

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/283082668>

Influência da incorporação de ácido α - eleostearico, purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica molecular de lipossomos / The influence of the incorporation of purified and...

Thesis · August 2013

DOI: 10.13140/RG.2.1.1217.8648

READS

12

1 author:



[Robson Simplicio de Sousa](#)

Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

9 PUBLICATIONS 3 CITATIONS

SEE PROFILE



FURG

Dissertação de Mestrado

**Influência da incorporação de ácido α -eleostearico,
purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica
molecular de lipossomos**

Robson Simplicio de Sousa

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2013

**A influência da incorporação de ácido α -eleosteárico,
purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica
molecular de lipossomos**

por

ROBSON SIMPLICIO DE SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Rio Grande, RS - Brasil

2013

Universidade Federal do Rio Grande
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**A influência da incorporação de ácido α -eleosteárico,
purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica
molecular de lipossomos**

elaborada por

ROBSON SIMPLICIO DE SOUSA

Como requisito parcial para a obtenção do título de

Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Rosilene Maria Clementin (FURG - RS)

Prof. Dr. Vânia Rodrigues de Lima (FURG - RS)

Prof. Dr. Cristiana Lima Dora (FURG - RS)

Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag (UFPEl - RS)

Rio Grande, 30 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Um muito obrigado as minhas orientadoras, Prof. Dra. Rosilene Maria Clementin e Prof. Dra. Vânia Rodrigues de Lima. Rosi e Vânia.

Eu costumo dizer que meu ingresso na engenharia química serviu para que eu conhecesse a Rosi e me admirasse pela profissional que ela é. Eu queria ter acesso a um pouquinho do conhecimento que a Rosi tem em química orgânica e, por isso, pedi que me orientasse no mestrado. Mesmo com todas as atribuições e dificuldades de horário, ela sempre dava um jeito de me atender, mesmo quando não podia! Levo comigo as aprendizagens em Química Orgânica e sei que sempre que precisar, ela irá me ajudar. Rosi, muito obrigado pelo apoio.

À Vânia, minha eterna gratidão. Sem ela este mestrado teria sido muito mais difícil do que foi. Conversas, desabafos, anseios, angústias. Em todos os momentos ela sempre teve uma palavra para confortar e acalmar. Um exemplo de profissional que muito mais do que me ensinar sobre a dinâmica em lipossomos, ensinou-me que qualidades devem existir em um bom orientador. Vânia, não tenho como descrever o quanto fostes importante para que esse trabalho acontecesse. Mais do que uma orientadora, levo uma amiga para a vida.

À minha terceira orientadora, Cássia Fagundes, pela enorme ajuda que me deu no início do mestrado.

Aos meus professores do PPGQTA, Prof. Dr. Marcelo D'Oca, Prof. Dra. Luciana Piovesan e Prof. Dr. Joaquín Villarreyes pelos ensinamentos.

Muito obrigado a minha família que, mesmo longe, torce por mim em todos os momentos.

Um obrigado ao meu companheiro, Julião Freitas Martinez, por aturar chateações nos momentos de tensão desse mestrado e por ser meu conforto quando chego em casa. Por ser compreensivo e tentar lidar da melhor forma possível com minha ausência em função do mestrado e do trabalho. Obrigado por tudo. Eu te amo.

Um muito obrigado as minhas amigas de mestrado que vieram da UFPel comigo, Vanda Artifon Pereira e Juliana Maciel. Mais uma etapa vencida, gurias! Adoro muito vocês!

Um muito obrigado aos amigos de mestrado que fiz na FURG: Caroline Ruas, Katlen Tribuzy, Viviane Duarte, Valéria Cavalheiro, Renata Rodrigues. Obrigado pelas risadas, desabafos e por tornar essa caminhada muito mais leve. Certamente levo essas amizades para toda a vida.

Um obrigado ao Grupo de Investigação de Interações Moleculares em Membranas (GIIMM), especialmente à Carla Azambuja e à Marisa Rodrigues. Adoro vocês!

Obrigado aos meus queridos alunos de iniciação científica Viviane Gobel Marques, Alessandro Moraes, Luiza Pereira e Juliana Fernandes que não mediram esforços para que este trabalho acontecesse. Este trabalho é de vocês também.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas sabem que estão no meu coração.

Obrigado ao LACOM pelas análises cromatográficas e à Prof. Dra. Daniela Bianchini (UFPel) pelas análises de DSC.

À Prof. Dra. Irene Santos Garcia (UFRGS) pelas análises de RMN e também por ser uma inspiração como profissional, como professora e como amiga. Obrigado, Irene.

A minha banca de qualificação e defesa Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores, Prof. Dra. Cristiana Lima Dora e Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag pelas enormes contribuições ao trabalho.

Obrigado à CAPES pela bolsa e à FURG/PPGQTA pela oportunidade de realizar o mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE EQUAÇÕES	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE DE LIPOSSOMOS	28
3.1.1. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	28
3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	31
3.1.3. Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)	33
3.1.4. Espectroscopia de UV-visível (UV-Vis).....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Reagentes, materiais e equipamentos	36
4.2. Métodos	37
4.2.1. Purificação e caracterização do α-ESA.....	37
4.2.2. Preparação de lipossomos contendo fosfatidilcolinas	41
4.2.2.1. Incorporação de α -ESA nos lipossomos	42
4.2.2.2. Ensaio de peroxidação lipídica nas membranas	42
4.2.2.3. Medidas de FTIR em membranas	45
4.2.2.4. Medidas de RMN.....	46
4.2.2.5. Ensaio de DSC	46
4.2.2.6. Ensaio de turbidez	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Ensaio de purificação do α-ESA	47

5.2. Efeitos de α -ESA na peroxidação lipídica de lipossomos contendo fosfatidilcolina	57
5.4. Interação do α -ESA com a cabeça polar da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO	61
5.5. Influência do α -ESA na região de interface da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO	64
5.6. Efeitos do α -ESA nos metilenos da cadeia acil de fosfatidilcolina presentes em lipossomos de ASO	67
5.7. Medidas de Turbidez	70
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de óleo de tungue (<i>Aleurites fordii</i>).....	20
Figura 2. Representação do ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienóico ou ácido α -eleosteárico (α -ESA).	21
Figura 3. Energias de dissociação das ligações C-H para hidrogênios bis-alílicos, alílicos e alquil de cadeias hidrocarbonetos (WAGNER et al., 1994).....	22
Figura 4. Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados. 1: abstração de H da cadeia poli-insaturada de lipídios de membrana; 2: formação de radical peroxil; 3: formação da segunda espécie radical centrada no carbono; 4: formação de endoperóxidos. Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2000).	24
Figura 5. Representação estrutural e esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina.	26
Figura 6. Esquema de vesículas multilamelares grandes (MLV, esquerda), vesículas unilamelares grandes (LUV, meio) e vesículas unilamelares pequenas (SUV, direita). 27	27
Figura 7. Representação esquemática da relação entre tempo de relaxação longitudinal (T_1) e o tempo de correlação (τ_c) (DUFOURC, 2006).....	33
Figura 8. Estruturas dos componentes majoritários da asolecitina de soja (ASO). (a) fosfatidilcolina; (b) fosfatidilinositol fosfato; (c) fosfatidiletanolamina. Em vermelho, a cabeça polar; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas dos lipídios.....	35
Figura 9. Etapas para obtenção do ácido α -eleosteárico (α -ESA).	38
Figura 10. Precipitação dos ácidos graxos livres a partir da solução dos sais de ácidos através da acidificação do meio.	39
Figura 11. Reação genérica de derivatização de ácido carboxílico de cadeia R realizada utilizando BF_3/CH_3OH	40
Figura 12. Esquema de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLV) pelo método de hidratação de vesículas.....	42
Figura 13. Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea.....	43
Figura 14. Saponificação do óleo de tungue.	47
Figura 15. Sólido obtido na purificação.	48
Figura 16. Espectro de infravermelho obtido para o ácido α -eleosteárico.....	50
Figura 17. Cromatograma obtido a partir da purificação da amostra com acetona.	51
Figura 18. Cromatograma obtido a partir da purificação da amostra com EtOH/água (9:1).....	53
Figura 19. Espectro de massas obtido para o metil éster do ácido α -eleosteárico (α -ESA).....	54
Figura 20. Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H do ácido α -eleosteárico (α -ESA).	55
Figura 21. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do ácido α -eleosteárico (α -ESA).	56

Figura 22. Variação da peroxidação lipídica total induzida por radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) em função do aumento das concentrações de ácido α -eleostéarico (α -ESA) incorporados em lipossomos de asolecitina (ASO). Os resultados foram obtidos pelo método de TBARS.	57
Figura 23. Espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presentes em lipossomos de asolecitina (ASO) puros e na presença de 30 mg/mL de ácido α -eleostéarico (α -ESA), equivalente a uma proporção α -ESA:ASO de 0,2 (m,m).....	60
Figura 24. Ampliação dos espectros de FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de asolecitina (ASO) puros e na presença de ácido α -eleostéarico (α -ESA) 30 mg/mL (o espectro completo está representado na Figura 23) na região do estiramento axial assimétrico do PO_2^-	62
Figura 25. Tempo de relaxação longitudinal (T_1) de ^1H da colina na ausência (PC, quadrados abertos) e na presença de 30 mg/mL de ácido α -eleostéarico (α -ESA:PC = 0,2, m/m, círculos abertos). Os dados de ^1H T_1 foram alcançados a 60 MHz, a 23 °C, utilizando um intervalo de tempo de correlação (τ_c) de 0,2-102,4 s.	64
Figura 26. Variações da largura de banda do estiramento C=O da fosfatidilcolina presente em lipossomos de asolecitina (ASO) após interação com diferentes concentrações de ácido α -eleostéarico (α -ESA).	66
Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de ácido α -eleostéarico (α -ESA) sobre as larguras de banda do ν_s CH_2 de fosfatidilcolina de soja.	67
Figura 28. Medidas de DSC para lipossomos de asolecitina (ASO) com e sem ácido α -eleostéarico (α -ESA) incorporado (α -ESA:ASO).	69
Figura 29. Mudanças de turbidez para lipossomos de asolecitina (ASO) após a interação com diferentes concentrações de ácido α -eleostéarico (α -ESA). Os valores de densidade óptica foram obtidos a 400 nm em um espectrofotômetro de UV-visível.	71
Figura 30. Representação do efeito promovido pelo ácido α -eleostéarico (α -ESA) em lipossomos de asolecitina de soja (ASO).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados obtidos na análise cromatográfica da amostra de ácido α -eleosteárico (α -ESA), purificada em acetona.	52
Tabela 2. Dados obtidos na análise cromatográfica da amostra de ácido α -eleosteárico (α -ESA), purificada em etanol/água.	53
Tabela 3. Influência do ácido α -eleosteárico (α -ESA) nos valores de variação de entalpia (ΔH) da fosfatidilcolina de soja (ASO).....	69

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Redução do ferro.	43
Equação 2. Reação de Fenton.	43
Equação 3. Reação de Haber-Weiss.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASO, asolecitina de soja.

DSC, calorimetria de varredura diferencial, do inglês *differential scanning calorimetry*.

ETC, cadeia de transporte de elétron, do inglês *electron transport chain*.

FTIR, infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*.

GC-MS, cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography-mass spectroscopy*.

HATR, refletância total atenuada horizontal, do inglês *Horizontal Attenuated Total Reflectance*

LUV, vesículas unilamelares grandes, do inglês *large unilamellar vesicles*.

MDA, malonildialdeído.

MLV, vesículas multilamelares grandes, do inglês *multilamellar large vesicles*.

RMN, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, do inglês *nuclear magnetic resonance*.

SUV, vesículas unilamelares pequenas, do inglês *small unilamellar vesicles*.

T₁, tempo de relaxação longitudinal.

TBA, ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid*.

TBARS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*.

T_m, temperatura de transição de fase.

UV-Vis, espectroscopia no ultravioleta visível, do inglês *ultraviolet-visible spectroscopy*

α-ESA, ácido α-eleostearico, do inglês *α-eleostearic acid*.

ΔH, variação de entalpia.

ϵ , coeficiente de absorvidade molar.

τ_c , tempo de correlação.

ω_0 , frequência da banda de ressonância.

