RPE de LDL marcada com 5-DSA e Oxidada por Íons de Cobre

O espectro de RPE, a 25°C, do marcador de spin 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL é mostrado na Figura 4.1A. O parâmetro experimental $2A_{//}$, o qual é medido diretamente no espectro também é mostrado. Como comentado na primeira parte desta tese, este parâmetro é altamente sensível à mobilidade do nitróxido, e por isso tem sido amplamente usado para monitorar a fluidez do ambiente no qual o marcador de spin se encontra, de modo que quanto maior o valor do $2A_{//}$ mais rígido o sistema se encontra. Aparentemente, o espectro do 5-DSA na LDL possui uma única componente, indicando que há apenas uma população de marcadores de spin na partícula com grau de mobilidade bem definido. Além disso, os espectros obtidos neste trabalho têm características similares aos dos espectros de 5-DSA inserido em membranas de *ghosts* de hemácias (Figura 4.1B), inclusive com mesmo grau de mobilidade, tal qual sugere os valores do parâmetro $2A_{//}$ (~56,5 G) para estes dois sistemas.

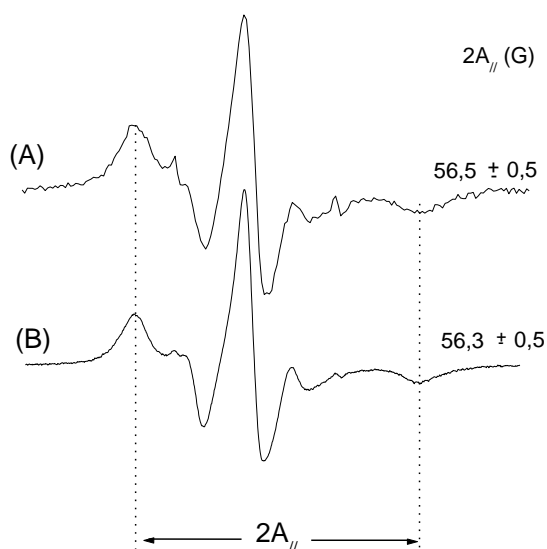


Figura 4.1: Espectros RPE de 5-DSA em LDL a 5,5 mg/ml (A) e em membranas de *ghosts* de hemácias (B). O parâmetro de RPE $2A_{//}$, o desdobramento hiperfino máximo, é a separação em unidades de campo magnético entre a primeira linha e a última linha de ressonância do espectro, também está indicado. Esse parâmetro foi praticamente o mesmo para o 5-DSA inserido tanto na LDL quanto nas membranas de *ghost*. Ambos os espectros foram obtidos à temperatura ambiente (~25°C) e o intervalo de varredura do campo magnético total do espectro foi 100 G.

As modificações oxidativas promovidas por íons de cobre causam a peroxidação lipídica da LDL, alterando o ordenamento e a polaridade dos lipídios da partícula, de modo que estas modificações são refletidas nas formas de linha dos espectros do marcador 5-DSA na LDL. Na Figura 4.2 é mostrado uma série de espectros de LDL (5,5 mg/ml) a 37°C, tratada com diferentes concentrações de CuSO_4 por um período de 3 horas. Como podemos notar, o aumento da concentração de cobre resulta em um aumento da rigidez relativa dos lipídios da LDL, tal como reportado pelo acréscimo de até 3 G no parâmetro $2A_{//}$.

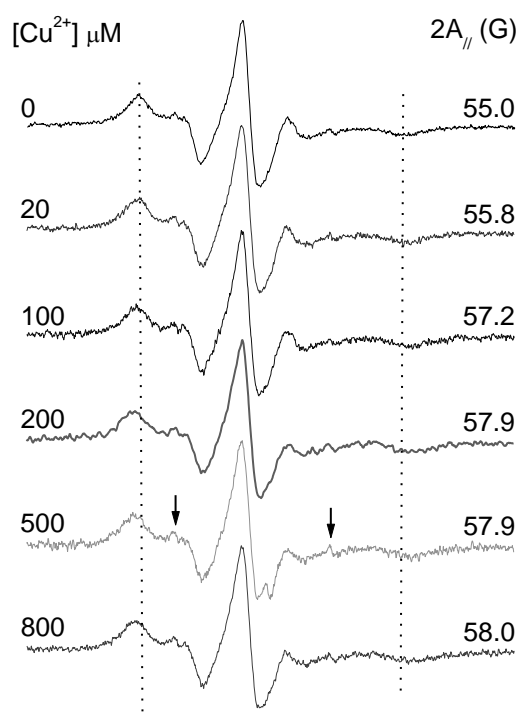


Figura 4.2: Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na LDL (5,5 mg/ml) na presença de diferentes concentrações de Cu^{2+} a 37°C. As linhas pontilhadas verticais indicam o parâmetro $2A_{//}$ para a amostra de controle (sem cobre). As setas indicam a presença do sinal referente aos marcadores de spin livres em solução. A escala de varredura de campo magnético foi de 100 G.

Vale a pena mencionar que a presença de pequenos picos (indicados pelas setas) nos espectros de RPE se refere à presença de marcadores de spin livres na solução ou muito fracamente ligados à LDL, ou seja, marcadores que não estão inseridos na partícula. Por outro lado, estes marcadores livres não interferem no comportamento dos demais marcadores de spin. Em geral, alguns sistemas lipídicos após serem oxidados

podem ser degradados e perderem sua estabilidade estrutural, liberando alguns lipídios e, conseqüentemente, elevando o número de marcadores de spin livres em solução. Porém, da Figura 4.2 vemos que não houve aumentos consideráveis nos picos referentes a estes marcadores de spin livres, mesmo em altas concentrações CuSO_4 , indicando que a estrutura lipídica em torno do 5-DSA se mantém estável e nenhuma degradação significativa pode ser notada.

A fim de obter informações mais detalhadas acerca da reação oxidativa entre os íons de cobre e os lipídios da LDL, foi avaliado o tempo necessário para que a peroxidação lipídica atingisse seu valor máximo. Na Figura 4.3 são mostradas três curvas referentes aos valores de $2A_{//}$ para amostras incubadas com diferentes concentrações de CuSO_4 por períodos de 1, 2 e 3 horas. Podemos notar desta figura que para concentrações abaixo de $100 \mu\text{M}$ o aumento na rigidez da LDL independe do tempo de incubação, ao passo que para concentrações superiores o maior efeito ocorre para 3 horas de incubação. Já para tempos maiores que 3 h (dados não mostrados) os valores do $2A_{//}$ tende a se estabilizar, enquanto que, devido a grande concentração de íons de cobre no meio, a intensidade do espectro de RPE é reduzida, o que compromete sua análise. Sendo assim, decidimos por trabalhar com amostras submetidas a 3 h de reação com os íons de cobre, de modo a obter o maior efeito de oxidação e sem comprometer o sinal de RPE.

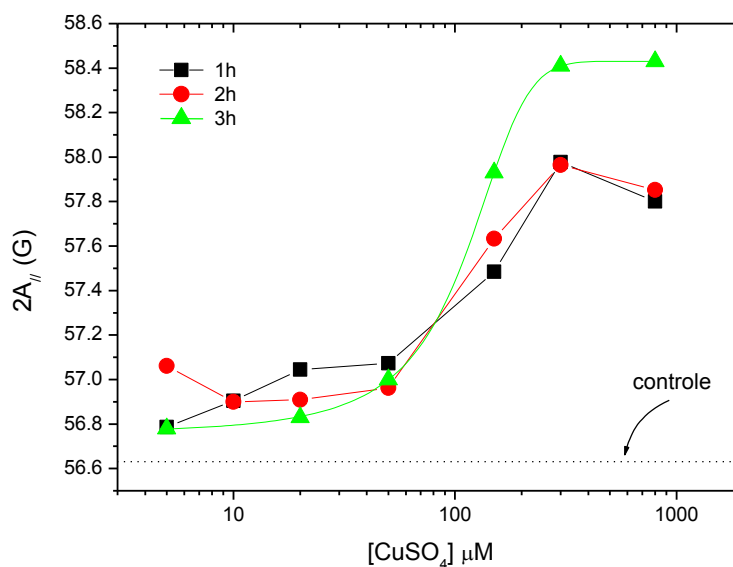


Figura 4.3: Parâmetro espectral $2A_{//}$, de LDL marcada com 5-DSA, em função da concentração de CuSO_4 para três 1, 2 e 3 horas de incubação a 37°C . A linha pontilhada especifica o valor médio do $2A_{//}$ para a amostra controle.

Como metodologia comparativa, a peroxidação dos lipídios da LDL foi acompanhada por espectroscopia de absorção ótica, através do teste de formação do complexo MDA-TBA. Analogamente foi avaliada por RPE a alteração na rigidez da LDL devido ao efeito da peroxidação lipídica. Na Figura 4.4 estão apresentadas as duas curvas que descrevem o aumento na concentração de MDA-TBA (quadrados) e o aumento da rigidez dos lipídios da LDL (círculos) à medida que a concentração de CuSO_4 era aumentada. Como pode ser notado, apesar de se tratar de duas metodologias distintas, ambas as curvas apresentam o mesmo padrão sigmoidal, sugerindo que o empacotamento ocasionado pelo aumento da rigidez dos lipídios da LDL está diretamente relacionado à lipoperoxidação reportada pelo aumento da concentração de MDA. Para baixas concentrações, menores que $80 \mu\text{M}$, não foi possível notar mudanças significativas na mobilidade dos lipídios e tampouco variação da concentração de MDA, ao passo que no intervalo entre $80\text{-}200 \mu\text{M}$ há uma elevação considerável em ambas as curvas. Por outro lado, em concentrações acima de $200 \mu\text{M}$ a oxidação da partícula de LDL parece atingir a saturação do efeito.

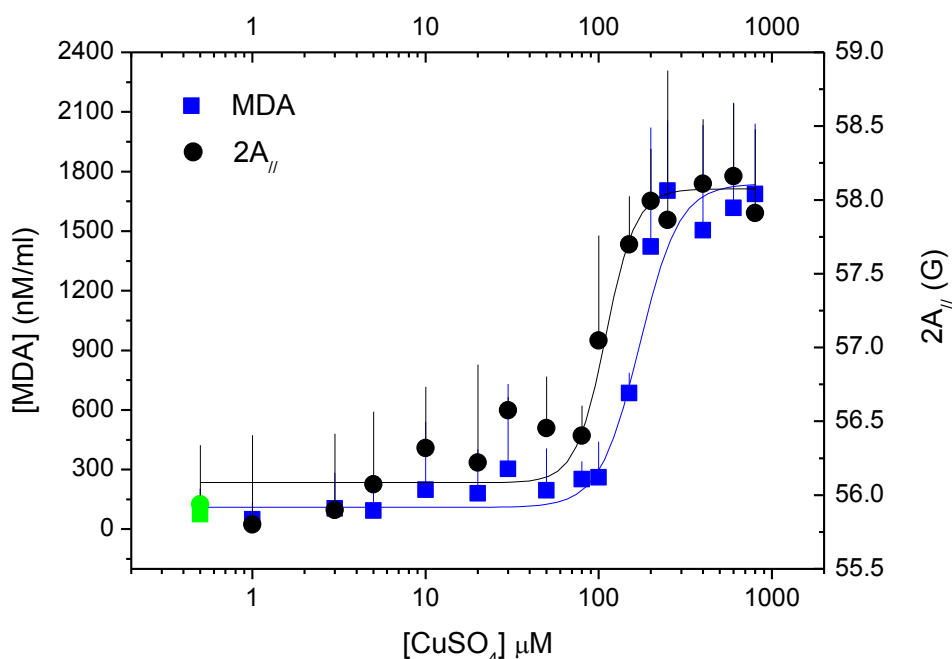


Figura 4.4: Variação da concentração de MDA-TBA (resultante da peroxidação lipídica) e variação do parâmetro espectral $2A_{//}$ (como consequência da peroxidação lipídica) do marcador de spin 5-DSA incorporado na LDL (5,5 mg/mL) em função da concentração do CuSO_4 . Os pontos claros são referentes às amostras controle. A concentração de MDA-TBA foi calculada de acordo com a equação 3.1 para um coeficiente de extinção molar igual a $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em tampão PBS (10 mM, pH 7.4, 154 mM de NaCl) e os resultados plotados com desvio padrão.