RESUMO

Título: A influência da incorporação de ácido α -eleosteárico, purificado e isolado do óleo de tungue, na dinâmica molecular de lipossomos

Autor: Robson Simplicio de Sousa

Orientadora: Profa. Dra. Rosilene Maria Clementin

Coorientadora: Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima

Este trabalho descreve o isolamento e purificação do ácido α -eleosteárico (α -ESA) a partir do óleo de tungue e sua caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . O α -ESA apresenta atividades biológicas (antitumorais, anti-inflamatórias e antioxidantes), tornando-se importante compreender sua interação com membranas lipídicas. Assim, este trabalho também descreve resultados referentes ao efeito da incorporação de α -ESA na dinâmica molecular de lipossomos compostos por fosfatidilcolina. O sistema lipossomal puro e contendo α -ESA foi caracterizado através do uso de espectroscopia de UV-visível, FTIR, RMN e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Como resultados da purificação do α -ESA, obtivemos uma pureza de 95,9% utilizando acetona como solvente de recristalização em detrimento dos 92,2% em solução etanólica. Na incorporação em lipossomos, observou-se uma maior interação do α -ESA com a parte polar, de interface e os primeiros metilenos da região apolar da fosfatidilcolina. Além disso, α -ESA apresentou um efeito de redução da fluidez de lipossomos. Os resultados contribuem para a geração de conhecimento para o desenvolvimento de novos sistemas farmacológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido α -eleosteárico, lipossomos, fosfatidilcolina, FTIR, DSC, RMN.

ABSTRACT

Title: The influence of the incorporation of purified and isolated α -eleostearic acid from tung oil on the molecular dynamics of liposomes

Author: Robson Simplicio de Sousa

Advisors: Prof. Dr. Rosilene Maria Clementin and Prof. Dr. Vânia Rodrigues de Lima

This work reports the isolation and purification of α -eleostearic acid (α -ESA) from tung oil. The α -ESA obtained was characterized by Fourier-transform infrared (FTIR), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR). α -ESA has biological activities, such as anti-tumoral, anti-inflammatory and antioxidants ones, so it is important to understand its intermolecular interaction with lipid membranes. In this way, this work also shows results concerning the α -ESA effects on the molecular dynamics of phosphatidylcholine-based liposomes. These results were obtained by UV-visible spectroscopy, FTIR, NMR and differential scanning calorimetry (DSC) techniques. About α -ESA purification, we obtained a purity of 95.9% using acetone as recrystallization solvent against 92.5% when crystallized with an ethanolic solution. In the incorporation in liposomes, we observed greater interaction of α -ESA with phosphatidylcholine polar head region. In addition, α -ESA had the effect of reducing the fluidity of liposomes. The responses reported in this work may contribute to a better understanding of α -ESA mechanisms of action, as well as with knowledge for the development of new pharmacological systems.

KEYWORDS: α -Eleostearic acid, liposomes, phosphatidylcholine, FTIR, DSC, RMN.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos com sistema trieno conjugado têm sido encontrados em um grande número de diferentes espécies de plantas. Eles são encontrados em óleos de sementes como as que incluem ácidos 9Z,11E,13Z e 9E,11E,13Z-octadecatrienoicos (ácidos punícico e catalpico, respectivamente). O primeiro é encontrado no óleo de semente de romã e o segundo de *Catalpa ovata*. Contudo, o ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienóico (α -eleosteárico) é o mais conhecido, tendo o óleo de tungue como sua principal fonte de obtenção (CHRISTIE, 2011).

O ácido α -eleosteárico (α -ESA, ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienoico) é um ácido graxo conjugado que pode ser obtido a partir das sementes das plantas *Aleurites fordii*. As metodologias para purificação do α -ESA são muito caras, como a que emprega HPLC-Ag⁺ (YANG et al., 2009) que se baseia em uma propriedade dos compostos orgânicos insaturados que podem se complexar com metais de transição como a prata. Os complexos são do tipo de transferência de carga, isto é, o composto insaturado atua como doador de elétrons e os íons na prata como receptores de elétrons (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2009). Além disso, quando as metodologias são consideradas alternativas, elas não apresentam clareza em relação aos procedimentos e caracterizações (THOMAS e THOMSON, 1934; BROWN, 1941).

Estruturalmente, α -ESA possui um sistema de conjugação π que está associado com o processo de peroxidação lipídica e pode ser responsável por atividades pró-oxidantes ou antioxidantes. O α -ESA mostrou um efeito supressor seletivo e considerável sobre o crescimento tumoral através da indução de apoptose através da promoção da peroxidação de lipídios em membranas (TSUZUKI et al., 2004a; MOON al

et., 2010). Por outro lado, o α -ESA pode reduzir os níveis de peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo no plasma, lipoproteínas e eritrócitos de membrana (DHAR et al., 1999). Sabe-se que a peroxidação lipídica está relacionada com alterações significativas nas membranas. No entanto, os efeitos do α -ESA nas propriedades físico-químicas de membranas não foram completamente elucidados.

O estudo das propriedades físico-químicas das membranas celulares é difícil, devido suas estruturas complexas (ENGBERTS, HOEKSTRA, 1995). Contudo, a influência do α -ESA na dinâmica molecular da membrana pode ser investigada por modelos de menor complexidade como lipossomos, que são adequados para estudos *in vitro* de estrutura e propriedades. Sistemas lipossomais facilitam o controle da composição fosfolipídica, da estrutura e da dinâmica (SAMUNI, LIPMAN E BARENHOLZ, 2000; CASTELLI, 1997). Neste estudo, o efeito da α -ESA na peroxidação *in vitro* induzida com o radical hidroxil (OH^\bullet) em lipossomos de asolecitina de soja (ASO) foi estudado e correlacionado com a influência do ácido graxo sobre a dinâmica da membrana. A composição dos fosfolipídios de ASO inclui fosfatidilcolina de soja (SPC) como um componente importante, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol.

Dessa forma, a primeira parte deste trabalho objetivou adaptar uma metodologia para o isolamento e a purificação e do α -ESA. A segunda parte buscou incorporar o α -ESA purificado nas membranas e estudar o efeito das interações deste nas propriedades das mesmas em seus efeitos na fluidez e, conseqüentemente, sobre o processo de peroxidação lipídica.

A dinâmica molecular da membrana foi investigada utilizando modelos tais como os lipossomos, os quais são adequados para estudos *in vitro* e das propriedades da membrana. A influência do α -ESA nas propriedades dinâmicas de lipossomos, tais como a hidratação, a mobilidade e da ordem, foi monitorada por infravermelho com transformada de Fourier com reflexão total atenuada horizontal (HATR-FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) e calorimetria de varredura diferencial (DSC), bem como por espectroscopia de UV-visível. Além disso, foi avaliado o efeito do α -ESA na peroxidação *in vitro* em lipossomos de asolecitina de soja (ASO) utilizando o método TBARS – substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi isolar e purificar o α -ESA presente no óleo de tungue, bem como incorporar e caracterizar seus efeitos na dinâmica molecular – grau de hidratação, ordem e mobilidade – de lipossomos compostos fosfatidilcolina, além de avaliar o efeito do α -ESA na peroxidação *in vitro* nestes sistemas lipossomais.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e purificar o α -ESA presente no óleo de tungue através da reação de saponificação seguida de cristalização;

- Caracterizar o composto isolado por espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (GC-MS) e ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN);
- Incorporar α -ESA em lipossomos contendo asolecitina de soja (ASO);
- Avaliar a localização preferencial, bem como o efeito do α -ESA no grau de hidratação e ordem da membrana através de análises de FTIR;
- Monitorar o efeito do α -ESA em parâmetros termodinâmicos dos lipossomos pela análise de valores de T_m e ΔH , através de medidas de DSC.
- Monitorar a influência de α -ESA nos valores de T_1 para os núcleos de ^1H presentes na região colina dos lipossomos utilizando RMN.
- Avaliar o efeito do α -ESA na peroxidação *in vitro* de lipossomos contendo asolecitina de soja (ASO).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A árvore de tungue (Figura 1), *Aleurites fordii* (família *Euphorbiaceae*), é nativa da China e o óleo extraído de suas sementes – denominado de óleo de tungue ou óleo de madeira chinês – foi usado por séculos como impermeabilizante de madeira, em tintas vernizes e também por suas propriedades secantes nesses materiais (HOLMES et al., 1954).

A produção de tungue tem se mostrado muito promissora nas regiões de clima temperado como o Rio Grande do Sul, tanto em rendimento de óleo como em custo de

implantação da cultura (KAUTZ et al., 2008). Este fator também favorece a pesquisa envolvendo o óleo de tungue nesta região.



Figura 1. Árvore de óleo de tungue (*Aleurites fordii*).

As sementes de tungue da espécie *Aleurites fordii*, possuem em média 33% de óleo o qual apresenta como constituinte principal (75-80%) o ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienóico, também conhecido por ácido α -eleosteárico (α -ESA, do inglês *α -eleostearic acid*, Figura 2) (KAUTZ, 2010). O α -ESA tem sido pesquisado e aplicado nas indústrias farmacêutica e automobilística, na indústria de tintas e vernizes, na pesquisa com materiais poliméricos e na área bioenergética, dentre outros (KAUTZ et al., 2008; CHAN et al., 1947; LI et al., 2003; WANG et al., 2000; SHANG et al., 2010).

O α -ESA é um ácido graxo com 18 carbonos e cadeia poli-insaturada com três ligações conjugadas respectivamente nos carbonos 9, 11 e 13 (TSUZUKI et al., 2004a).

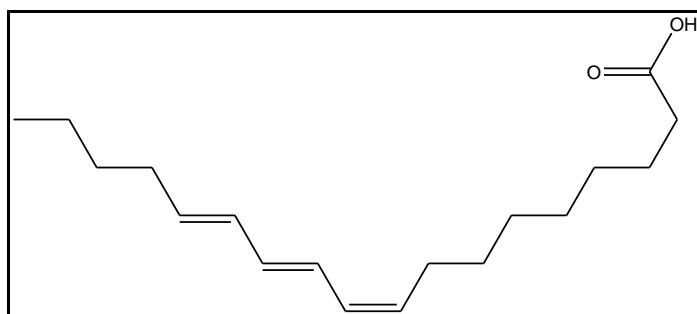


Figura 2. Representação do ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienóico ou ácido α -eleosteárico (α -ESA).

A existência das duplas ligações conjugadas no α -ESA está associada ao efeito farmacológico de supressão tumoral como descrito por Tsuzuki e colaboradores. Neste estudo, o crescimento de células de câncer de cólon transplantadas em ratos foi suprimido por apoptose via peroxidação lipídica, também chamada de lipoperoxidação, pela administração de α -ESA na dieta. Tal supressão ocorre de forma seletiva, pois não apresenta efeito sobre células normais (TSUZUKI et al., 2004b; MOON et al., 2010). Esta atividade foi mais expressiva para o α -ESA, quando comparada a de outros ácidos graxos, tais como o ácido linoleico conjugado e o ácido linolênico conjugado (TSUZUKI et al., 2004b). Por outro lado, α -ESA reduziu os níveis de peroxidação lipídica causados por estresse oxidativo no plasma, lipoproteínas e membranas de eritrócitos em ratos (DHAR et al., 1999).

O estresse oxidativo pode ser definido como uma medida do nível de estado estacionário de espécies reativas de oxigênio em um sistema biológico. O aumento do estresse oxidativo pode resultar em excesso de produção de precursores de radicais de oxigênio reativos e/ou na diminuição da eficácia dos sistemas inibitórios. O estresse pode, então, ser ampliado e propagado em um ciclo autocatalítico de estresse metabólico, causando danos no tecido e morte celular, levando a um aumento simultâneo na produção de radicais livres e comprometendo mecanismos inibitórios que podem aumentar o estresse oxidativo (BAYNES, 1991).

O estresse oxidativo e a lipoperoxidação são processos oxidativos associados a eventos patológicos como diabetes, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida

(AIDS), danos por isquemia e reperfusão, processos inflamatórios crônicos, doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, dentre outros (CASTELLI et al., 1997; YIN, et al., 1998; OHYASHIKI e NUNOMURA, 2000; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; REITER, 1998).

De modo geral, a lipoperoxidação em membranas lipídicas possui três etapas principais: iniciação, propagação e terminação. A iniciação envolve, geralmente, a abstração de um hidrogênio pertencente à cadeia poli-insaturada de lipídios da membrana por uma espécie reativa. Esta abstração de hidrogênio é favorecida energeticamente em hidrogênios metilênicos bis-alílicos (energia de dissociação C-H \approx 75-80 kcal/mol), é inferior à energia envolvendo a dissociação de hidrogênios alílicos (\approx 88 kcal/mol) e alquílicos (\approx 101 kcal/mol) (Figura 3). Assim, os hidrogênios bis-alílicos estão mais susceptíveis à oxidação por possuir uma dissociação mais favorecida energeticamente em relação aos outros tipos de hidrogênios da cadeia (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990).

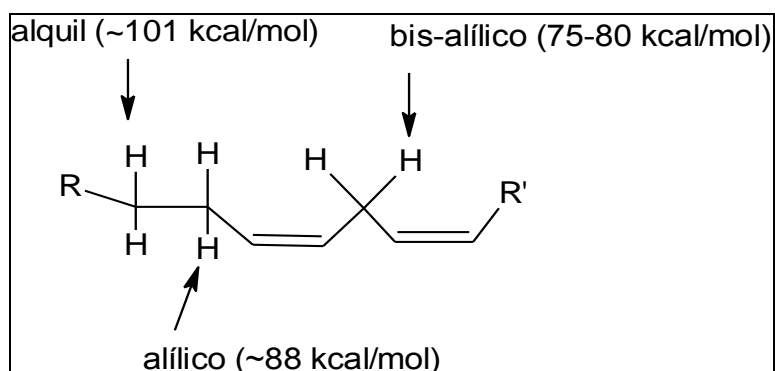


Figura 3. Energias de dissociação das ligações C-H para hidrogênios bis-alílicos, alílicos e alquílicos de cadeias hidrocarbonetos (WAGNER et al., 1994).

Com a abstração do hidrogênio, há a formação de um novo radical que pode interagir com oxigênio molecular para formar um radical peroxil. Este radical lipídico pode retirar um átomo de hidrogênio de um segundo ácido graxo, gerando outro radical no carbono e um radical hidroperóxido. O peroxil pode sofrer ciclização e o produto cíclico pode sofrer rearranjos a endoperóxidos (Figura 4). As reações descritas a partir da formação de radical peroxil caracterizam a etapa de propagação do processo oxidativo. A oxigenação, hidrólise dos endoperóxidos ou o fornecimento de energia via calor para os mesmos são reações que ocorrem na etapa de terminação, gerando produtos como malonildialdeído (MDA) e 4-hidroxicenais (4-HDA) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; WAGNER et al., 1994; KEHRER, 2000).

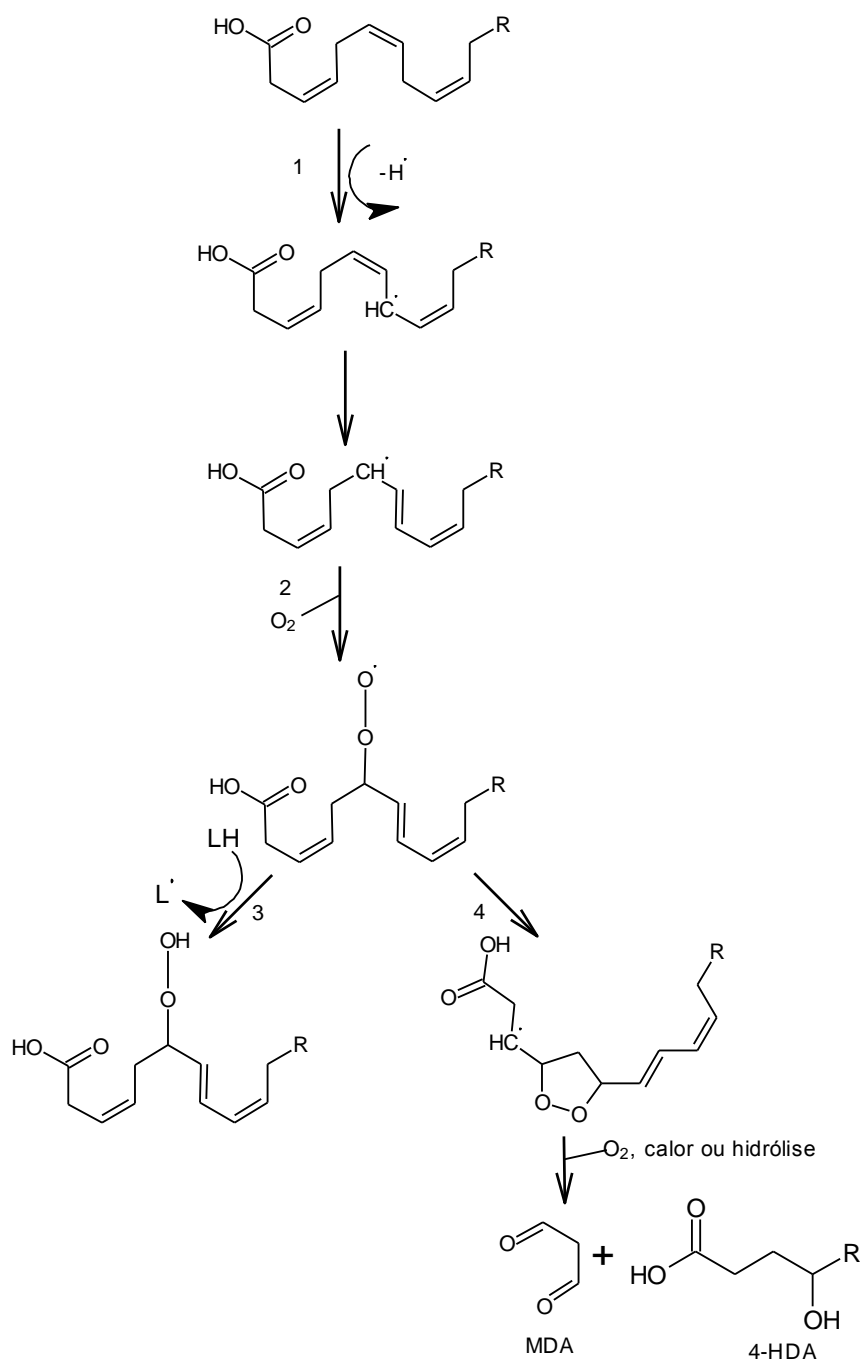


Figura 4. Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados. 1: abstração de H da cadeia poli-insaturada de lipídios de membrana; 2: formação de radical peroxil; 3: formação da segunda espécie radical centrada no carbono; 4: formação de endoperóxidos. Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2000).

A extensão do dano lipoperoxidativo causado por espécies reativas está associada à diferenciação qualitativa e quantitativa dos constituintes fosfolipídicos em função dos tecidos do organismo. A heterogeneidade da composição fosfolipídica em membranas biológicas também afeta o potencial de sistemas antioxidantes contra os danos causados pela lipoperoxidação induzida por espécies reativas (TEIXEIRA et al., 2003).

Os estudos das estruturas e propriedades das membranas celulares são dificultados pela heterogeneidade de sua composição. Dessa forma, torna-se importante a utilização de modelos de membrana celular, cujas variáveis podem ser estabelecidas e controladas, permitindo que os princípios físico-químicos e interações específicas moleculares sejam interpretados de forma mais precisa (STUBBS e SMITH, 1984; SÖDERLUND, 2003). O modelo lipossomal é considerado como o mais aceito para o estudo das estruturas e das propriedades da membrana por ser constituído por uma ou mais bicamada (s) lipídica (s) em forma de concha esférica. A bicamada lipídica é estruturalmente semelhante à matriz das membranas celulares (CASTELLI et al., 1997). Os lipossomos constituídos por matrizes lipídicas também são usados como sistemas de liberação prolongados de fármacos, visto que são menos tóxicos para o organismo e formam um ambiente favorável à imobilização de estruturas biológicas como enzimas e anticorpos (TIBERG, 2005; JANSHOFF e STEINEM, 2006). Dentre as diferentes classes de lipídios que podem ser usados com este fim, citam-se os fosfolipídios. Estes são responsáveis pela estrutura e organização da membrana celular. A fosfatidilcolina possui uma cabeça polar constituída por um grupo fosfocolina e duas cadeias de ácidos graxos de extensão similar entre si. Em geral, uma das

cadeias apresenta-se saturada, enquanto a outra costuma possuir de uma a seis duplas ligações (OHVO-REKILÄ et al., 2002) (Figura 5).

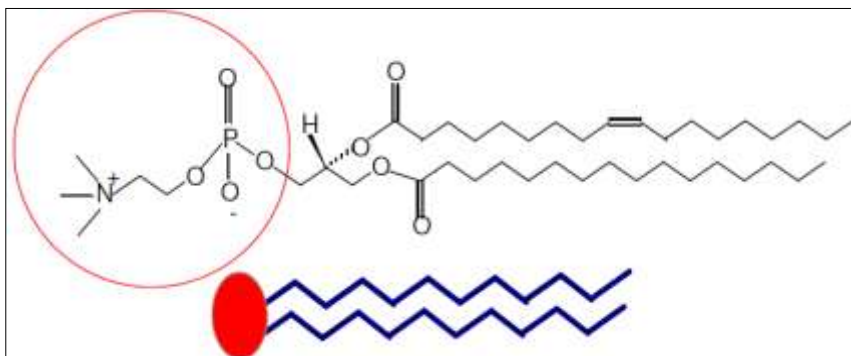


Figura 5. Representação estrutural e esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina.

Os lipossomos apresentam tamanhos e constituições variáveis que são fatores determinantes de suas propriedades. Eles podem ser classificados de acordo com o tamanho em: vesículas multilamelares grandes (MLV, do inglês *multilamellar large vesicles*), vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *unilamellar large vesicles*) e vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *small unilamellar vesicles*) (Figura 6). As MLV possuem um diâmetro superior a 400 nm e são compostas por uma ou mais lamelas (ou bicamadas) em seus compartimentos internos. Elas costumam ser preparadas a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso (método de hidratação de vesículas), seguido de ciclos de congelamento-descongelamento para obter um tamanho uniforme. Já as LUV apresentam diâmetros na faixa de 50-400 nm e são organizadas em apenas uma bicamada. As SUV, por sua vez, possuem diâmetro na faixa de 20-50 nm e são mais instáveis em relação aos dois primeiros tipos de lipossomos (HOPE et al., 1986).

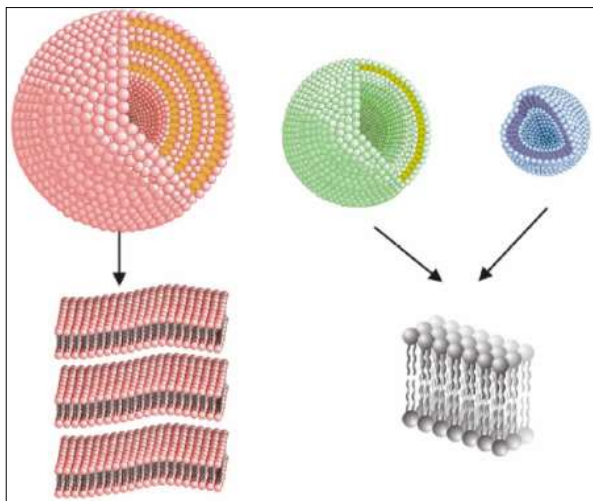


Figura 6. Esquema de vesículas multilamelares grandes (MLV, esquerda), vesículas unilamelares grandes (LUV, meio) e vesículas unilamelares pequenas (SUV, direita).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para investigar as propriedades físico-químicas de membranas, tais como os lipossomos, e os efeitos causados nas mesmas após suas interações com espécies reativas e substâncias pró- ou antioxidantes. Os efeitos podem ser avaliados em função das alterações nas propriedades físico-químicas dos lipossomos, tais como graus de hidratação, ordem e mobilidade de grupos específicos dos lipídios que os compõem. Dentre tais técnicas, podem ser citadas a espectroscopia de absorção UV-visível, FTIR, a calorimetria de varredura diferencial (DSC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) (CASTELLI et al., 1997; ARORA et al., 2000; FENSKE e JARRELL et al., 1991). Estas técnicas contribuem para estudos que objetivam a viabilização do α -ESA como fármaco.

3.1. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE DE LIPOSSOMOS

3.1.1. Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é uma técnica adequada para estudar as membranas lipídicas no nível submolecular (TAMM e TATULIAN, 1997; TATULIAN, 2003). A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflexão total atenuada horizontal (FTIR-HATR) tem sido utilizada para estudar os lipossomos, uma vez que previne os danos da membrana, visto que esta é considerada “matéria mole” (TAMM e TATULIAN, 1997; ARSOV e QUARONI, 2007). Os espectros de FTIR da fosfatidilcolina mostram bandas que podem ser divididas em três diferentes regiões correspondentes às porções polar, interfacial e hidrofóbica do lipídio (MANTSCH e MCELHANEY, 1991). As vibrações típicas de átomos ligados covalentemente podem ser classificadas como "*bending*" (deformação angular) ou "*stretching*" (estiramentos). Estes últimos envolvem mudanças nos comprimentos de ligação (ARRONDO e GOÑI, 1998). Neste trabalho, somente os estiramentos foram considerados. As bandas dos estiramentos referentes aos grupos de fosfatidilcolina estão relacionadas com: estiramento axial assimétrico do fosfato ($\nu_{as} PO_2^-$) no intervalo de frequência 1260-1220 cm^{-1} ; estiramento axial assimétrico da colina ($\nu_{as} CN^+C$) em uma frequência de cerca de 970 cm^{-1} , ambas localizadas na região polar de lipídios; na região de interface, o estiramento da carbonila ($\nu C=O$), em uma faixa de frequências de 1725-1740 cm^{-1} e os estiramentos axiais simétricos e assimétricos dos metilenos da cadeia acil ($\nu_s CH_2$ e $\nu_{as} CH_2$), com frequências de cerca de 2850 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} , respectivamente (HEREĆ et al., 2007; MANRIQUE-MORENO, et al., 2010).