Embora o método para detecção da formação de MDA-TBA seja bastante popular e amplamente usado em estudos de oxidação, ele apresenta baixa especificidade e baixa sensibilidade para a detecção deste composto, principalmente devido à alta reatividade do TBA com outros compostos presentes nas amostras biológicas [111]. Esta inespecificidade é particularmente importante em lipídios contendo ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) autoxidados como produtos de decomposição secundária, incluindo complexa mistura de compostos saturados de cadeia curta (alcanos), insaturados (alcenos e alcadienos) e aldeídos monofuncionais [110, 111]. Além disso, alguns aldeídos monofuncionais também são reativos ao TBA, em meio ácido e à temperatura elevada, formando produtos derivados do TBA com um espectro no visível similar ao do complexo MDA-TBA. Por outro lado, o método do marcador de spin associado à técnica de RPE é altamente específico, de modo que as alterações que ocorrem nos espectros de RPE em concentrações baixas do composto oxidante, se devem essencialmente à peroxidação lipídica. Sendo assim, em conjunto com outras metodologias, a RPE se mostra uma técnica alternativa e eficiente para detecção da peroxidação lipídica em LDL.

4.2 Efeito Antioxidante do Resveratrol e dos Flavonóides Quercetina e (+)-Catequina

Na Figura 4.5 é mostrado um conjunto de espectros de RPE de partículas de LDL marcadas com 5-DSA, submetidas à oxidação com 200 μM de CuSO_4 e tratadas com diferentes concentrações de resveratrol, (+)-catequina e quercetina. Nesta figura também são mostrados os espectros teóricos (círculos coloridos) obtidos através da simulação dos espectros experimentais. Observe que os espectros simulados retratam muito bem aos espectros experimentais. Visualmente, podemos notar que a adição de qualquer um dos polifenóis reduziu o parâmetro espectral $2A_{//}$ (indicados pelas linhas tracejadas), o que pode ser mais bem visualizado nos espectros de amostras tratadas com pelo menos 100 μM de antioxidante. Para este mesmo experimento, a variação do parâmetro $2A_{//}$ foi plotada em função da concentração dos antioxidantes (Figura 4.6A). Para critério de comparação, o efeito antioxidante do BHT também foi avaliado. Podemos notar que mesmo em concentrações muito baixas de resveratrol, (+)-catequina e quercetina, há uma redução considerável nos valores do parâmetro $2A_{//}$, passando de

~58,7 para ~57,0 G enquanto que para amostras tratadas com BHT este mesmo efeito somente foi observado para concentrações acima de 150 μM . O efeito isolado dos antioxidantes também foi avaliado para verificar se a diminuição do $2A_{//}$ não era devido à capacidade destas moléculas de aumentar a fluidez dos lipídios da LDL. Como pode ser notado da Figura 4.6A (pontos vazados), a adição de até 200 μM de resveratrol, (+)-catequina e quercetina não causou variações significativas nos valores do $2A_{//}$ quando comparados à amostra controle. Por outro lado o BHT tornou os lipídios da LDL mais fluido, denotado por uma redução de 0,5 G no $2A_{//}$, porém, 0,5 G é o erro experimental na medida e, assim, este efeito pode ser considerado não significativo.

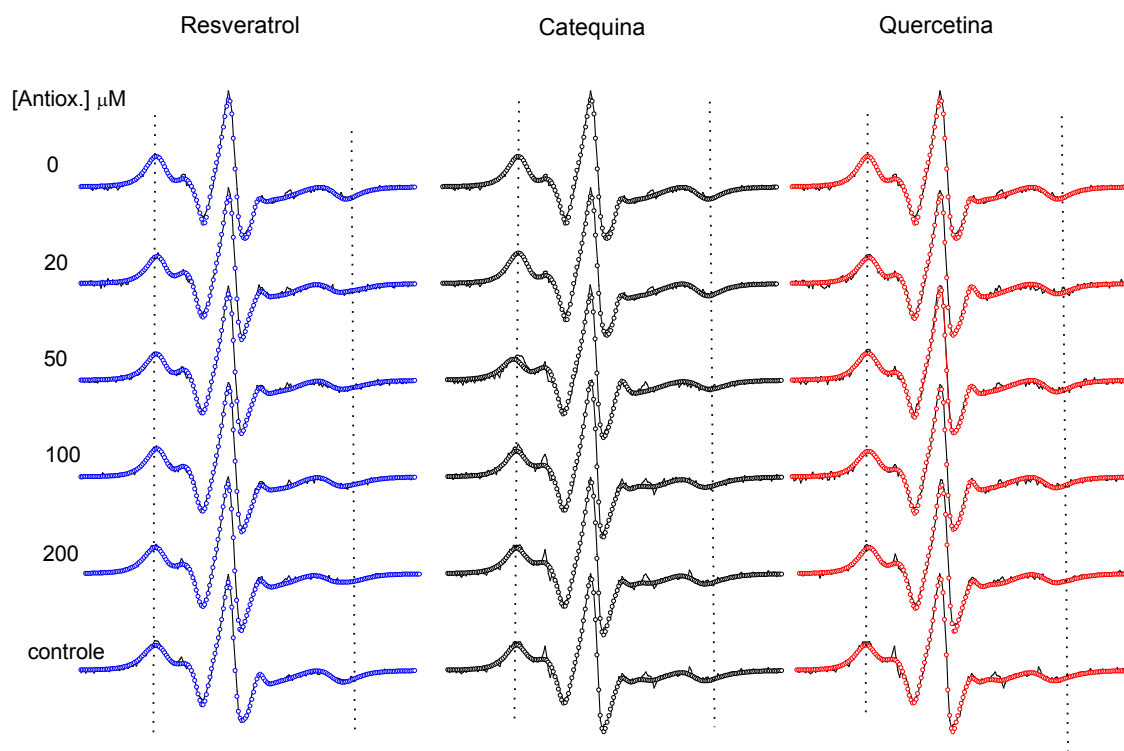


Figura 4.5: Espectros de RPE experimental (linha pretas) e simulado (círculos) a 25°C do marcador de spin 5-DSA inserido na LDL (pH 7,4) oxidada com 200 μM de CuSO_4 e tratada com diferentes concentrações dos antioxidantes Resveratrol, (+)-Catequina e Quercetina. Três espectros de amostras de LDL controle (não oxidada) também são apresentados. As linhas pontilhadas indicam a medida do parâmetro $2A_{//}$ para a amostra sem antioxidante. O campo magnético total foi de 100 G e os espectros simulados foram obtidos através do programa NLLS. A concentração final de LDL foi de 4, 5 mg/ml.

Como mencionado anteriormente, uma das vantagens de se trabalhar com o parâmetro $2A_{//}$ é a de que ele pode ser medido diretamente do sinal de RPE, o que pode

ser feito imediatamente após a aquisição do espectro. Por outro lado, para espectros não muito intensos ou para pequenas variações do $2A_{//}$, essas avaliações ficam comprometidas e, nestes casos, o programa de melhor ajuste NLLS é usado para auxiliar na análise dos espectros de RPE. Neste trabalho, a partir da simulação espectral a dinâmica do marcador de spin 5-DSA na LDL foi avaliada a partir dos valores do tempo de correlação rotacional, τ_c , mostrados na Figura 4,6B.

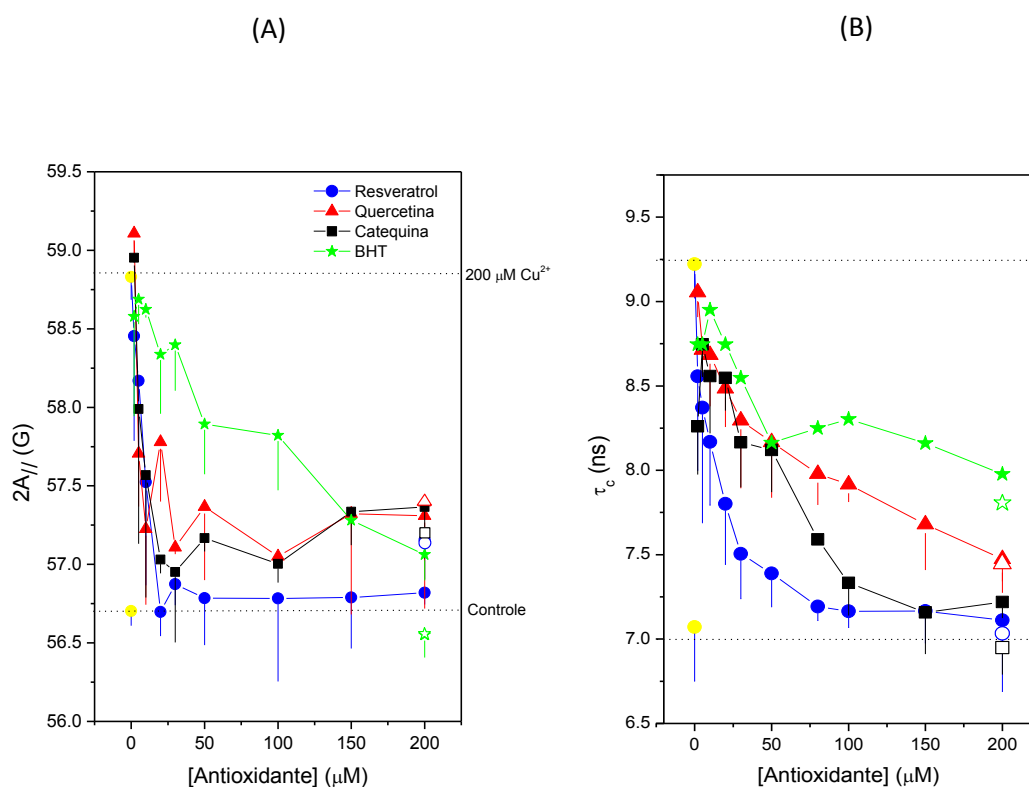


Figura 4.6: (A) Parâmetro espectral $2A_{//}$ e (B) tempo de correlação rotacional, obtido a partir do programa de simulação NLLS, para marcador de spin 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL submetida a oxidação com $200 \mu\text{M}$ de CuSO_4 e em função da concentração de quatro antioxidantes: Resveratrol, Quercetina, (+)-Catequina e BHT. As linhas pontilhadas inferiores e superiores indicam os valores referentes aos controles (não oxidada) e às amostras oxidadas com $200 \mu\text{M}$ de CuSO_4 e sem oxidante, respectivamente. Os pontos vazados se referem aos controles positivos, isto é, amostras não oxidadas e com $200 \mu\text{M}$ de antioxidante. Todos os experimentos, com exceção do teste com BHT, foram realizados em triplicata e os desvios estão indicados pelas barras verticais em cada ponto.

Vemos da Figura 4.6B que para concentrações superiores a $20 \mu\text{M}$ o resveratrol é o antioxidante mais eficiente, como reportado pela drástica redução do tempo de correlação rotacional, de modo que em $50 \mu\text{M}$ os marcadores de spin apresentam valores de τ_c característico de amostras não oxidadas. Tanto a quercetina quanto a (+)-catequina se mostraram antioxidantes altamente eficientes, sendo capazes de proteger por completo a LDL

da oxidação. Porém o método de simulação mostra que esta total proteção só ocorre para concentrações acima de 100 μM para (+)-catequina e somente em 200 μM para quercetina. De acordo com o que foi mostrado na Figura 4.6A, o BHT foi o antioxidante que teve menor efeito protetor contra o aumento da rigidez provocada pela oxidação dos lipídios da LDL, sendo pouco eficiente mesmo em altas concentrações.