A presença de uma molécula exógena incorporada na membrana pode induzir alterações nas bandas de fosfatidilcolina, tais como deslocamentos e variações de largura de banda. Estes deslocamentos podem fornecer informações sobre os processos físico-químicos que ocorrem nos sistemas (SEVERCAN, SAHIN e KAZANCI, 2005). No que diz respeito à região polar do lipídio, o estiramento assimétrico do fosfato é sensível às condições de hidratação, cujos valores de frequência reduzem com o aumento do grau de hidratação. Assim, se uma molécula exógena modificar o número e orientação de ligações de hidrogênio das moléculas de água em torno de um grupo presente na cabeça lipídica, um deslocamento dos valores de frequência correspondentes da banda do estiramento assimétrico do fosfato deve ser observado no espectro de FTIR (MANRIQUE-MORENO et al., 2009). Variações na largura de banda de grupos específicos de fosfatidilcolina dão informações sobre a dinâmica do sistema, já que a largura de banda é afetada por efeitos rotacionais, translacionais e/ou de colisões (LEE e CHAPMAN, 1986). Com o aumento da dinâmica da membrana (aumento de mobilidade), um aumento da largura da banda do lipídio pode ser observado (TOYRAN e SEVERCAN, 2003). No entanto, a largura de banda do estiramento assimétrico do PO_2^- também é sensível ao grau de hidratação. Um alargamento da banda juntamente com o seu deslocamento para uma frequência mais baixa em consequência da inserção de uma molécula exógena na membrana é um indicativo do aumento do grau de hidratação do grupo PO_2^- (CHEN e TRIPP, 2008; CHOI et al., 1991).

A influência da ligação de hidrogênio no grupo polar colina não pode estar relacionada com deslocamentos no valor da frequência correspondente ao grupo em FTIR já que a formação da ligação de hidrogênio entre água e colina não é possível

devido à carga positiva do nitrogênio. No entanto, a separação de colina com o grupo fosfato causada pela intercalação de moléculas de água pode refletir em variações de intensidade e deslocamentos relacionados com os estiramentos da colina (GRDADOLNIK, KIDRIC e HADZI, 1991). Além disso, o grupo colina está associado à água por interações dipolo e estes podem ser afetados por uma interação com uma molécula exógena (MANRIQUE-MORENO et al., 2009).

A vibração do estiramento da carbonila é um sensor do grau de hidratação da região de interface do lipídio, sendo sensível também à polaridade, ao grau e à natureza das interações da ligação de hidrogênio na interface lipídio-água (MANRIQUE-MORENO et al., 2009). Uma diminuição na frequência de ν C=O pode implicar no reforço da ligação de hidrogênio existente ou na formação de nova ligação de hidrogênio entre o lipídio e a molécula de interação (SEVERCAN, SAHIN e KAZANCI, 2005; KORKMAZ e SEVERCAN, 2005). Além disso, as alterações conformacionais na região de interface da membrana podem refletir em variações relacionadas com a largura de banda do estiramento da carbonila. Estudos relativos à influência da temperatura sobre a largura de banda do estiramento da carbonila presente na membrana contendo associações de fosfatidilcolina e colesterol demonstraram que a largura da banda de ν C=O aumenta enquanto o grau de liberdade desta região lipídica aumenta (ARSOV e QUARONI, 2007).

A análise das bandas dos metilenos no FTIR é muito útil para o estudo das propriedades físicas dos fosfolipídios, uma vez que eles são sensíveis à conformação da cadeia lipídica (MANNOCK, LEWIS e MCELHANEY, 2010). Alterações nas larguras dessas bandas refletem alterações no grau de liberdade da região hidrofóbica lipídica

(LÓPEZ-GARCÍA et al., 1993). Estes grupos são diretamente associados à transição de fase (LEE e CHAPMAN, 1986). Nos estados de fase mais ordenados, como o gel, essas bandas são nítidas e centradas em frequências menores, indicando a predominância de cadeias de hidrocarbonetos com pouca dinâmica e menos movimento (LEWIS e MCELHANEY, 1998). À medida que o estado de fase torna-se mais desordenado, estas bandas alargam e as suas frequências podem aumentar em valores que variam de aproximadamente $1,5$ a 3 cm^{-1} para $\nu_s \text{ CH}_2$ e $2,5$ - 5 cm^{-1} para $\nu_{as} \text{ CH}_2$. Estas alterações estão relacionadas com o aumento da mobilidade dos grupos vibracionais das cadeias de hidrocarbonetos (MANNOCK, LEWIS e MCELHANEY, 2010). A largura da banda também é sensível a outras alterações que não envolvem confôrmeros gauche, como uma diminuição da liberdade de movimento vibracional ou torção das cadeias (CASAL et al., 1980).

3.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de RMN de hidrogênio (^1H) foi utilizada neste trabalho para complementar as informações obtidas por FTIR sobre a influência do α -ESA na dinâmica do grupo colina. O uso de RMN também pode fornecer dados importantes associados aos efeitos de substâncias ativas na mobilidade molecular do lipídio presente no lipossomo (De LIMA et al., 2007). Assim sendo, foi monitorado o tempo de relaxação longitudinal (T_1), uma vez que o relaxamento de ^1H ocorre predominantemente através de interações dipolares envolvendo núcleos vizinhos ao ^1H (KROON, KAINOSHO e CHAN, 1976; BROWN, 1984; DE LIMA et al., 2007). Os valores dos tempos de relaxação (T_1) estão relacionados ao tempo de correlação (τ_c),

definido como o tempo que uma molécula leva para girar em um radiano em determinada fase da membrana. Assim, as medidas de T_1 podem fornecer informações sobre a dinâmica da membrana, o que inclui a influência de uma molécula em movimentos rápidos de lipídios como a rotação (DUFOURC, 2006). Dentre os prótons lipídicos que podem ser analisados em fosfatidilcolinas, estão os prótons da colina (3,2 ppm) e os presentes na cadeia lateral (0,8-2,3 ppm) (CARLOTTI et al., 2002).

A Figura 7 apresenta dados típicos que podem ser obtidos ao determinarem-se valores de T_1 em função da temperatura. Os valores de T_1 em função de τ_c se comportam como um “V”, no qual o valor de τ_c no ponto mínimo pode ser obtido diretamente do valor de ω_0 (frequência da banda de ressonância). O ponto mínimo da curva (onde $\omega\tau_c = 1$) determina os regimes de alta e baixa mobilidade. Para obterem-se informações sobre a dinâmica lipídica é necessário saber se os valores de τ_c estão acima ou abaixo do mínimo da curva. No caso de MLV, a redução de T_1 corresponde a um menor valor de τ_c , ou seja, a um aumento do grau de mobilidade molecular (DUFOURC, E.J., 2006).

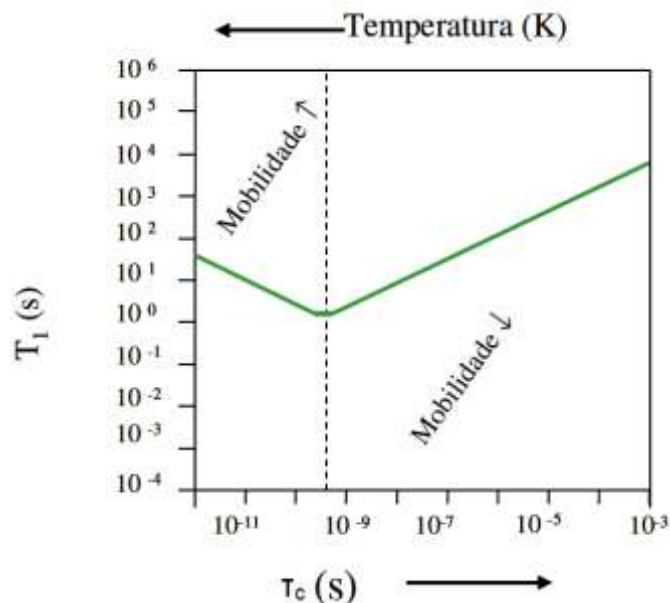


Figura 7. Representação esquemática da relação entre tempo de relaxação longitudinal (T_1) e o tempo de correlação (T_c) (DUFOURC, 2006).

3.1.3. Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria de varredura diferencial (DSC) pode fornecer informações sobre o efeito de substâncias nos parâmetros termodinâmicos referentes às cadeias acil dos lipídios, durante as transições de fase. A transição de fase principal corresponde à transição de uma bicamada lipídica na fase gel, ordenada e de mobilidade restrita, para a fase fluida, desordenada e com alto grau de mobilidade (YEAGLE, 1993; BENEY e GERVAIS, 2001; MOURITSEN, 1991). É então caracterizada pela presença de cadeia acil em configuração 100% *trans* para uma fase na qual tal cadeia contém confôrmeros gauche (ZHAO et al., 2007). A presença de insaturações na cadeia acil dos lipídios está diretamente relacionada com o estado de fase das membranas.

É possível analisar alterações causadas por α -ESA na temperatura de transição de fase (T_m) e variações de entalpia (ΔH) dos lipídios. A temperatura de transição de fase (T_m) é a temperatura em que uma determinada amostra de membrana lipídica encontra-se 50% em estado gel e 50% em estado líquido-cristalino (EL MAGHRABY et al., 2005). As fosfatidilcolinas saturadas como a DMPC, formam estruturas com T_m elevadas, 23,5°C (AUSSENAC et al., 2003). As fosfatidilcolinas insaturadas, tais como as originadas de fontes naturais (ovo ou soja), como a asolecitina de soja (ASO), apresentam T_m negativa (ULRICH et al., 1994). A variação de entalpia (ΔH) reflete as interações de van der Waals entre as cadeias acil lipídicas e aquelas alteradas pela interação com a substância ativa. Tais parâmetros estão relacionados com a ordem e cooperatividade lipídica. Sabe-se que na fase gel, a mobilidade das cadeias acil é pequena, enquanto que a fase líquido-cristalina é caracterizada por desordem nestas cadeias (MANRIQUE-MORENO et al., 2009; DE LIMA et al., 2010).

3.1.4. Espectroscopia de UV-visível (UV-Vis)

As transições de fase lipídica também podem estar relacionadas com alterações na turbidez do sistema. A turbidez pode ser definida como uma "absorbância aparente" e espectrofotômetros de UV-visível são recomendados para investigar as possibilidades de observar transições de fase de lipídios. Por exemplo, uma diminuição na densidade óptica relativa à uma dispersão aquosa contendo dipalmitoilfosfatidilcolina foi observada na sua temperatura de transição de fase (YI e

MACDONALD, 1973). Esta diminuição da turbidez lipídica está relacionada com a transição de estados ordenados para desordenados.

O α -ESA isolado e purificado a partir do óleo de tungue foi incorporado em um sistema lipossomal baseado em fosfatidilcolina: asolecitina de soja (ASO), uma mistura de fosfolipídios contendo majoritariamente fosfatidilcolina (Figura 8a), fosfatidilinositol fosfato (Figura 8b) e fosfatidiletanolamina (Figura 8c).

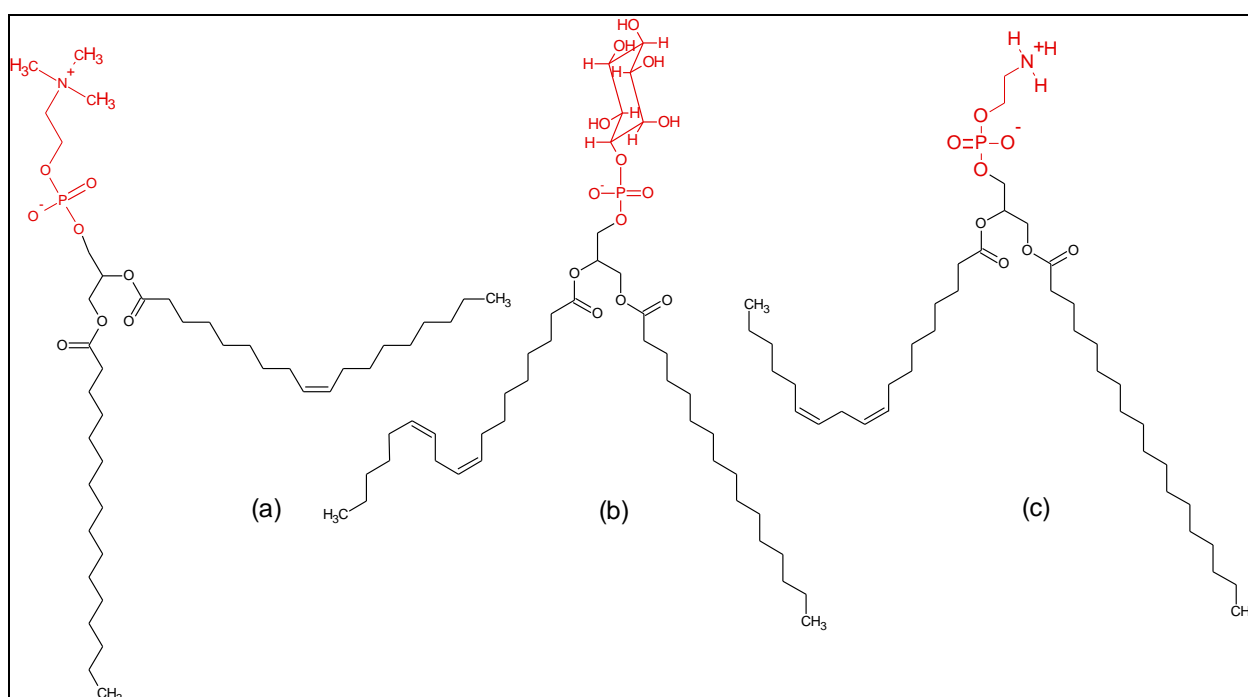


Figura 8. Estruturas dos componentes majoritários da asolecitina de soja (ASO). (a) fosfatidilcolina; (b) fosfatidilinositol fosfato; (c) fosfatidiletanolamina. Em vermelho, a cabeça polar; em preto, a região glicerol e as cadeias alquílicas dos lipídios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes, materiais e equipamentos

Para o desenvolvimento deste trabalho, o óleo de tungue foi obtido através da Campestre Indústria e Comércio de Óleos Vegetais LTDA. Os demais reagentes possuem grau de pureza analítica e consistiram em: acetona, ácido sulfúrico (VETEC); água deuterada/3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3-2H₄]-1-propiónico de sódio (TSP, 0,05%), asolecitina de soja (ASO), contendo 25% de PC (SIGMA-ALDRICH), cloreto de magnésio hexahidratado, clorofórmio, tricina, etanol (SYNTH), hexano ultrasianalysis, hidróxido de potássio, solução BF₃/metanol (~10,0%). Silicone e glicerol comerciais para banho de aquecimento. Os lipídios foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

Os materiais e a vidraria utilizados foram compostos por itens de uso convencional no laboratório, como balões de uma boca com volumes de 10 a 500 mL; condensadores; béquers; erlenmeyers; pipetas; funis de separação; funis simples; provetas; funis de Büchner; kitassatos; balões volumétricos; garras; suportes, dentre outros.

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: placa de aquecimento e agitação magnética modelo 752A Fisatom com potência de 650W (de 120 a 1800 rpm), evaporador rotatório modelo 801A Fisatom de 70W, bomba de vácuo mod. XKM60-1 1/2HP FAMAC, aparelho de medição do ponto de fusão modelo 430D Fisatom, cromatógrafo gasoso Shimadzu QP 2010 com detector espectrômetro de massas, espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu UV-2550, espectrofotômetro de

infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu – IR Prestige-21 e espectrômetro de ressonância magnética nuclear Anasazi Instruments (60 MHz), disponíveis na Universidade Federal do Rio Grande-FURG; espectrômetro de ressonância magnética nuclear INOVA-300 (300 MHz), disponível na Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS; calorímetro de varredura diferencial Shimadzu DSC-60, disponível na Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

4.2. Métodos

4.2.1. Purificação e caracterização do α -ESA

A purificação do α -ESA foi realizada através de adaptações de metodologias documentadas na literatura (THOMAS & THOMSON, 1934; ZHANG, CAO & HUANG, 2007). A Figura 9 representa um fluxograma dos procedimentos de isolamento e purificação do α -ESA. Os procedimentos constam de três etapas: 1) a reação de saponificação, 2) a precipitação de ácidos graxos livres (AGL) e 3) recristalizações.

Durante a etapa de saponificação, 25 g de óleo de tungue foram adicionados a 100 ml de uma solução etanólica de KOH 0,2 N. A mistura reacional foi mantida sob refluxo a 60°C, com agitação constante por 90 minutos.

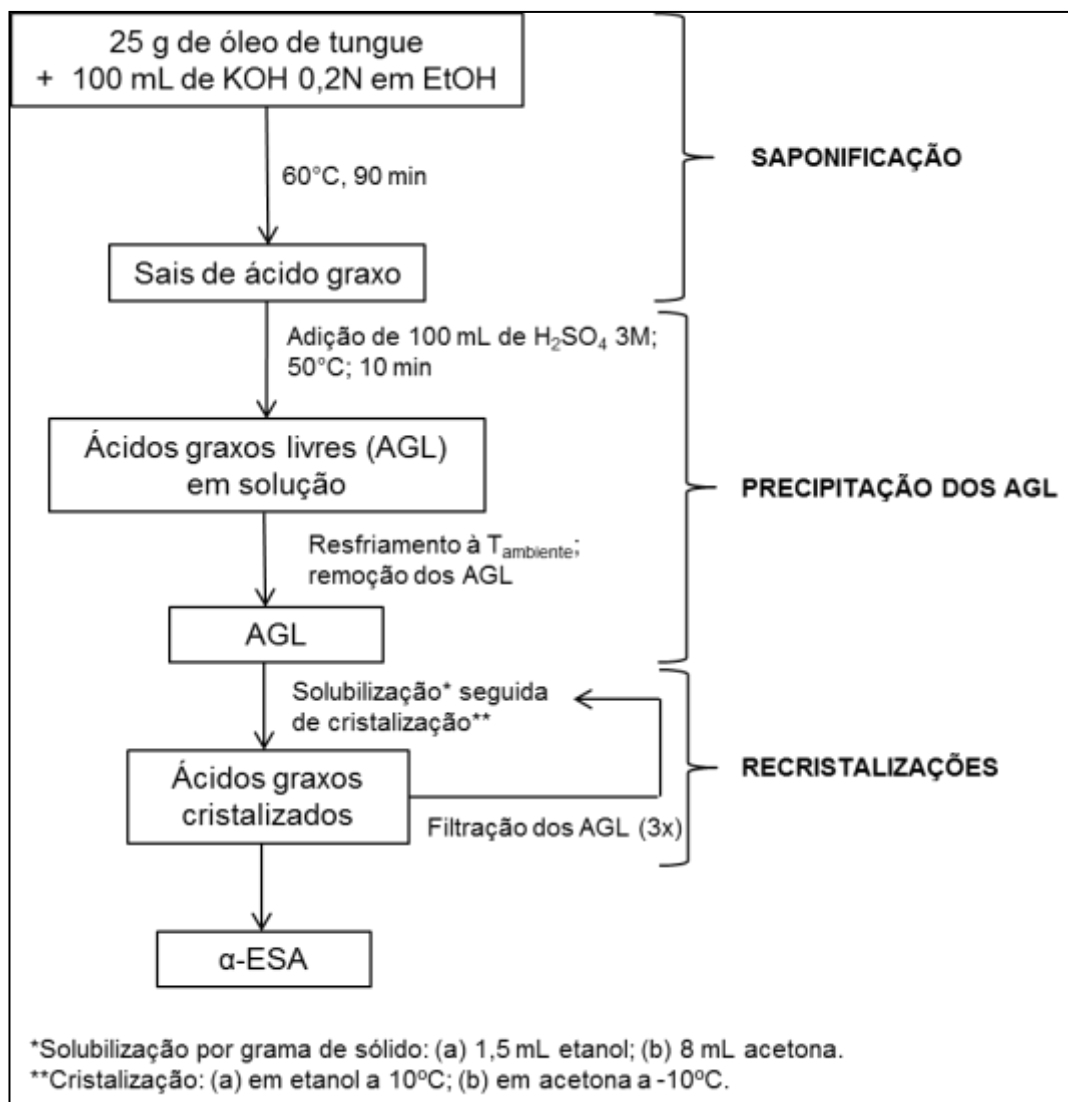


Figura 9. Etapas para obtenção do ácido α -eleosteárico (α -ESA).

Após a obtenção dos sais de ácido graxos, foi realizada a etapa de precipitação dos ácidos graxos livres (AGL). Com este fim, foram adicionados aos sais de ácidos graxos, obtidos na etapa anterior, 100 mL de uma solução de H_2SO_4 3 M (Figura 10) e esta mistura foi mantida sob refluxo a 50°C com agitação constante por 10 min. Após a precipitação dos ácidos graxos, o α -ESA foi recristalizado.

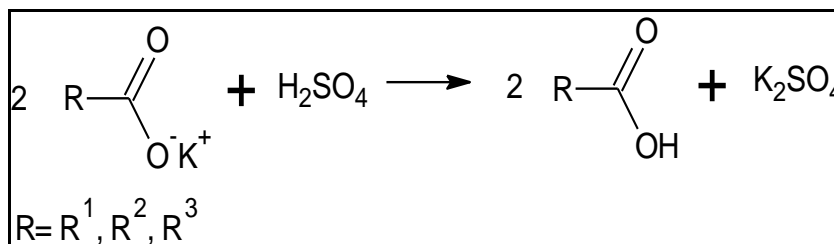


Figura 10. Precipitação dos ácidos graxos livres a partir da solução dos sais de ácidos através da acidificação do meio.

Para a recristalização e obtenção do α -ESA, a mistura de ácidos graxos (AGL), foi solubilizada em dois sistemas de solventes: etanol 90% e acetona. Para a recristalização com a solução etanólica, os AGL foram solubilizados a 35°C em uma proporção de 1 g de sólido para 1,5 mL de solução etanólica. Esta mistura foi resfriada a 10°C por 18 h para cristalização. Após este período, os cristais obtidos foram filtrados a vácuo, novamente pesados e solubilizados. Este processo foi repetido por três vezes, totalizando quatro recristalizações para purificação do α -ESA dos demais ácidos graxos (THOMAS & THOMSON, 1934).

Para a recristalização com acetona, a mistura de AGL foi solubilizada à temperatura ambiente, em uma proporção de 1 g de sólido para 8 mL de acetona (ZHANG, CAO & HUANG, 2007). A sequência do procedimento para recristalização foi similar à citada para a recristalização com solução etanólica, modificando-se apenas a temperatura de recristalização (-10°C).

Após as recristalizações, as amostras foram submetidas a vácuo por 3 h, para remoção de traços de solvente e, em seguida, foram submetidas às análises de:

- 1) Ponto de Fusão;
- 2) Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier;

- 3) Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- 4) Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.

A determinação do ponto de fusão foi realizada em triplicata, utilizando um equipamento Fisatom modelo 430D pelo método capilar. O intervalo de temperatura considerado foi de 20°C a 100°C .

A análise de FTIR foi realizada em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu – IR Prestige-21, utilizando pastilha de KBr.

As análises de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H foram efetuadas através da solubilização (por concentração) de AGL em CDCl_3 . Os espectros foram obtidos em espectrômetro INOVA-300 (300 MHz), usando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

A determinação do teor de éster foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Para realização da análise cromatográfica, os AGL foram derivatizados a seus respectivos metil ésteres como mostra a Figura 11.

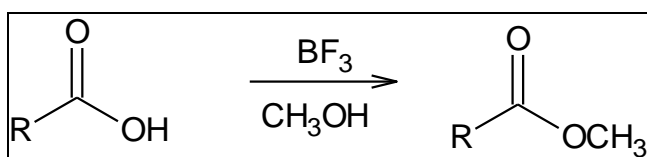


Figura 11. Reação genérica de derivatização de ácido carboxílico de cadeia R realizada utilizando $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$.

Para a derivatização dos AGL a metil ésteres, 100 mg de AGL foram adicionados a 3 mL de solução metanólica de BF_3 à temperatura ambiente por 30 minutos (IGARASHI et al., 2004). O produto desta reação foi transferido para um funil

de decantação onde, em seguida, foram adicionados 20 mL de hexano ultrasialysis e 20 mL de água destilada. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica coletada em balão de 50 mL. A fase orgânica foi então submetida à rotaevaporação para eliminação de hexano e de metanol remanescentes.

A análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM, FURG) em um aparelho Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010 Plus equipado com *autosampler* (AOC-20i) e um detector de espectrômetro de massa com filtro de massa quadrupolo. A espectrometria de massa foi realizada com impacto de elétrons. A separação por GC foi realizada em uma coluna analítica pelo RTX-5MS (30 m x 0,25 milímetros ID, 0,25 µm de espessura). O controle analítico, a aquisição e tratamento dados foram realizados pelo software *GCMS solution version 2*[®]. O Hélio (pureza de 99,999%) foi utilizado como gás de transporte. Foi realizada a injeção de 1 µL à alta pressão (300 kPa) e foram divididas em uma razão 1:30. O espectrômetro de massa foi realizado em uma faixa m/z de 30 a 360 (PARDO et al., 2012).

4.2.2. Preparação de lipossomos contendo fosfatidilcolinas

Os lipossomos compostos por ASO foram preparados de acordo com o método de hidratação de vesículas (HOPE et al., 1986). O método consiste na hidratação de um filme lipídico com uma solução tampão, levando a formação de MLV. O filme lipídico foi formado previamente a partir da solubilização de 150 mg/mL do lipídio em questão com clorofórmio, seguido da rotaevaporação do solvente (Figura 12). Os traços de solvente foram removidos através de vácuo, durante 3 horas.

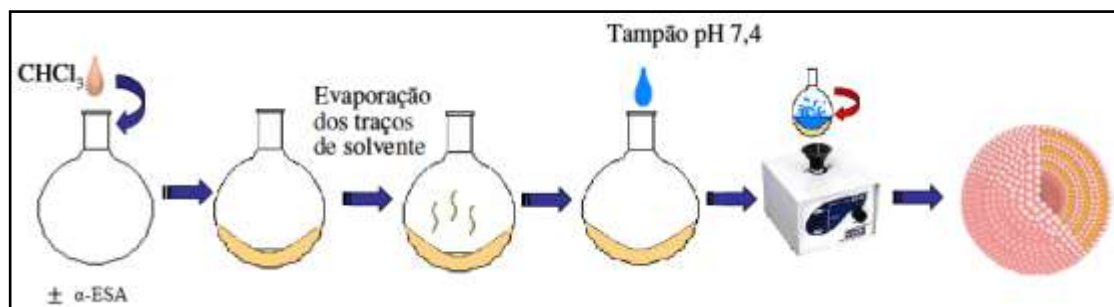


Figura 12. Esquema de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLV) pelo método de hidratação de vesículas.

Posteriormente, o filme lipídico foi hidratado com 1 mL de solução tampão (pH 7,4) contendo tricina 10 mM e cloreto de magnésio 2,5 mM e submetido à agitação em vortex até desprendimento do filme das paredes dos balões de fundo redondo.

4.2.2.1. Incorporação de $\alpha\text{-ESA}$ nos lipossomos

Diferentes concentrações de $\alpha\text{-ESA}$ foram incorporadas nos lipossomos de ASO durante a etapa de solubilização do lipídio com clorofórmio. As concentrações de $\alpha\text{-ESA}$ variaram de 0 a 30 mg/mL, correspondendo a faixa percentual de 0 a 20% do total de lipídio usado (concentração do lipídio: 150 mg/mL).

4.2.2.2. Ensaio de peroxidação lipídica nas membranas

O método TBARS de substâncias que reagem ao ácido 2-tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) caracteriza-se pela formação de um aduto de coloração rósea a partir da reação entre malonildialdeído (MDA), produto

majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 13). A reação ocorre em pH ácido, propiciado pela adição de ácido tricloroacético no meio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

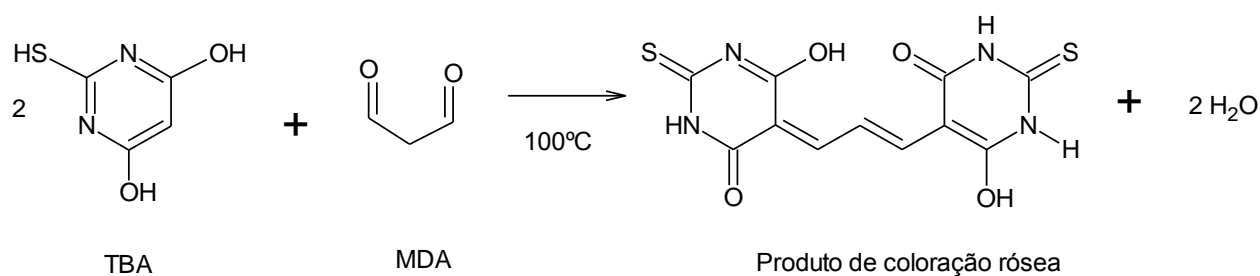
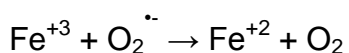


Figura 13. Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea.

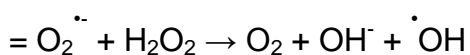
Dentre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil possui um dos maiores potenciais oxidativos. Em sistemas biológicos, o radical hidroxil também pode ser produzido a partir da reação de Fenton/Haber-Weiss. A reação de Fenton (Equação 2) é catalisada por Fe^{+3} , na qual este é reduzido ao interagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$, gerando o íon ferroso. O Fe^{+2} pode reagir com H_2O_2 , recuperando o ferro em seu estado de maior oxidação e produzindo ânion hidroxila e $\cdot\text{OH}$. A somatória das duas reações descritas nas equações 1 e 2, constitui a reação de Haber-Weiss (equação 3) (HABER e WEISS, 1934; CHEN, e SHOPFER, 1999).



Equação 1. Redução do ferro.



Equação 2. Reação de Fenton.



Equação 3. Reação de Haber-Weiss.

A lipoperoxidação foi induzida, portanto, por radical hidroxil, através da geração via reação de Fenton em um meio reacional contendo lipossomas (12,5 mg/mL de fosfolipídios). Tal meio foi composto por FeCl_3 0,02 mM, ascorbato 0,1 mM e peróxido de hidrogênio 2,8 mM. As soluções tampão adicionadas no meio eram compostas por 10 mM de tampão fosfato de potássio.

Dois experimentos controle foram realizados para eliminação de interferentes nas leituras espectrofotométricas. Um dos controles apresentou, em seu meio reacional, os componentes descritos anteriormente, com exceção das membranas lipídicas. Os valores de leituras espectrofotométricas obtidos com estes controles foram subtraídos dos valores detectados com os modelos de membrana, para tratamento dos dados. O segundo controle foi realizado na ausência de espécies oxidantes no meio de reação, para detecção de valores de absorvância relativos à peroxidação basal, induzida pelo oxigênio do ar. Este valor também foi descontado dos valores obtidos com as amostras contendo membranas lipídicas e a espécie reativa testada neste trabalho. (De LIMA, 2009)

As amostras e os controles foram incubados durante 30 minutos a 37°C e a extensão do dano por lipoperoxidação nas membranas foi detectada através do método do ácido tiobarbitúrico (OHKAWA et al., 1979; BIRD e DRAPER, 1984). A reação foi acelerada através de incubação a 100°C (OHKAWA et al., 1979; BIRD e DRAPER, 1984). O tempo médio desta incubação foi de 30 minutos.

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressa em μmol de TBARS/ mg de lipídio (VAN MEER e VAN GENDEREN, 1994) foi determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 535 nm, e calculada usando um

coeficiente de absorvidade molar (ϵ), de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

4.2.2.3. Medidas de FTIR em membranas

As medidas com HATR-FTIR foram realizadas num espectrômetro Shimadzu IR-21 Prestige. Os lipossomos contendo 150 mg/mL de ASO puros ou incorporados com α -ESA em concentrações de 0 a 30 mg/mL, foram depositados sobre o suporte de cristal de ZnSe e imerso no tampão tricina/MgCl₂ (pH 7,4). Os interferogramas foram realizados a partir de 50 varreduras na faixa de frequência 400-4000 cm⁻¹. Os espectros foram analisados usando software Shimadzu solution 1.5. As variações de frequência de grupos específicos nos lipídios, induzidos pelo α -ESA, foram detectadas através da análise de deslocamentos nas bandas vibracionais de grupos presentes na fosfatidilcolina. As mudanças na largura de banda dos estiramentos de grupos lipídicos foram medidas em relação a uma linha de base a $\frac{3}{4}$ da altura do pico. As vibrações do grupo fosfatidilcolina analisadas foram as seguintes: o estiramento axial assimétrico do fosfato na faixa de frequência de 1260-1220 cm⁻¹ ($\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$), os estiramentos axiais assimétricos da colina em valores de frequência de aproximadamente 970 cm⁻¹ ($\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$) e 3.005 cm⁻¹ ($\nu_{\text{as}} \text{NCH}$), o estiramento da carbonila, em uma faixa de frequência de 1725-1740 cm⁻¹ ($\nu \text{C=O}$) e os estiramentos axiais simétrico e assimétrico dos metilenos ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ e $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$) presentes nas cadeias acil, com valores de frequência em cerca de 2850 cm⁻¹ e 2920 cm⁻¹, respectivamente (HEREĆ et al., 2007; MANRIQUE-MORENO et al., 2010).

4.2.2.4. Medidas de RMN

Para os ensaios de RMN, as medidas de T_1 de ^1H foram obtidas em baixo campo magnético, 60 MHz, através do equipamento Anasazi Instruments (Indianapolis, EUA). Foi aplicada a seqüência de pulsos de recuperação da inversão em lipossomos puros e na presença de α -ESA. As amostras foram preparadas em solvente H_2O : D_2O (80:20, v/v) e a temperatura do experimento foi mantida a 22°C . Utilizou-se uma faixa de tempo de correlação (τ_c) de 0,2 a 102,4 segundos. A referência interna utilizada no estudo com lipossomos foi o TSP, 0,05% (De LIMA et al., 2007). Os valores de relaxação e intensidades relativas foram processados através do programa NUTS.

4.2.2.5. Ensaio de DSC

Para os ensaios de DSC, os lipossomos contendo ASO na ausência e na presença de α -ESA foram depositados em recipientes de alumínio (panelinhas) e submetidos a varreduras efetuadas a uma velocidade de $1^\circ\text{C}/\text{min}$, em faixa de temperatura de -30°C a 10°C . As medidas foram realizadas em aparelho TA Instrument 2010 DSC cell, disponível na central analítica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Utilizou-se fluxo de nitrogênio (50/50 mL/min) e uma panelinha vazia como referência (De LIMA et al., 2010). Foram avaliadas variações em T_m e ΔH lipídicos, induzidas pela presença de α -ESA. A ΔH foi obtida por integração da área sob o pico obtida utilizando o Software Universal 4.0 C da TA Instruments.

4.2.2.6. Ensaio de turbidez

As medidas de turbidez a 400 nm de lipossomos contendo 150 mg/mL de ASO puro ou com α -ESA incorporado (faixa de concentração de ácido graxo de 0-30 mg/mL) foram realizadas em um espectrofotômetro de UV-vis Shimadzu UV-2550. Foram usadas células de quartzo com um comprimento de percurso de 1 cm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de purificação do α -ESA

Após a saponificação do óleo de tungue (Figura 14), foram obtidos os sais de ácido graxo que foram precipitados para obtenção dos ácidos graxos livres.



Figura 14. Saponificação do óleo de tungue.

Após as recristalizações e evaporação a vácuo dos traços de solvente, obtiveram-se cristais de cor branca (Figura 15).



Figura 15. Sólido obtido na purificação.

O ponto de fusão do sólido obtido foi de $47\pm 2^{\circ}\text{C}$ e está de acordo com o descrito na literatura (BURR e BURR, 1930; HILDITCH, MORTON e RILEY, 1945).

A caracterização do α -ESA obtido foi realizada através de espectroscopia de infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e RMN de ^1H e ^{13}C .

A Figura 16 apresenta o espectro de infravermelho para o sólido obtido. É possível observar no espectro algumas bandas típicas do α -ESA como a banda larga de hidroxila em 3000 cm^{-1} característica dos ácidos carboxílicos, o deslocamento da carbonila para regiões abaixo de 1700 cm^{-1} , provocado pelas duplas conjugadas existentes no α -ESA e bandas características de conjugação na região abaixo de 990 cm^{-1} .

Em função da formação de ligações de hidrogênio fortes, os ácidos carboxílicos existem como dímeros quando líquidos ou sólidos. Por isso, a vibração de deformação axial da hidroxila livre (em aproximadamente 3520 cm^{-1}) só é observada em solução muito diluída de solventes apolares. Assim, a absorção de deformação axial de O-H dos dímeros dos ácidos carboxílicos é intensa e muito larga, sendo observada entre $3300\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, cujo centro se encontra geralmente em 3000 cm^{-1} . As bandas de

deformação axial de C-H da porção alquila, mais fracas, se superpõem à banda larga de O-H (SILVERSTEIN, 2007). É o que pode ser observado no espectro obtido, no qual temos os estiramentos das deformações axiais de C-H de metila e metilenos na região 3000-2840 cm^{-1} e acima de 3000 cm^{-1} em que é possível observar o estiramento das vibrações de deformação axial C-H dos hidrogênios alílicos.