Resultados similares aos reportados pelo parâmetro $2A_{//}$ foram obtidos pelo método da formação de MDA-TBA (Figura 4.7), no qual, mesmo em concentrações muito baixas, tanto o resveratrol quanto os dois flavonóides estudados foram capazes de reduzir completamente a peroxidação lipídica, não sendo possível notar qualquer diferença entre o efeito antioxidante destas moléculas à medida que a concentração foi aumentada. Os resultados obtidos pelo teste de MDA indicam que os três antioxidantes utilizados preveniram completamente a lipoperoxidação quando adicionados em concentrações em torno de 25 μM . Estes resultados são consistentes com os obtidos com base no parâmetro $2A_{//}$ (Figura 4.6A). Entretanto, os dados de simulação não retrataram bem este comportamento, sugerindo que apesar de haver uma boa convergência entre os espectros experimentais e os teóricos, na situação em particular, o uso da simulação de espectro não trouxe vantagem na determinação das diferenças finas de mobilidade causadas pelos diferentes graus de oxidação lipídica.

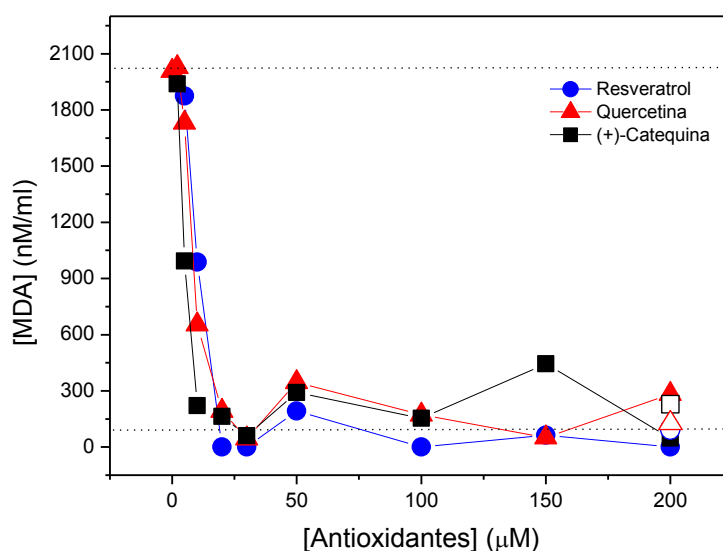


Figura 4.7: Variação concentração de MDA-TBA, para LDL oxidada com 200 μM de CuSO_4 , em função da concentração de antioxidante. A concentração de MDA foi calculada de acordo com a equação 5.1 para um coeficiente de extinção molar igual a $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.3 Efeito da temperatura sobre a LDL oxidada e não oxidada

O tempo de correlação rotacional, para amostras de LDL oxidadas com 400 μM de CuSO_4 e amostras não-oxidadas em função da temperatura é mostrado na Figura 4.8. Para ilustrar as mudanças na forma de linha, os espectros destas amostras para duas temperaturas, 4 e 34°C, também são mostrados. Como podemos notar, a oxidação da LDL provoca aumentos significativos nos valores de τ_c para temperaturas inferiores a 30°C. Por outro lado, para temperaturas maiores ambas as curvas convergem para um mesmo ponto, que efetivamente ocorre em 60°C. Isto provavelmente acontece porque nesta temperatura a região lipídica em torno do marcador de spin já tenha uma máxima desordem. É importante mencionar que os espectros de RPE foram completamente reversíveis, mesmo no caso das amostras oxidadas, após medição na temperatura de 70°C e remedição em 30°C, indicando que o marcador de spin encontra-se bem distribuído no interior da LDL e que possíveis efeitos de desnaturação da proteína não se refletiram na região lipídica.

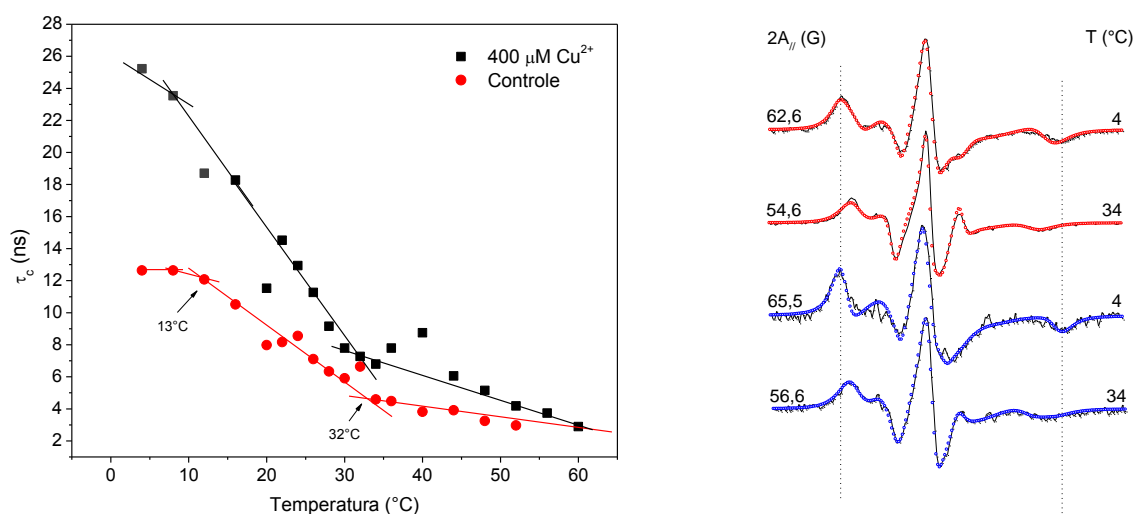


Figura 4.8: Tempo de correlação rotacional (painel esquerdo) obtido a partir do programa de simulação NLLS, para o marcador de spin 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL em função da temperatura. No painel direito é mostrado a alteração na forma de linha dos espectros em duas temperaturas distintas, 4 e 34°C. Além disso, os valores referentes ao parâmetro espectral $2A_{||}$ estão indicados. Os espectros simulados para as amostras controle e oxidada são representados pelos círculos vermelhos e azuis, respectivamente. O campo magnético total de varredura foi de 100 G.

Da figura acima percebemos mudanças de inclinação de ambas as curvas ocorrendo em torno de 32°C. Este comportamento térmico poderia ser confundido com uma

transição de fase no domínio lipídico da LDL. Entretanto, a maneira mais adequada para se investigar transições de fase em membranas e sistemas lipídicos com base nos valores de τ_c , seria verificando as mudanças na inclinação do gráfico de $\log(\tau_c)$ versus $1/T$ (gráfico de Arrhenius). Tais mudanças estão diretamente relacionadas às energias de ativação (E_a) necessárias para que o marcador de spin alcance graus de mobilidade cada vez maior [132]. De modo que, do gráfico de Arrhenius, podemos obter os valores de E_a usando a seguinte equação:

$$\log \tau_c = E_a/2.3RT, \quad (5.2)$$

onde R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta. A eq. (5.2) é conhecida como equação de Arrhenius. Os valores da energia de ativação média para as amostras controle e oxidada foram respectivamente 5,9 kcal/mol e 6,9 kcal/mol, mostrando que a barreira de energia encontrada pelo marcador de spin aumenta com a oxidação. Na prática, em temperaturas onde ocorrem transições de fase a inclinação da curva no gráfico de Arrhenius é alterada, o que não foi verificado em nossos experimentos, como pode ser notado na Figura 4.9 abaixo.

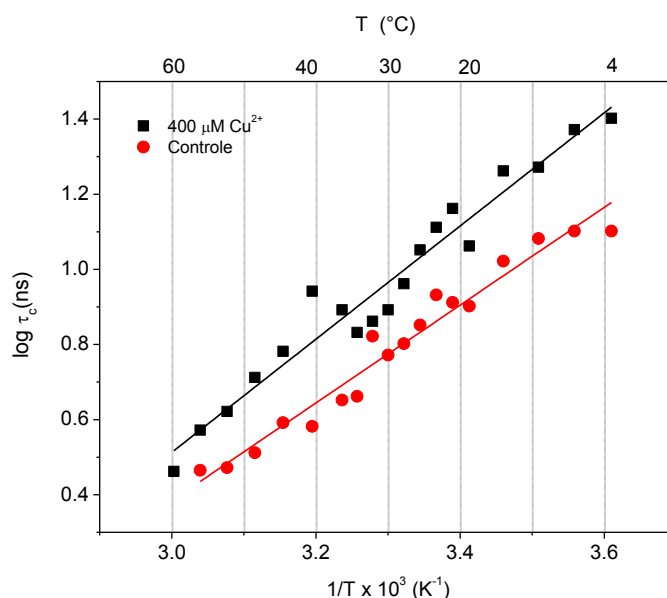


Figura 4.9: Gráfico de Arrhenius obtido a partir da simulação dos espectros de 5-DSA inserido nos domínios lipídicos da LDL oxidada (com 400 μM de CuSO₄) e não-oxidada (círculos vermelhos) em função do inverso da temperatura absoluta. As retas através dos pontos foram obtidas por ajuste linear seguindo o método dos mínimos quadrados. O gráfico de Arrhenius é mais adequado para identificar transições de fase via tempo de correlação rotacional. O padrão linear das curvas sugere a ausência de transições de fase no ambiente em que o marcador de spin de encontra.

5 Discussão

Ao longo dos anos a LDL tem sido amplamente usada como objeto de estudos na busca por uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na oxidação de lipídios, além de ser amplamente usada também como modelo para se avaliar a atividade antioxidante de moléculas. Para esta proposta, tem sido desenvolvidos modelos *in vitro* que incluem sua oxidação por íons de cobre [133]. Embora seja bem aceito que a oxidação dos componentes da LDL seja um importante evento para desencadeamento da aterosclerose, os mecanismos de oxidação nos diferentes componentes desta partícula, bem como a organização dos lipídios durante o processo de oxidação ainda não está completamente estabelecida. Neste contexto, as alterações dinâmicas dos lipídios da LDL sujeita a estresses oxidativo por íons de Cu^{2+} foram caracterizadas pela técnica de RPE, usando um marcador de spin específico para região lipídica. Baseado nas informações espectrais reportadas pelo marcador de spin, a eficácia antioxidante do resveratrol, da quercetina e da (+)-catequina também foi avaliada, e os resultados foram ainda comparados com o método de formação de MDA-TBA.

5.1 Características dos espectros de RPE de 5-DSA em LDL

Em geral, os espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA em bicamadas lipídicas contendo proteínas são compostos por duas componentes espectrais, as quais indicam a coexistência de duas populações de marcadores de spin com diferentes estados de mobilidade. A componente mais restrita está associada aos marcadores de spin que contornam as regiões hidrofóbicas da proteína, enquanto o componente mais móvel surge a partir dos marcadores de spin mais inseridos na fase lipídica, longe da proteína [134, 65]. Por outro lado, em membranas de eritrócitos ou de *ghosts*, devido às altas concentrações de proteínas (~50%), somente a componente espectral correspondente aos marcadores de spin em contato com as proteínas aparece nos espectros de RPE de 5-DSA, indicando que a fração de marcadores de spin sem qualquer contato com as proteínas é muito pequena [94]. Os espectros de 5-DSA em LDL obtidos neste trabalho são semelhantes aos deste marcador em *ghosts*, com valores de $2A_{\parallel}$ praticamente idênticos, Figura 4.1. Sabendo que a proteína ApoB-100 tem sua maior porção na camada mais superficial da LDL e que marcadores de spin derivados do ácido esteárico se estabilizam nesta camada [135, 136, 93], nossos resultados

sugerem que na LDL há uma forte participação do componente proteico na dinâmica dos lipídios, similarmente ao que ocorre em membranas de *ghosts*. Assim, o marcador de spin também é capaz, indiretamente, de detectar alterações na proteína da LDL. Correspondentemente, resultados de espectroscopia de RMN e de fluorescência com resolução temporal tem evidenciado que os fosfolipídios da superfície da LDL estão preferencialmente imobilizados devido à interação destas moléculas com a ApoB-100 [137, 138]. Por outro lado, não deve ser descartada a contribuição das moléculas de colesterol (cerca de 9% da massa total da LDL) para a rigidez do sistema, uma vez que estas moléculas também se estabilizam em sua maioria na monocamada externa da partícula.

5.2 Eficiência do resveratrol, da quercetina e da (+)-catequina como antioxidante em comparação com o BHT

A grande maioria dos estudos relacionados a danos oxidativos em sistemas lipídicos e membranas celulares envolvendo a RPE e o método dos marcadores de spin se limita a detecção da presença dos radicais livres ou simplesmente a redução do radical nitróxido e não às consequências dos danos oxidativos. Dentre os marcadores de spin usados neste tipo de estudo, os derivados do ácido esteárico são os mais utilizados, o que se deve principalmente a sua alta capacidade de incorporação em membranas celulares. Neste trabalho foi evidenciado que a incorporação do marcador de spin 5-DSA na LDL é capaz de detectar alterações na dinâmica local resultante da peroxidação lipídica, reportado por aumentos de até 3 G no parâmetro espectral $2A_{//}$ (Figura 4.2). Aumentos equivalentes no parâmetro $2A_{//}$ foram alcançados neste trabalho para amostras não oxidadas submetidas à redução de temperatura de aproximadamente 13°C, de acordo com o reportado por Gorshkova et al. que evidenciaram o mesmo aumento para uma redução de temperatura de aproximadamente 14°C [135]. Sendo assim, como ocorre com a diminuição da temperatura, fica clara a relação entre o aumento do $2A_{//}$ e a diminuição do grau de mobilidade molecular no interior da LDL, ou seja, diminuição da fluidez lipídica como consequência do estresse oxidativo.

Embora sejam raros os trabalhos que relacionam o grau da peroxidação lipídica à dinâmica dos lipídios em lipoproteínas, há na literatura diversos estudos relacionando estes dois eventos em membranas celulares e bicamadas lipídicas. Como exemplo, o enrijecimento dos lipídios de membranas de *ghost* de hemácias marcadas com marcadores de spin derivados

da fosfatidilcolina foi observado, para amostras submetidas à oxidação por irradiação com raios- γ , como consequência da peroxidação lipídica [139]. Eichenberger e colaboradores associaram ao aumento da rigidez de lipídios de membranas oxidadas de microsomas à lipoperoxidação lipídica, causada principalmente pela formação de ligações covalentes entre os radicais lipídicos adjacentes, o que leva à diminuição da liberdade de movimento dos lipídios [140]. Em estudos desenvolvidos em nosso laboratório também com membranas de *ghosts* (dados não publicados), aumentos de cerca de 2 G no parâmetro $2A_{//}$ foram observados para membranas após sofrerem peroxidação lipídica com Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por outro lado, em membranas modelo de fosfolipídios de soja, o efeito da peroxidação lipídica com ferro/ascorbato na fluidez de membrana se mostrou altamente dependente da posição do nitroxido ao longo da cadeia de ácidos graxos. Uma rigidez máxima foi observada para os isômeros com nitroxidos nas posições 10- e 12-DSA [141]. Em trabalho recente, um aumento na rigidez das membranas de eritrócitos, associado a um aumento de também 2G no parâmetro $2A_{//}$ e a um aumento da concentração de MDA, foi evidenciado quando estas células foram submetidas à oxidação induzida por H_2O_2 [94]. Os aumentos no parâmetro $2A_{//}$ seguido pelos acréscimos na concentração de MDA (Figura 4.4) para amostras oxidadas por íons de Cu^{2+} estão em acordo com os trabalhos mencionados, confirmando a hipótese da peroxidação lipídica na LDL e a importância da RPE e do método de marcadores de spin para este tipo de estudo.

Dada a importância desta metodologia de detecção por RPE, as capacidades antioxidantes do resveratrol, da (+)-catequina e da quercetina foram avaliadas e comparadas com o antioxidante clássico BHT. Nossos resultados mostraram que em baixas concentrações de $CuSO_4$ (razão molar de em torno de 40:1) não é possível observar qualquer variação significativa no $2A_{//}$, indicando que nestas concentrações não ocorre peroxidação lipídica. Isto se deve ao fato de que os antioxidantes endógenos, α -tocoferol, γ -tocoferol, carotenoides, oxicarotenóides e ubiquinol-10 protegem a LDL até certa concentração de cobre, e somente após o consumo destes antioxidantes ($\sim 80 \mu M$ de $CuSO_4$ de acordo com nossos resultados) é que o processo oxidativo se inicia. Sendo assim, para avaliar o papel protetor dos antioxidantes, foi escolhida uma concentração de $CuSO_4$ em que o efeito protetor dos antioxidantes endógenos não interferisse nos resultados dos antioxidantes aqui testados, isto é, concentração em que a peroxidação lipídica fosse máxima, que neste trabalho correspondeu a $200 \mu M$ de $CuSO_4$.

A eficiência do resveratrol em proteger a LDL contra a oxidação por íons de cobre foi evidenciada por Cheng e colaboradores, pelos métodos de formação de MDA, avaliação do consumo de α -tocoferol e captura de oxigênio para concentrações equivalentes a 5,5 mg/ml de LDL, 69 μ M de CuSO_4 e 14 μ M de resveratrol. Seus resultados mostraram que o resveratrol foi capaz de proteger parcialmente a LDL por cerca de 1 h [142]. Por outro lado, para um período de 3 h de incubação, Berrougui e colaboradores usaram o método de formação de dieno conjugado e observaram uma redução da peroxidação lipídica em torno de 35%, porém utilizando uma quantidade bem maior de cobre, isto é, concentrações equivalentes a 5,5 mg/ml, 550 μ M de CuSO_4 e 55 μ M de resveratrol [143]. Neste contexto, nossos dados mostraram também que por um período de 3 h, 14 μ M de resveratrol é capaz de inibir a peroxidação lipídica causada pela reação de 200 μ M de CuSO_4 com a LDL (5,5 mg/ml) apenas parcialmente, isto é, em cerca de 60%, como indicado pelas Figuras 4.6 e 4.7.

Esta capacidade protetora do resveratrol, bem como de alguns flavonóides, foi associada à capacidade destas moléculas em inibir a ligação do cobre a LDL [144, 130]. Foi mostrado que, em concentrações equimolares, a quercetina é capaz de diminuir a ligação do cobre a LDL em 50% enquanto a catequina em 20% [144]. Por outro lado, Lucie Frémont e colaboradores avaliaram o papel protetor de polifenóis de vinho tinto contra a peroxidação lipídica de LDL de porco iniciada por íons de cobre e AAPH. Seus resultados mostraram que o resveratrol é mais eficiente em proteger os ácidos graxos poli-insaturados da LDL (\cong 5,5 mg/ml) contra a oxidação após 5 h de incubação com CuSO_4 (\cong 34,3 μ M), e menos eficiente contra a oxidação provocada pelo radical iniciador AAPH (\cong 6,8 mM), quando comparado a catequina e a quercetina os quais tiveram efeitos iguais [145]. A maior eficiência antioxidante do resveratrol foi associada ao fato de que este polifenol pode proteger a LDL atuando tanto como quelante de cobre como também eliminando os radicais livres formados (atuando como *scavenger*), enquanto que os flavonóides quercetina e (+)-catequina são mais eficientes como *scavengers*. Entretanto a capacidade do resveratrol em atuar como quelante de cobre predomina sobre sua capacidade como *scavenger*, que por sua vez é menor que a capacidade *scavenger* da quercetina e da (+)-catequina [145]. Assim, eficiência de um antioxidante contra a peroxidação lipídica iniciada por íons de cobre está diretamente relacionada à sua capacidade quelante e *scavenger*.

Embora nossos resultados não tenham detectado qualquer diferença significativa entre o efeito antioxidante dos três polifenóis estudados, os dados de RPE mostraram que o

antioxidante sintético BHT é o menos eficiente em proteger a LDL contra a peroxidação lipídica causada por íons de cobre dentre os compostos estudados. É sabido da literatura que as capacidades antioxidantes dos flavonóides estão diretamente relacionadas à presença dos grupos hidroxila no anel B (Figura 1.8) e no anel A das moléculas, os quais podem doar hidrogênios (elétrons) para estabilizar espécies radicalares, e também melhorar a habilidade quelante destas moléculas. No caso do resveratrol, a hidroxila no anel A pode agir em conjunto com o oxigênio carbonila adjacente para quelar íons metálicos, o que também ocorre no caso dos flavonóides para hidroxilas adjacentes [144, 117]. Já a simples presença e as disposições dos grupos hidroxilas na molécula são determinantes na captura dos radicais livres [130]. Sendo assim, a baixa proteção do BHT (Figura 1.7) contra a oxidação da LDL pode ser entendida pela presença de apenas um grupo hidroxila na molécula, o que inviabiliza a função quelante deste composto e limita sua ação como *scavenger*. Convém mencionar ainda que, apesar de ser um antioxidante clássico muito usado na conservação de alimentos e em cosméticos, o BHT possui efeitos altamente tóxicos em animais [146], o que inviabiliza sua administração no corpo em concentrações adequadas para combater os radicais livres. Diferentemente dos outros antioxidantes testados, os quais são produtos naturais não tóxicos e que podem ser ingeridos, principalmente, pelo consumo de uvas e vinho tinto.

O fato dos dados referentes ao tempo de correlação rotacional (Figura 4.6B) ter indicado uma superioridade do resveratrol em relação aos flavonóides, enquanto o parâmetro $2A_{//}$ e o MDA não ter indicado qualquer diferença entre eles, sugere que a simulação computacional, embora seja um método muito importante para a análise do comportamento do marcador de spin descrito por espectros com mais de uma componente em sistemas como membranas, lipossomas e proteínas [147, 148], não é adequado para detectar pequenas diferenças na dinâmica do marcador de spin, neste regime de movimento, em espectros com apenas uma única componente. E neste caso, a medida do $2A_{//}$ diretamente do espectro é a maneira mais adequada para se avaliar a peroxidação lipídica. Por outro lado, dada a importância do método de simulação computacional, este assunto será explorado em novos experimentos com outros marcadores de spin, em continuidade a este trabalho.

5.3 Efeito da Temperatura

Embora a RPE e o método dos marcadores de spin não seja a técnica mais adequada para monitorar transições de fase, estudos tem comprovado sua eficiência em identificar mudanças de fase em sistemas membranas e lipossomas [147, 149]. Regiões onde ocorrem transições de fase são caracterizadas por mudanças no movimento do marcador de spin, as quais podem ser identificadas pelas mudanças nos parâmetros $2A_{\parallel}$ e τ_c . Sendo assim, para obter um melhor entendimento sobre o comportamento dinâmico dos lipídios da LDL após oxidação por íons de cobre, a LDL foi submetida a diferentes temperaturas e a dinâmica do 5-DSA foi monitorado pelo tempo de correlação rotacional.

Experimentos de calorimetria e espectroscopia de RMN têm mostrado que o núcleo da LDL possui uma transição de fase reversível, como ponto médio em torno de 30°C. De modo que acima desta transição o núcleo encontra-se em um estado quase líquido, e abaixo dela em um estado ordenado líquido cristalino [93]. Dados de DSC têm indicado que essa transição de fase é altamente dependente do conteúdo lipídico da LDL, podendo variar de partícula para partícula e de região para região. Além disso, a temperatura de transição da LDL não é bem definida, tendo uma largura de aproximadamente 20°C e uma variação de cerca de 10°C na temperatura de ponto médio [150]. Já a temperatura de desnaturação da proteína apoB-100 encontra-se em torno de 81°C, como relatado por medidas de DSC. Por outro lado, ao avaliar regiões específicas da lipoproteína este panorama muda. Estudos usando sondas fluorescentes mostraram que enquanto mudanças no ordenamento dos lipídios do núcleo são observadas no intervalo de temperatura de transição, nenhuma alteração de ordem é observada para os lipídios mais externamente estruturados na partícula, sugerindo que, além da mudança na temperatura de transição de fase da LDL de região para região, na camada externa esta temperatura é bem mais elevada [97]. Em acordo com esta interpretação, nossos resultados mostraram que nenhuma transição de fase pode ser observada para amostras de LDL nativa ou oxidada com 400 μM de cobre, no intervalo de temperatura entre de 4-60°C, evidenciado pelo comportamento linear durante todo intervalo de temperatura do gráfico de Arrhenius (Figura 4.9). Este resultado sugere que o compartimento onde o 5-DSA se estrutura, isto é, a região de interface, permanece no mesmo estado físico durante todo o intervalo de temperatura estudado, desde bem abaixo ou bem acima da transição de fase do núcleo da LDL, o que pode ser devido ao fato de que a forte interação entre os lipídios desta região e a proteína ApoB-100 eleve a temperatura de transição de fase, não podendo ser

observada neste intervalo.