Para as vibrações de deformação axial de C=O, a formação de ligações de hidrogênio e a ressonância dos dímeros enfraquecem a ligação C=O, provocando absorção em frequências mais baixas do que as do monômero, que absorvem em aproximadamente 1760 cm^{-1} quando ácidos alifáticos saturados (ibid.). A existência de insaturação conjugada para além dos carbonos α e β à carbonila, como no caso do α -ESA, resulta em um pequeno deslocamento adicional da banda de C=O, o que pode ser evidenciado pelo estiramento 1687 cm^{-1} obtido, referente a esse grupo.

Para as deformações atribuídas às ligações =C-H fora do plano para o α -ESA, têm-se 993, 968 e 727 cm^{-1} , que estão de acordo com a literatura (ROACH et al., 2002).

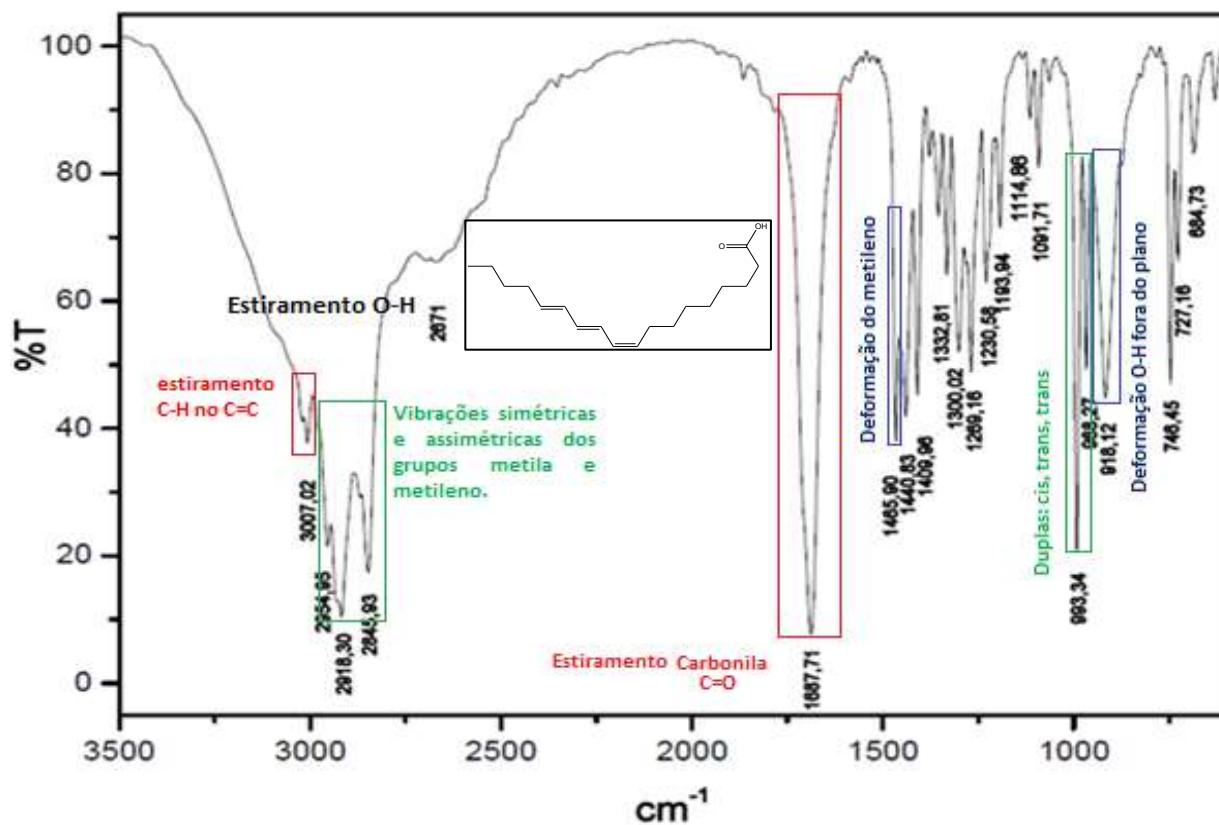


Figura 16. Espectro de infravermelho obtido para o ácido α -eleosteárico.

O grau de pureza foi determinado através da análise por cromatografia gasosa. Como pode ser observado na Figura 17, no tempo de retenção 11,996 min, foi detectado o metil éster referente ao α -ESA (Pico 3, Tabela 1), com uma área de 95,9% de área em relação aos demais ésteres.

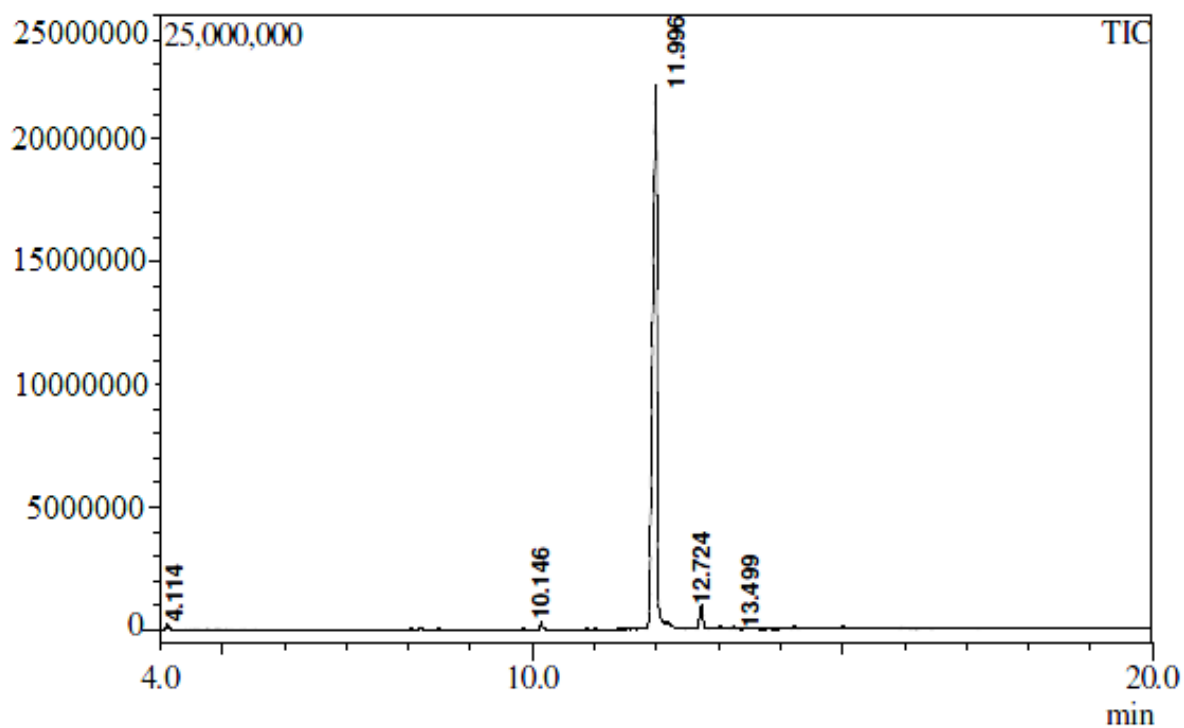


Figura 17. Cromatograma obtido a partir da purificação da amostra com acetona.

É possível, portanto, atribuir uma pureza de 95,9% (Tabela 1) de α -ESA ao sólido obtido a partir da purificação realizada com acetona com um rendimento de 24,98% de α -ESA.

Tabela 1. Dados obtidos na análise cromatográfica da amostra de ácido α -eleosteárico (α -ESA), purificada em acetona.

Pico	Tempo de retenção (min)	Área	Área (%)	Componente
1	4,114	650514	0,6	Metil éster do ácido 9-oxo-nonanoico
2	10,146	635815	0,6	Metil éster do ácido octadecatrienoico
3	11,996	108090144	95,9	Metil éster do ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienoico
4	12,724	3131769	2,8	Metil éster do ácido 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoico
5	13,499	146758	0,1	Metil éster do ácido eicosanoico

Pela utilização do mesmo procedimento, modificando apenas o solvente de recristalização para uma solução etanólica (EtOH/água, 9:1), obteve-se uma pureza de 92,2% (Tabela 2) com tempo de retenção 11,969 min (Figura 18), menor em relação ao primeiro resultado, com um rendimento de 20,68% de α -ESA.

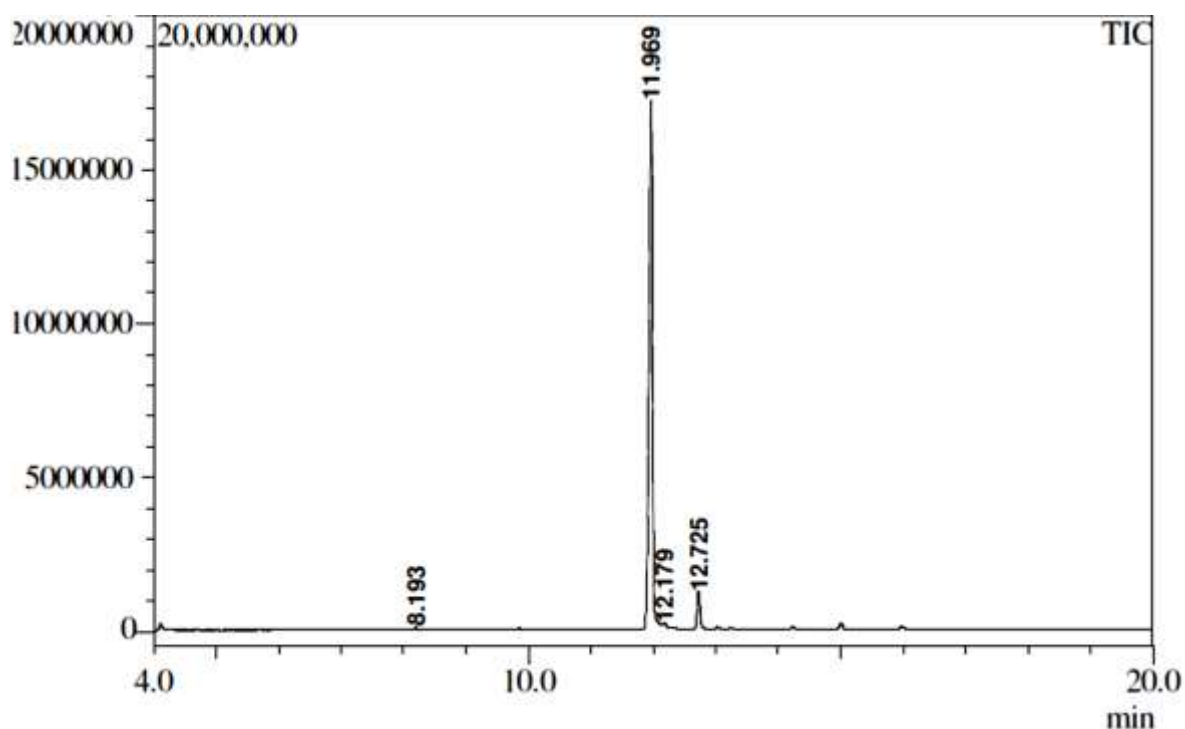


Figura 18. Cromatograma obtido a partir da purificação da amostra com EtOH/água (9:1).

Tabela 2. Dados obtidos na análise cromatográfica da amostra de ácido α -eleosteárico (α -ESA), purificada em etanol/água.

Pico	Tempo de retenção (min)	Área	Área (%)	Componente
1	8,193	188591	0,3	Metil éster do ácido 7,10-hexadecadienoico
2	11,969	67294718	92,2	Metil éster do ácido 9Z,11E,13E-octadecatrienoico
3	12,179	1320036	1,8	Metil éster do ácido 9Z,12E,15E-octadecatrienoico
4	12,725	4179800	5,7	Metil éster do ácido 9Z,12Z,15Z-octadecatrienoico

Objetivando a posterior incorporação de α -ESA em lipossomos, a metodologia de purificação deste ácido graxo utilizou a acetona como solvente de cristalização em função da maior pureza obtida no processo, mesmo o procedimento com acetona apresentando um custo maior em relação ao procedimento com etanol/água. A utilização de uma maior pureza do ácido graxo de interesse poderia nos dar resultados de interação α -ESA/membranas mais coerentes.