Interessantemente, a drástica oxidação sofrida pelos lipídios da LDL não modificou o comportamento da partícula com a mudança da temperatura, sugerindo que o ambiente em que o marcador de spin se encontra não se altera com a oxidação, mas somente seu grau de mobilidade. Além disso, os valores calculados da energia de ativação (E_a) de 6,9 kcal/mol e 5,9 kcal/mol para as amostras oxidada e não-oxidada (controle), respectivamente, mostram que a peroxidação lipídica aumenta a barreira de energia que o marcador de spin precisa superar para alcançar altos graus de movimento.

Outro fator que deve ser levado em conta quando se avalia as mudanças biofísicas a partir da dinâmica de sistemas constituídos de lipídios e proteínas é a possibilidade de haver fusão ou agregação entre as moléculas de LDL após a oxidação, o que também poderia restringir o movimento do marcador de spin. Neste sentido, tem sido sugerido que a oxidação por íons de cobre induz agregação e fusão entre partículas de LDL [151], e os possíveis mecanismos de agregação e fusão destas partículas foram discutidos por Öörni et al. [152]. Neste trabalho, os espectros foram completamente reversíveis com a temperatura elevada até 70°C e o comportamento no gráfico de Arrhenius não mostrou qualquer mudança consistente com agregação de proteína. Este resultado concorda com resultados reportados por Gerry e colaboradores [153] no qual uma agregação considerável entre as partículas de LDL somente é observada a 37°C e após cerca de 6h de incubação com CuSO₄. Em trabalho recente, usando ressonância magnética nuclear e a técnica de Z-scan, foi mostrado também que nenhuma fusão entre partículas de LDL oxidadas por íons de cobre e ferro pode ser notada, mas que um sinal de agregação é percebido para amostras incubadas por 18 h com CuSO₄ [131].

6 Conclusões

Nossos estudos usando a espectroscopia de RPE de um marcador de spin derivado do ácido esteárico inserido na LDL e medidas da formação de MDA nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- O marcador 5-DSA se distribui na partícula de LDL em contato com as cadeias polipeptídicas da ApoB-100, o que restringe o movimento do marcador de spin e resulta em um espectro com apenas uma componente, isto é, a maioria dos marcadores ficam em contato com a proteína (na região de contorno) e a fração do “bulk” (sem contato com a proteína e apenas tendo como vizinhos outros lipídios) não é resolvida no espectro de RPE;
- O processo oxidativo desencadeado por íons de cobre nas amostras de LDL (para uma razão molar a partir de 40:1) resulta na peroxidação de seus lipídios, o qual pode ser monitorado pela diminuição na dinâmica do marcador de spin 5-DSA refletida no aumento do parâmetro espectral $2A_{//}$ e acompanhada pela elevação da concentração de MDA;
- Todos os polifenóis estudados foram capazes de proteger a LDL completamente contra a oxidação por íons para concentrações a partir de 30 μM ;
- O BHT foi capaz de proteger a peroxidação dos lipídios da LDL apenas parcialmente, mesmo em altas concentrações, diferentemente dos polifenóis. Este resultado foi atribuído à presença de apenas uma única hidroxila na molécula do BHT, enquanto os polifenóis possuem pelo menos três hidroxilas que permitem às moléculas atuarem tanto como *scavenger* quanto como quelantes e assim contribuir para a prevenção do processo aterosclerótico;
- O movimento do marcador de spin aumenta com a elevação da temperatura, porém a transição de fase do núcleo da LDL não é capaz de afetar a dinâmica do ambiente molecular em torno do 5-DSA, o qual permanece no mesmo estado físico durante todo intervalo de temperatura;
- A oxidação da LDL aumenta a barreira da energia que os marcadores de spin precisam superar para alcançar graus superiores de movimento;

7 Perspectivas

Através da espectroscopia de RPE pudemos monitorar a oxidação da LDL por meio da dinâmica do 5-DSA inserido na partícula. Entretanto, acreditamos que alguns ensaios ainda podem ser realizados no intuito de buscar informações complementares antes da submissão deste trabalho em periódico de circulação internacional. Além disso, outros trabalhos serão desenvolvidos utilizando os métodos explorados aqui. Em relação a estas observações, segue abaixo nossas perspectivas futuras:

- Avaliar a oxidação da LDL em diferentes regiões da partícula, usando marcadores de spin lipídicos capazes de se inserirem mais internamente na LDL;
- Estudar o efeito da oxidação provocada pelos íons de cobre na dinâmica das cadeias laterais da ApoB-100, usando marcadores de spin específicos que reagem com as cisteínas livres desta proteína;
- Avaliar o potencial antioxidante do 4-nerolidilcatecol (4-NC), composto natural isolado da “pariparoba” cuja atividade antioxidante em membranas de fosfolipídios e membranas de *ghosts* tem sido recentemente comprovada em nosso laboratório, em LDL utilizando a espectroscopia de RPE e o teste de formação de MDA;
- Estudar a interação da LDL com BSA e verificar o potencial antioxidante da albumina. Para este estudo podemos avaliar as alterações devido à interação entre estas moléculas tanto por marcadores de spin inseridos na LDL como por marcadores ligados à BSA;
- Estudar o efeito antioxidante em LDL de outros compostos com atividades terapêuticas conhecidas, em especial compostos isolados de plantas do cerrado brasileiro;

8 Bibliografia Parte I e II

- [1] S. Curry, P. Brick e N. Franks, "Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies.," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1441, pp. 131-140, 1999.
- [2] T. E. J. Emerson, "Unique features of albumin: a brief review.," *Crit Care Med.*, vol. 17, pp. 690-694, 1989.
- [3] A. A. Spector, K. John e J. E. Fletcher, "Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin," *JOURNOLF LIPIDR ESEARCH*, vol. 10, pp. 56-67, 1969.
- [4] P. D. Ross e S. Subramanian, "Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability," *Biochemistry*, vol. 20, pp. 3096-3102, 1981.
- [5] U. Kragh-Hansen, "Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin," *Pharmacological Reviews*, vol. 33, pp. 17-46, 1981.
- [6] M. Bardhan, J. Chowdhury e T. Ganguly, "Investigations on the interactions of aurointricarboxylic acid with bovine serum albumin: Steady state/time resolved spectroscopic and docking studies," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 102, p. 11–19, 2011.
- [7] C. Dufour e O. Dangles, "Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy," *Biochim.Biophys. Acta*, vol. 1721, p. 164–173, 2005.
- [8] H. Cheng, H. Liu, Y. Zhang e G. Zou, "Interaction of the docetaxel with human serum albumin using optical spectroscopy methods," *J. Lumin.*, vol. 129, p. 1196–1203, 2009.
- [9] U. Katrahalli, U. Jaldappagari e S. Kalanur, "Study of the interaction between fluoxetine hydrochloride and bovine serum albumin in the imitated physiological conditions by multi-spectroscopic methods," *J. Lumin.*, vol. 130, p. 211–216, 2010.
- [10] U. Kragh-Hansen, "Structure and ligand binding properties of human serum albumin.," *Danish medical bulletin*, pp. 57-84, 1990.
- [11] X. M. He. e D. C. Carter, "Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin," *Nature*, pp. 209-215, 1992.
- [12] J. R. Brown, "Structural origins of mammalian albumin," *Federation Proceedings*, pp. 2141-2144, 1976.
- [13] J. T. Peters, All About albumin, Biochemistry, genetic and medical applications., New York: Academic Press, 1996, pp. 9-75.
- [14] E. Katchalskge, G. S. Benjamin e V. Gross, "The Availability of the Disulfide Bonds of Human

and Bovine Serum Albumin and of Bovine γ -Globulin to Reduction by Thioglycolic Acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 79, p. 4096–4099, 1957.

- [15] Y. Gryzunov, A. Arroyo, J.-L. Vigne, Q. Zhao, V. Tyurin, C. Hubel, R. Gandley, Y. Vladimirov, R. Taylor e V. Kagan, "Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper–albumin complexes from antioxidants to prooxidants," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 413, p. 53–66, 2003.
- [16] A. Alonso, J. V. d. Silva e M. Tabak, "Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1646, pp. 32–41, 2003.
- [17] A. Alonso, J. G. Santos e M. Tabak, "Stratum corneum protein mobility as evaluated by a spin label maleimide derivative," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 81, pp. 89–101, 2000.
- [18] S. Couto, M. S. Oliveira e A. Alonso, "Biophysical Chemistry," *Dynamics of proteins and lipids in the stratum corneum: Effects of percutaneous permeation enhancers*, vol. 116, pp. 23–31, 2005.
- [19] K. Fukuzawa, Y. Saitoh, K. Akai, K. Kogure, S. Ueno, A. Tokumura, M. Otagiri e A. Shibata, "Antioxidant effect of bovine serum albumin on membrane lipid peroxidation induced by iron chelate and superoxide," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1668, p. 145–155, 2005.
- [20] L. Turell, S. Carballal, H. Botti, R. Radi e B. Alvarez, "Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, pp. 305–311, 2009.
- [21] R. Dean, J. Hunt, A. Grant, Y. Yamamoto e E. Niki, "Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 11, p. 161–168, 1991.
- [22] J. S. Stamler, D. I. Simon, J. A. Osborne, M. E. Mullins, O. Jaraki, M. E. Mullins e O. Jaraki, "S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds," *Proc Natl Acad Sci*, vol. 89, pp. 444–448, 1992.
- [23] J. F. K. Jr., D. Simon, J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Scharfstein, J. A. Vita e J. Loscalzo, "NO Forms an Adduct with Serum Albumin that Has Endothelium-derived Relaxing Factor-like Properties," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, pp. 1582–1589, 1993.
- [24] J. K. A. Kama, L. Zha e A. H. Zewail, "Ultrafast hydration dynamics in protein unfolding: Human serum albumin," *PNAS*, vol. 101, p. 13411–13416, 2004.
- [25] D. C. Carter e J. X. Ho, "Structure of Serum Albumin," *Adv Protein Chem.*, vol. 45, pp. 153–203, 1994.
- [26] G. N. Somero, "Proteins and Temperature," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 57, pp. 43–68, 1995.

- [27] S. Gumpen, P. Hegg e H. Martens, "Thermal stability at fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 30, pp. 189-196, 1979.
- [28] A. Kuznetsov, B. Ebert, G. Lassmann e A. Shapiro, "Adsorption of small molecules to bovine serum albumin studied by the spin-probe method.," *Biochim Biophys Acta.*, vol. 379, pp. 139-146, 1975.
- [29] J. Oaks, "Thermally Denatured Proteins," *J. Chem. Soc. Faraday I*, vol. 72, pp. 228-237, 1976.
- [30] R. Wetzel, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Bohm, B. Ebert, H. Hamann, J. Krumbiegel e G. Lasmann, "Temperature Behaviour of Human Serum Albumin," *Eur. J. Biochem.*, vol. 104, pp. 469-478, 1980.
- [31] S. Poole, S. I. West e J. C. Fry, "Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins," *Food Hydrocolloids*, vol. 1, pp. 301-316, 1987.
- [32] Y. Moriyama, E. Watanabe, K. Kobayashi, H. Harano, E. Inui e K. Takeda, "Secondary Structural Change of Bovine Serum Albumin in Thermal Denaturation up to 130°C and Protective Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Change," *J. Phys. Chem. B*, vol. 112, p. 16585–16589, 2008.
- [33] J. A. Hamilton, S. Era, S. P. Bhamidipati e R. G. Reed, "Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin.," *Proc Natl Acad Sci*, vol. 88, p. 2051–2054, 1991.
- [34] E. Gelamo e M. Tabak, "Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants," *Spectrochimica Acta*, vol. 1594, p. 2255–2271, 2000.
- [35] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari e P. Ascenzi, "The Extraordinary Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin," *IUBMB Life*, vol. 57, p. 787–796, 2005.
- [36] H. G. Mudge, N. Desbiens e R. G. Stibitz, "Binding of iophenoxate and iopanoate to human serum albumin," *Drug Metab Dispos*, vol. 6, pp. 432-439, 1978.
- [37] K. Takeda, M. Shigeta e K. Aoki, "Secondary structures of bovine serum albumin in anionic and cationic surfactant solutions," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 117, p. 120–126, 1987.
- [38] L. L. Schramm, *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*, Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [39] L. L. Schramm, E. N. Stasiuk e D. G. Marangoni, "Surfactants and their applications," *Annu. Rep. Prog. Chem.*, vol. 99, p. 3–48, 2003.

- [40] D. Kelley e D. J. McClements, "Influence of sodium dodecyl sulfate on the thermal stability of bovine serum albumin stabilized oil-in-water emulsions," *Food Hydrocolloids*, vol. 87–93, 2003.
- [41] J. Chamani, "Comparison of the conformational stability of the non-native α -helical intermediate of thiol-modified β -lactoglobulin upon interaction with sodium n-alkyl sulfates at two different pH," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 299, pp. 636-646, 2006.
- [42] N. J. Turro, X.-G. Lei, K. P. Ananthapadmanabhan e M. Aronson, "Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant - Interactions: The BSA/SDS System," *Langmuir*, vol. 11, pp. 2525-2533, 1995.
- [43] K. P. Ananthapadmanabhan e E. D. Goddard, Interactions of surfactants with polymers and proteins, E. D. Goddard e K. P. Ananthapadmanabhan, Eds., New York: Boca Raton: CRC Press., 1993, p. 319–366.
- [44] K. Takeda, M. Shigeta e K. Aoki, "Secondary Structures of Bovine Serum Albumin in Anionic and Cationic Surfactant Solutions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 117, pp. 120-126, 1987.
- [45] P. G. Fajer, "Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis," em *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, JohnWiley & Sons Ltd, 2000, p. 5725–576.
- [46] H.-J. Steinhoff, "METHODS FOR STUDY OF PROTEIN DYNAMICS AND PROTEIN-PROTEIN INTERACTION IN PROTEINUBIQUITINATION," *Frontiers in Bioscience*, vol. 7, pp. 97-110, September 2002.
- [47] H. M. SWARTZ, J. R. BOLTON e D. C. BORG., Biological Applications of Electron Spin Resonance, New York: Wiley, 1972.
- [48] J. R. Perussi, A. C. Ruggiero e M. Tabak, "O Método de Marcadores de Spin Aplicado a Bioquímica," *Quimica Nova*, vol. 08, n. 4, pp. 313-324, 1985.
- [49] P. L. Nordio, "General Magnetic Resonance Theory," em *Spin Labelling: Theory and Application*, New York, Academic Press, 1976, pp. 5-52.
- [50] A. Lund, M. Shiotani e S. Shimada, Principles and Applications of ESR Spectroscopy, New York: Springer, 2011.
- [51] G. I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuj, A. I. Smirnov e R. Tamura, Nitroxides - Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science, Weinheim: WILEY-VCH, 2008.
- [52] C. E. G. Salmon, D. d. S. Neto, M. Tabak e A. J. d. C. Filho, "SIMULAÇÃO DE ESPECTROS DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE) ATRAVÉS DO," *Quim. Nova*, vol. 30 (5), pp. 1240-1248, 2007.
- [53] I. D. Campbell e R. A. Dwek, Biological Spectroscopy, California: Benjamin-Cummings Publishing Company, 1984.

- [54] E. Bordignon. [Online]. Available: http://www.epr.ethz.ch/news/Bordignon_tutorial_Nitroxide_spectrum_analysis.pdf. [Acesso em 02 Novembro 2011].
- [55] J. D. Morrisett, "The Use of Spin Labels for Studying the Structure and Function of Enzymes," em *Spin Labeling: Theory and Applications*, New York, Academic Press, 1976, pp. 274-331.
- [56] B. W. Matthews, "Studies on Protein Stability with T4," *Adv Protein Chem.*, vol. 46, pp. 249-78, 1995.
- [57] P. P. Borbat, A. J. Costa-Filho, K. A. Earle, J. K. Moscicki e J. H. Freed, "Electron Spin Resonance in Studies of Membranes and Proteins," *Science*, vol. 291, pp. 266-269, January 2001.
- [58] H. S. Mchaourab, "Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics," *Biochemistry*, vol. 35, pp. 7692-7704, 1996.
- [59] H. S. Mchaourab, T. Kálai, K. Hideg e W. L. Hubbell, "Motion of Spin-Labeled Side Chains in T4 Lysozyme: Effect of Side Chain Structure," *Biochemistry*, vol. 38 (10), p. 2947-2955, 1999.
- [60] D. J. Shaw, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, 4^a ed., Burlington: Elsevier Science, 1992.
- [61] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*, New York: Plenum Press, 1985, p. 420.
- [62] Dep. de Física - UFV, "ESPALHAMENTO DE LUZ – CORRELAÇÃO DE FÓTONS," [Online]. Available: http://www.ufv.br/dpf/320/Espalhamento_Luz.pdf. [Acesso em 02 11 2011].
- [63] D. J. Schneider e J. H. Freed., Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. In *Biological Magnetic Resonance*, vol. 8, L. J. Berliner e R. J., Eds., New York: Plenum Press, 1989.
- [64] D. E. Budil, S. Lee, S. Saxena e J. H. Freed, "Nonlinear-least-squares analysis of slow-motional EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm," *J. Magn. Reson. A*, vol. 120, pp. 155-189, 1996.
- [65] O. H. Griffith e P. C. Jost, "Lipid Spin Labels in Biological Membranes," em *Spin Labeling: Theory and Applications*, New York, Academic Press, 1976, pp. 453-519.
- [66] M. Tabak, A. Alonso e O. R. Nascimento, "Single Crystal ESR Studies Of A Nitroxide Spin Label. I. Determination Of The G- And A- Tensors," *Journal of Chemical Physics*, vol. 79, pp. 1176-1184, 1983.
- [67] Y. Moriyama, Y. Kawasaka e K. Takeda, "Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 257, p. 41-46, 2003.

- [68] K. V. Holde, W. Johnson e P. Ho., "Thermodynamics and Biochemistry," em *Principles of Physical Biochemistry*, New Jersey, Prentice-Hall PTR , 1998, pp. 72-106.
- [69] M. Karahan, Z. Mustafaeva e C. Ozeroğlu, "Investigation of ternary complex formations of polyacrylic acid with bovine serum albumin in the presence of metal ions by fluorescence and dynamic light scattering measurements.," *The Protein Journal*, vol. 29, pp. 336-342 , 2010.
- [70] A. Valstar, M. Almgren, W. Brown e M. Vasilescu, "Interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering," *Langmuir*, vol. 16, pp. 922-927, 2000.
- [71] C. Giancola, C. D. Sena, D. Fessas, G. Graziano e G. Barone, "DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 20, p. 193–204, 1997.
- [72] M. Yamasaki e H. Yano, "Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: III. Effect of sodium dodecyl sulphate," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 14, p. 305–312, 1992.
- [73] N. J. Turro, X.-G. Lei, K. P. Ananthapadmanabhan e M. Aronson, "Spectroscopic Probe Analysis of Protein-Surfactant," *Langmuir*, vol. 11, pp. 2525-2533, 1995.
- [74] M. Vasilescu, D. Angelescu, M. Almgren e A. Valstar, "Interactions of Globular Proteins with Surfactants Studied with Fluorescence Probe Methods," *Langmuir*, vol. 15, p. 2635–2643, 1999.
- [75] R. ITRI, P. S. SANTIAGO, L. R. S. BARBOSA e M. TABAK, " Spectroscopic and structural studies of interaction of biomolecules with surfactant aggregates.," em *Current Focus on Colloids and Surfaces*, vol. 1, Kerala: Transworld Research Network, 2009, pp. 171-198.
- [76] S. F. Santos, D. Zanette, H. Fischer e R. Itri, "A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 262, p. 400–408, 2003.
- [77] N. Z. X.H. Guo, S. Chen e J. Teixeira, *Biopolymers* , vol. 29, pp. 335-343, 1990.
- [78] J. Simard, P. Zunszain, J. Hamilton e S. Curry, "Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis.," *J. Mol. Biol.* , vol. 361, pp. 336-351, 2006.
- [79] R. Wang, S. Sun, E. J. Bekos e F. V. Brigh, "Dynamics Surrounding Cys-34 in Native, Chemically Denatured, and Silica-Adsorbed Bovine Serum Albumin," *Anal. Chemistry*, vol. 67, pp. 149-159, 1995.
- [80] J. Lundgren e F. Bright, "Effects of Surfactants on the Dynamical Behavior of Acrylodan-Labeled Bovine Serum Albumin," *J. Phys. Chem.* , vol. 100, pp. 8580-8586, 1996.
- [81] S. De, A. Girigoswami e S. Das, "Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction,"

Journal of Colloid and Interface Science, vol. 285, pp. 562-573, 2005.

- [82] E. L. Gelamo, R. Itri, A. Alonso, J. V. Silva e M. Tabak, "Small-angle X-ray scattering and electron paramagnetic resonance study of the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 277, pp. 471-482, 2004.
- [83] D. de Sousa Neto, C. E. G. Salmon, A. Alonso e M. Tabak, "Interaction of bovine serum albumin (BSA) with ionic surfactants evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy," *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 70, pp. 147-156, 2009.
- [84] C. H. K. Honda, K.-i. Matsumoto e K. Endo, "Studies on bovine serum albumin–sodium dodecyl sulfate complexes using pyrene fluorescence probe and 5-doxylstearic acid spin probe," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 278, pp. 310-317, 2004.
- [85] J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker, "A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by ¹H-NMR spectroscopy.," *European Journal of Biochemistry*, vol. 225, pp. 363-368, 1994.
- [86] J. Christodoulou, P. J. Sadler e A. Tucker, "¹H NMR of albumin in human blood plasma: drug binding and redox reactions at Cys34.," *FEBS Letters*, vol. 376, pp. 1-5, 1995.
- [87] Y. A. Gryzunov, A. Arroyo, J. L. Vigne, Q. Zhao, V. A. Tyurin, C. A. Hubel, R. E. Gandley, Y. A. Vladimirov, R. N. Taylor e V. E. Kagan, "Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants," *Arch Biochem Biophys*, vol. 413, pp. 53-66, 2003.
- [88] P. Qu, H. Lu, S. Yan and Z. Lu, "Influences of cationic, anionic, and nonionic surfactants on alkaline-induced intermediate of bovine serum albumin.," *Int J Biol Macromol*, vol. 46 (1), pp. 91-9, 2010.
- [89] Ministério da Saúde, "Datasus," fev. 2011. [Online]. Available: <http://www2.datasus.gov.br>.
- [90] D. G. Hackam e S. S. Anand, "Emerging Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease: A Critical Review of the Evidence," *JAMA*, vol. 7, pp. 932-940, 2003.
- [91] W. J. Johnson, F. H. Mahlberg, G. H. Rothblat e M. C. Phillips, "Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins.," *Biochim Biophys Acta*, pp. 273-98, 1991.
- [92] D. Steinberg, S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo e J. L. Witztum, "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.," *N Engl J Med.*, vol. 14, pp. :915-24., 1989 .
- [93] T. Hevonoja, M. O. Pentikäinen, M. T. Hyvönen, P. T. Kovanen e M. Ala-Korpela, "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1488, n. 3, pp. 189-210, 2000.

- [94] S. A. Mendanha, J. L. V. Anjos, A. H. M. Silva e A. Alonso, "The electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components from erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, p. (aceito para publicação), 2012.
- [95] T. Teerlink, P. G. Scheffer, S. J. L. Bakker e R. J. Heine, "Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with a discoid particle shape," *Journal of Lipid Research*, vol. 45, pp. 954-966, 2004.
- [96] E. V. ORLOVA, M. B. SHERMAN, W. CHIU, H. MOWRI, L. C. SMITH e A. M. G. JR, "Three-dimensional structure of low density lipoproteins by electron cryomicroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, p. 8420-8425, 1999.
- [97] P. A. Kroon, "Fluorescence Study of the Motional States of Core and Surface Lipids in Native and Reconstituted Low Density Lipoproteins," *Biochemistry*, vol. 33, pp. 4879-4884, 1994.
- [98] P. A. Kroon, "The Order-Disorder Transition of the Core Cholesteryl Esters of Human Plasma Low Density Lipoprotein - A PROTON NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE STUDY," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, pp. 532-5339, 1981.
- [99] D. Steinberg, "The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update," *J. Lipid. Research*, vol. 50, p. 376-381, 2009.
- [100] H. Yoshida e R. Kisugi, "Mechanisms of LDL oxidation," *Clinica Chimica Acta*, vol. 411, n. 23-24, pp. 1875-1882, 2010.
- [101] J. A. Leopold e J. Loscalzo, "Oxidative risk for atherothrombotic cardiovascular disease," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 47, p. 1673-1706, 2009.
- [102] R. Stocker e J. F. J. Keaney, "Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis," *Physiol Rev*, vol. 84, p. 1381-1478, 2004.
- [103] I. Yekini, F. Hammoudi, F. Martin-Nizard, S. Yous, N. Lebegue, P. Berthelot e P. Carato, "Antioxidant activity of benzoxazolinonic and benzothiazolinonic derivatives in the LDLoxidation model," vol. 17, n. 12, pp. 7823-7830, 2009.
- [104] A. F. d. Bem, M. Farina, R. d. L. Portella, C. W. Nogueira, T. C. Dinis, J. A. Laranjinha, L. M. Almeida e J. B. T. Rocha, "Diphenyl diselenide, a simple glutathione peroxidase mimetic, inhibits human LDL oxidation in vitro," *Atherosclerosis*, vol. 201, n. 1, pp. 92-100, 2008.
- [105] M. A. Dubick, G. C. Hunter, S. M. Casey e C. L. Keen, "Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease," *Proc. Soci. Exp. Biol. Medicine*, vol. 184, pp. 138-143, 1987.
- [106] C. Smith, M. J. Mitchinson, O. I. Aruoma e B. Halliwell, "Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions," *Biochem J.*, vol.

286, p. 901–905, 1992.

- [107] J. A. Berliner e J. W. Heinecke, “The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis.,” *Free Radic. Biol. Med.* , vol. 20, pp. 707-727, 1996.
- [108] G. A. Ferns, D. J. Lamb e A. Taylor, “The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus,” *Atherosclerosis*, vol. 133, p. 139–152, 1997.
- [109] P. M. Abuja, R. Albertini e H. Esterbauer, “Simulation of the induction of oxidation of low-density lipoprotein by high copper concentrations: evidence for a nonconstant rate of initiation,” *Chem. Res. Toxicol*, vol. 10, pp. 644-651, 1997.
- [110] É. S. Lima e D. S. P. Abdalla, “Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 37, pp. 293-303, 2001.
- [111] D. R. Janero, “Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 9, p. 515–540, 1990.
- [112] M. F. Nepomuceno, A. Alonso, L. Pereira-da-Silva e M. Tabak, “Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria,” *Free Radic Biol Med.* , vol. 23, pp. 1046-1054, 1997.
- [113] H. Sies, “Strategies of antioxidant defense,” *Eur. J. Biochem.* , vol. 215, pp. 213-219, 1993.
- [114] M. d. L. P. Bianchi e L. M. G. Antunes, “Free radicals and the main dietary antioxidants,” *Rev. Nutr. [online].*, vol. 12, pp. 123-130, 1999.
- [115] P. K. J. P. D. Wanasundara e F. Shahidi, “Antioxidants: Science, Technology, and Applications,” em *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, vol. 6, F. Shahidi, Ed., New York, John Wiley & Sons, 2005, pp. 431-441.
- [116] G. Vendemiale, I. Grattagliano e E. Altomare, “An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease,” *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, vol. 29, pp. 49-55, 1999.
- [117] R. J. Williams, J. P. E. Spencer e C. Rice-Evans, “Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 36, p. 838–849, 2004.
- [118] P. Mladěnka, L. Zatloukalová, T. Filipický e R. Hrdina, “Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity,” *Free Radical Biology & Medicine* , vol. 49, p. 963–975, 2010.
- [119] M. M. Silva, M. R. Santos, G. Caroco, R. Rocha, G. Justino e L. Mira, “Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination,” *Free Radical Research* , vol. 36, pp. 1219-

1227, 2002.

- [120] Q. Guo, B. Zhao, M. Li, S. Shen e W. Xin, "Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1304, p. 210–222, 1996.
- [121] M. Kashima, "Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 47, p. 279–283, 1999.
- [122] F. Nanjo, M. Mori, K. Goto e Y. Hara, "Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 63, p. 1621–1623, 1999.
- [123] B. A. Sutherland, R. M. Rahman e I. Appleton, "Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 17, p. 291–306, 2006.
- [124] I. Erlund, "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology," *Nutrition Research*, vol. 24, p. 851–874.
- [125] T. Geetha, V. Malhotra, K. Chopra e I. Kaur, "Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of quercetin," *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 43, p. 61–67, 2005.
- [126] M. JANG, L. CAI, U. O. G., K. V. SLOWING, C. F. THOMAS, C. W. W. BEECHER, H. H. S. FONG, N. R. FARNSWORTH, A. D. KINGHORN, R. G. MEHTA, R. C. MOON e J. M. PEZZUTO, "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes," *Science*, vol. 275, pp. 218–220, 1997.
- [127] B. B. Aggarwa, A. Bhardwaj, R. S. Aggarwal, N. P. Seeram, S. Shishodia e Y. Takada, "Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies," *Anticancer Research*, vol. 24, p. 2783–2840, 2004.
- [128] M. Knutson e C. Leeuwenburgh, "Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases," *Nutrition Reviews*, vol. 66, p. 591–596, 2008.
- [129] C. R. Pace-Asciak, S. Hahn, E. P. Diamandis, G. Soleas e D. M. Goldberg, "The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease," *Clinica Chimica Acta*, vol. 235, pp. 207–219, 1995.
- [130] L. Belguendouz, L. Frémont e M. T. Gozzelino, "Interaction of trans-resveratrol with plasma lipoproteins," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 55, pp. 811–816, 1998.
- [131] S. Gómez, S. R. A.M. Monteiro, A. Bloise, S. Carneiro, S. Alves, M. Gidlund, D. Abdalla e A. Neto, "Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studied by NMR, TEM and Z-scan technique.," *Chem. Phys. Lipids*, pp. 545–551, Jun 2010.

- [132] A. Alonso, N. C. Meirelles e M. Tabak, "Effect of hydration upon the fluidity of intercellular membranes of stratum corneum: an EPR study," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1237, pp. 6-15, 1995.
- [133] J. Gallego-Nicasio, G. López-Rodríguez, R. Martínez, M. J. Tarancón, M. V. Fraile e P. Carmona, "Structural changes of low density lipoproteins with Cu²⁺ and glucose induced oxidation," *Biopolymers*, vol. 72, pp. 514-520, 2003.
- [134] P. C. Jost, O. H. Griffith, R. A. Capaldi e G. Vanderkooi, "Evidence for boundary lipid in membranes," *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol. 70, pp. 480-484, 1973.
- [135] I. N. Gorshkova, M. Menschikowski e W. Jaross, "Alterations in the physicochemical characteristics of low and high density lipoproteins after lipolysis with phospholipase A₂. A spin-label study," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1300, pp. 103-113, 1996.
- [136] M. Pregetter, R. Prassl, B. Schuster, M. Kriechbaum, F. Nigon, J. Chapman e P. Laggner, "Microphase Separation in Low Density Lipoproteins," *J Biol Chem*, vol. 274, n. 3, pp. 1334-1341, 1999.
- [137] H. Murphy, M. Ala-Korpela, J. White, A. Raoof, J. Bell, M. Barnard, S. Burns e R. Iles, "Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 234, pp. 733-737, 1997.
- [138] A. Sommer, E. Prenner, R. Orges, H. Stutz, H. Grillhofer, H. Grillhofer, F. Paltau e a. b. Herrnetter, "Organization of Phosphatidylcholine and Sphingomyelin in the Surface Monolayer of Low Density Lipoprotein and Lipoprotein(a) as Determined by Time-resolved Fluorometry," *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 267, pp. 24217-24222, 1992.
- [139] B. N. Pandey e K. P. Mishra, "Fluorescence and ESR Studies on Membrane Oxidative Damage by Gamma Radiation," *Appl. Magn. Reson.*, vol. 18, pp. 483-492, 2000.
- [140] P. P. B. K. H. K. W. S. S. K. a. C. C. R. K K Eichenberger, "Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain," *FEBS Letters*, vol. 142, pp. 59-62, 1982.
- [141] Bruch, R. C. e W. S. Thayer, "Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes," *Biochim Biophys Acta*, vol. 733, pp. 216-222, 1983.
- [142] J. C. Cheng, J. G. Fang, W. F. Chen, B. Zhou, L. Yang e Z. L. Liu, "Structure-activity relationship studies of resveratrol and its analogues by the reaction kinetics of low density lipoprotein peroxidation," *Bioorganic Chemistry*, vol. 34, pp. 142-157, 2006.
- [143] H. Berrougui, G. Grenier, S. Loueda, G. Drouin e A. Khalil, "A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: Inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux," *Atherosclerosis*, vol. 207, p. 420-427, 2009.

- [144] A. Roland, R. A. Patterson e D. S. Leake, "Measurement of Copper-Binding Sites on Low Density Lipoprotein," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, pp. 594-602, 2001.
- [145] L. Frémont, L. Belguendouz e S. Delpal, "Antioxidant Activity of Resveratrol and Alcohol-Free Wine Polyphenols Related to LDL Oxidation and Polyunsaturated Fatty Acids," *Life Sciences*, vol. 64, pp. 2511-2521, 1999.
- [146] M. Reed, H. Fujiwara e D. C. Thompson, "Comparative metabolism, covalent binding and toxicity of BHT congeners in rat liver slices," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 138, p. 155–170, 2001.
- [147] J. L. V. Anjos e A. Alonso, "Terpenes increase the partitioning and molecular dynamics of an amphipathic spin label in stratum corneum membranes," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 350, p. 103–112, 2008.
- [148] W. Queiros, D. Neto e A. Alonso, "Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum," *J. Control. Release*, vol. 106, p. 374–385, 2005.
- [149] H. S. Camargos, A. H. M. Silva, J. L. V. Anjos e A. Alonso, "Molecular Dynamics and Partitioning of Di-tert-butyl Nitroxide in Stratum Corneum Membranes: Effect of Terpenes," *LIPIDS*, vol. 45, n. 5, pp. 419-427, 2010.
- [150] P. Ramos, S. P. Gieseg, B. Schuster e H. Esterbauer, "Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein.," *J Lipid Res.*, vol. 36, pp. 2113-2128, 1995.
- [151] M. O. Pentikäinen, E. M. P. Lehtonen e P. T. Kovanen, "Aggregation and fusion of modified low density lipoprotein," *Journal of Lipid Research*, vol. 37, pp. 2638-2649, 1996.
- [152] K. Öörni, M. O. Pentikäinen, M. Ala-Korpela e P. T. Kovane, "Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions," *Journal Lipid Research*, vol. 41, pp. 1703-1714, 2000.
- [153] A. B. Gerry, L. Satchell e D. S. Leake, "A novel method for production of lipid hydroperoxide- or oxysterol-rich low-density lipoprotein," *Atherosclerosis*, vol. 197, p. 579–587, 2008.
- [154] B. Dzikovski, "An introduction to Electron Spin Resonance," Novembro 2007. [Online]. Available: http://www.acert.cornell.edu/PPTs/ESR_Basics_2_2007.ppt. [Acesso em 15 Novembro 2011].

Apêndice

A. Trabalhos Desenvolvidos Durante o Doutorado

Durante os quatro anos de doutorado (2008-2012) desenvolvemos alguns trabalhos que não foram descritos no texto desta tese, e que resultaram em publicações em revistas de divulgação internacional. Embora estes estudos tenham sido realizados em colaboração com outros alunos do grupo, tive uma significativa participação tanto no processo de aquisição de dados quanto do processo de confecção dos artigos. Por este motivo, estes trabalhos serão descritos a seguir na ordem em que foram realizados. Além disso, também é apresentado o trabalho resultante dos estudos descritos na primeira parte desta tese (Artigo I).

Durante o primeiro ano do meu doutorado desenvolvemos toda etapa experimental de um estudo relacionado ao efeito de diferentes tipos de terpenos (aumentadoras da permeação da pele) sobre as membranas e proteínas do estrato córneo, usando a técnica de marcadores de spin e a RPE, resultado do desmembramento dos trabalhos desenvolvidos durante meu mestrado. Este trabalho foi publicado em 2010 na revista *Lipids* (Artigo II) e compôs a dissertação de mestrado do aluno Heverton S. Camargos. Em colaboração com o aluno Sebastião A. M. Neto, iniciamos estudos relacionados a uma nova linha de pesquisa em nosso laboratório: Efeitos do estresse oxidativo em membranas de eritrócitos, lipossomas, proteínas e efeito antioxidante de compostos naturais avaliados por RPE. A implementação da metodologia experimental e a coleta dos dados foram realizadas durante todo o ano de 2009. Os resultados deste estudo fizeram parte da dissertação de mestrado do aluno Sebastião e resultaram em um artigo publicado este ano (Artigo III). A prática adquirida com os trabalhos relacionados aos efeitos dos terpenos e os estudos com células de eritrócitos foram importantes para iniciarmos um novo estudo usando a técnica de RPE relacionado aos efeitos de oito diferentes terpenos em células de hemácias e fibroblastos, visando obter informações acerca da citotoxicidade dessas moléculas, o que é de grande importância na caracterização de compostos cuja finalidade seja a aplicação na pele. Iniciamos este trabalho no ano de 2010, o qual foi realizado em colaboração com o grupo do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFG (FF-UFG). Minha participação se deu desde o início da etapa experimental envolvendo estudos com a

RPE até a confecção do artigo. Neste momento este trabalho encontra-se aceito para publicação na revista *Toxicology in Vitro* (Trabalho IV).

Além dos estudos mencionados acima, outro trabalho foi realizado por mim, sob supervisão do Prof. Antonio Alonso, em colaboração com o grupo da FF-UFG, coordenado pela Profa. Dra. Eliane Martins Lima. Neste estudo (experimentos realizados em 2011) usamos o método de marcadores de spin e a técnica de RPE, como metodologias comparativas de outras técnicas, para caracterizar e avaliar a estabilidade do 4-Nerolidilcatecol, composto isolado da pariparoba. Este trabalho resultou na dissertação de mestrado da aluna da FF-UFG Marilisa Gaeti e em um artigo que se encontra sob revisão na revista *International Journal of Pharmaceutics* (Trabalho V).

Trabalho I:



On the interaction of bovine serum albumin with ionic surfactants: Temperature induced EPR changes of a maleimide nitroxide reflect local protein dynamics and probe solvent accessibility

Jorge Luiz Vieira Anjos^a, P.S. Santiago^{b,c}, Marcel Tabak^b, Antonio Alonso^{a,*}

^a Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 74001-970, GO, Brazil

^b Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 13560-970, SP, Brazil

^c Campus experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Registro 11900-000, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2011

Received in revised form 6 July 2011

Accepted 8 July 2011

Available online xxx

Keywords:

Bovine serum albumin

EPR

Maleimide spin label

Protein mobility

Surfactant effect

ABSTRACT

The interaction of bovine serum albumin (BSA) with the ionic surfactants sodium dodecylsulfate (SDS, anionic), cetyltrimethylammonium chloride (CTAC, cationic) and N-hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate (HPS, zwitterionic) was studied by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin label covalently bound to the single free thiol group of the protein. EPR spectra simulation allows to monitor the protein dynamics at the labeling site and to estimate the changes in standard Gibbs free energy, enthalpy and entropy for transferring the nitroxide side chain from the more motionally restricted to the less restricted component. Whereas SDS and CTAC showed similar increases in the dynamics of the protein backbone for all measured concentrations, HPS presented a smaller effect at concentrations above 1.5 mM. At 10 mM of surfactants and 0.15 mM BSA, the standard Gibbs free energy change was consistent with protein backbone conformations more expanded and exposed to the solvent as compared to the native protein, but with a less pronounced effect for HPS. In the presence of the surfactants, the enthalpy change, related to the energy required to dissociate the nitroxide side chain from the protein, was greater, suggesting a lower water activity. The nitroxide side chain also detected a higher viscosity environment in the vicinity of the paramagnetic probe induced by the addition of the surfactants. The results suggest that the surfactant–BSA interaction, at higher surfactant concentration, is affected by the affinities of the surfactant to its own micelles and micelle-like aggregates. Complementary DLS data suggests that the temperature induced changes monitored by the nitroxide probe reflects local changes in the vicinity of the single thiol group of Cys-34 BSA residue.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Trabalho II:

Lipids (2010) 45:419–427
 DOI 10.1007/s11745-010-3407-2

ORIGINAL ARTICLE

Molecular Dynamics and Partitioning of Di-*tert*-butyl Nitroxide in Stratum Corneum Membranes: Effect of Terpenes

Heverton Silva Camargos · Adolfo Henrique Moraes Silva ·
 Jorge Luiz Vieira Anjos · Antonio Alonso

Received: 26 October 2009 / Accepted: 8 March 2010 / Published online: 2 April 2010
 © AOCs 2010

Abstract In this work, we have used electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the small spin label di-*tert*-butyl nitroxide (DTBN), which partitions the aqueous and hydrocarbon phases, to study the interaction of the terpenes α -terpineol, 1,8-cineole, 1(-)-carvone and (+)-limonene with the uppermost skin layer, the stratum corneum, and the membrane models of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) and 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC). The EPR spectra indicated that the terpenes increase both the partition coefficient and the rotational correlation time of the spin labels in the stratum corneum membranes, whereas similar effects were observed in the DMPC and DPPC bilayers only at temperatures below the liquid-crystalline phase. The EPR parameter associated to probe polarity inside the membranes showed thermotropically induced changes, suggesting relocations of spin probe, which were dependent on the membrane phases. While the DMPC and DPPC bilayers showed abrupt changes in the partitioning and rotational correlation time parameters in the phase transitions, the SC membranes were characterized by slight changes in the total range of measured temperatures, presenting the greatest changes or membranes reorganizations in the temperature range of ~ 50 to ~ 74 °C. The results suggest that terpenes act as spacers, weakening the hydrogen-bonded network at the polar interface and thus fluidizing the stratum corneum lipids.

Keywords Stratum corneum · EPR · Spin label · Lipid dynamics · Terpene

Abbreviations

SC	Stratum corneum
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholine
DTBN	Di- <i>tert</i> -butyl nitroxide
EPR	Electron paramagnetic resonance

Introduction

The major limitation of implementing transdermal drug delivery systems is the generally low permeability of the drug across the skin. Several approaches have been implemented to facilitate drug transport through the skin. One important approach is the use of chemical penetration enhancers, which ideally reduce the resistance of the physical barrier of the SC safely and reversibly to enhance the drug's delivery through the skin. In particular, terpenes have been reported as permeation enhancers of several polar and non-polar drugs and many terpenes, including 1,8-cineole, menthol and α -terpineol, are claimed to be generally recognized as safe (GRAS)

Trabalho III:

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2012) 45: 473-481
ISSN 0100-879X

Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide

S.A. Mendanha, J.L.V. Anjos, A.H.M. Silva and A. Alonso

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

Abstract

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of spin labels was used to monitor membrane dynamic changes in erythrocytes subjected to oxidative stress with hydrogen peroxide (H_2O_2). The lipid spin label, 5-doxy stearic acid, responded to dramatic reductions in membrane fluidity, which was correlated with increases in the protein content of the membrane. Membrane rigidity, associated with the binding of hemoglobin (Hb) to the erythrocyte membrane, was also indicated by a spin-labeled maleimide, 5-MSL, covalently bound to the sulfhydryl groups of membrane proteins. At 2% hematocrit, these alterations in membrane occurred at very low concentrations of H_2O_2 (50 μM) after only 5 min of incubation at 37°C in azide phosphate buffer, pH 7.4. Lipid peroxidation, suggested by oxidative hemolysis and malondialdehyde formation, started at 300 μM H_2O_2 (for incubation of 3 h), which is a concentration about six times higher than those detected with the probes. Ascorbic acid and α -tocopherol protected the membrane against lipoperoxidation, but did not prevent the binding of proteins to the erythrocyte membrane. Moreover, the antioxidant (+)-catechin, which also failed to prevent the cross-linking of cytoskeletal proteins with Hb, was very effective in protecting erythrocyte ghosts from lipid peroxidation induced by the Fenton reaction. This study also showed that EPR spectroscopy can be useful to assess the molecular dynamics of red blood cell membranes in both the lipid and protein domains and examine oxidation processes in a system that is so vulnerable to oxidation.

Key words: Electron paramagnetic resonance; Spin label; Erythrocyte; Membrane fluidity; Membrane oxidation; Protein oxidation

Trabalho IV (Aceito na *Toxicology in Vitro*):**Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity**

Sebastião A. Mendanha,¹ Soraia S. Moura,² Jorge L.V. Anjos,¹ Marize C. Valadares,² Antonio Alonso^{1*}

¹ *Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil*

² *Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular – FARMATEC, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.*

Keywords: EPR; spin label; toxicity; fibroblast; terpenes; erythrocyte membrane

Abbreviations: EPR, electron paramagnetic resonance; 5-DSA, 5-doxyol stearic acid

*Corresponding author: Fax: +55 62 3521 1014; E-mail: alonso@if.ufg.br (A. Alonso)

Abstract

Terpenes are considered potent skin permeation enhancers with low toxicity. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the spin label 5-doxyol stearic acid (5-DSA) was used to monitor the effect of sesquiterpene nerolidol and various monoterpenes on erythrocyte membrane fluidity. In addition, the hemolytic levels and cytotoxic effects on cultured fibroblast cells were also measured to investigate possible relationships between the cellular irritation potentials of terpenes and the ability to modify membrane fluidity. All terpenes increased the fluidity of the erythrocyte membrane with no significant differences between the monoterpenes, but the effect of sesquiterpene was significantly greater than that of the monoterpenes. The IC₅₀ values for the terpenes in the cytotoxicity assay were observed according to the following relationship: 1,8-cineole > (+)-limonene > L-menthone > DL-menthol > pulegone > L(-)-carvone > α-terpineol > nerolidol. The correlation between the hemolytic effect and the IC₅₀ values for fibroblast viability was low (R = 0.59); however, nerolidol was the most aggressive, while limonene and cineole showed the lowest levels of aggression in both tests. Obtaining information concerning the toxicity and potency of terpenes could aid in the design of topical formulations optimized to facilitate drug absorption for the treatment of many skin diseases.