No espectro de massas obtido referente ao α -eleostearato de metila existem duas características principais que remetem a sistemas de ligações duplas conjugadas. Há uma alta intensidade do íon molecular (m/z 292) e a formação do íon tropílio por rearranjo (m/z 91) (Figura 19). Apenas pelo espectro de massas não é possível indicar as posições das ligações duplas (CHRISTIE, 2011).

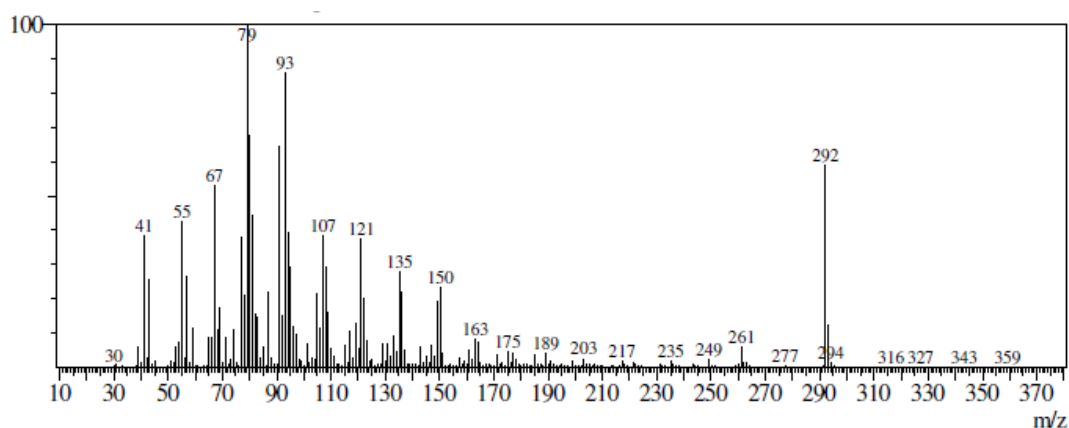


Figura 19. Espectro de massas obtido para o metil éster do ácido α -eleosteárico (α -ESA).

A Figura 20 mostra o espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do α -ESA, onde se observou multipletos em 6,38; 6,09; 5,70 e 5,39 ppm relativos aos 6

hidrogênios vinílicos, que mostram a presença das ligações duplas conjugadas do ácido cis,trans,trans-9,11,13-octadecatrienóico (ácido α -eleosteárico). Um triplete em 2,34 ppm referente aos hidrogênios do CH_2 α -carbonila, um multipeto em 2,13 ppm referente aos hidrogênios alílicos, um multipeto em 1,63 ppm referente aos hidrogênios β -carbonila. Os hidrogênios metilênicos estão no multipeto em 1,30 ppm e em 0,89 ppm um triplete referente ao CH_3 terminal da cadeia graxa.

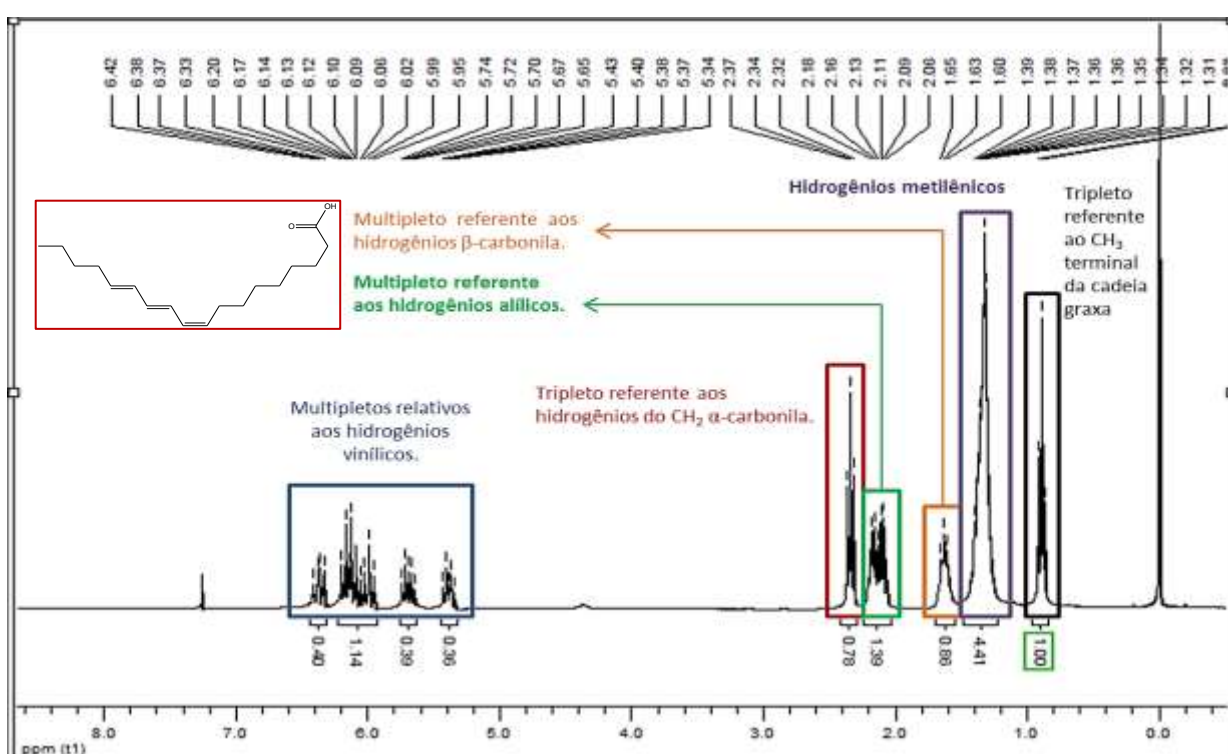


Figura 20. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do ácido α -eleosteárico (α -ESA).

A Figura 21 apresenta o espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do α -ESA onde se observa principalmente em 180 ppm um sinal referente a carbonila do

ácido, entre 125 e 135 ppm referente aos carbonos vinílicos, em 13 ppm referente ao CH₃ final da cadeia graxa e entre 22 e 34 ppm os demais carbonos da cadeia.

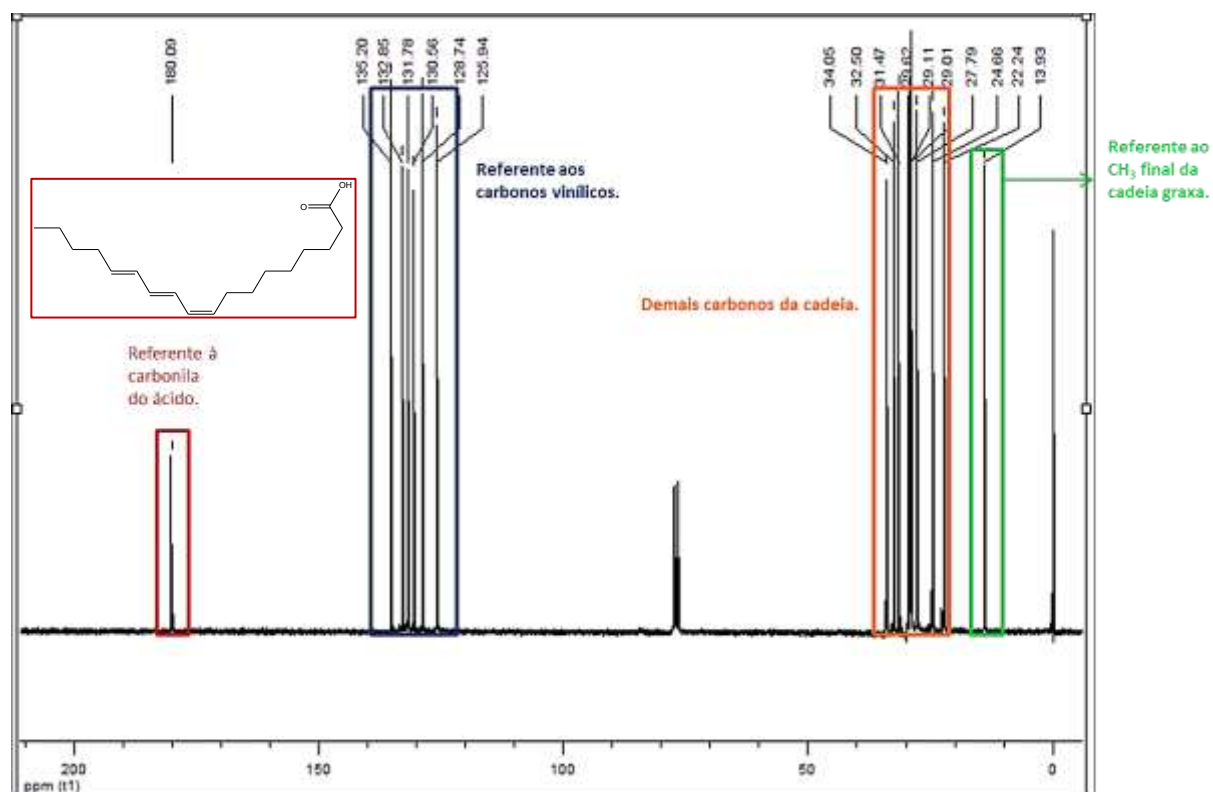


Figura 21. Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³C do ácido α-eleosteárico (α-ESA).

Os resultados de RMN de ¹H e ¹³C estão coerentes com as caracterizações disponíveis na literatura para o α-ESA (CAO et al., 2007).

5.2. Efeitos de α -ESA na peroxidação lipídica de lipossomos contendo fosfatidilcolina

Para determinar a influência do α -ESA na peroxidação *in vitro* da membrana, lipossomos de ASO puro e na presença do ácido graxo foram submetidos à oxidação induzida pelo radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o nível de TBARS foi determinado. A Figura 22 mostra os efeitos das concentrações crescentes de α -ESA em lipossomos de ASO *in vitro* com peroxidação induzida pelo $\cdot\text{OH}$.

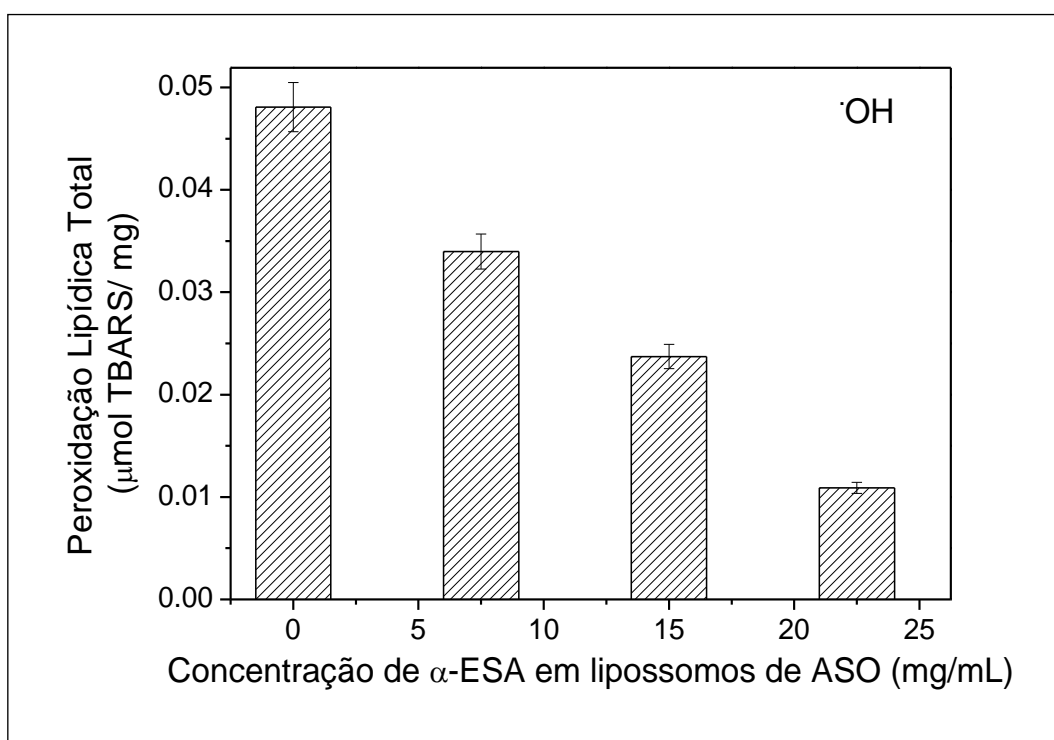


Figura 22. Variação da peroxidação lipídica total induzida por radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) em função do aumento das concentrações de ácido α -eleostéarico (α -ESA) incorporados em lipossomos de asolecitina (ASO). Os resultados foram obtidos pelo método de TBARS.

A partir da Figura 22, pode-se observar que o α -ESA parece ter uma atividade antioxidante *in vitro* contra o dano induzido por \bullet OH em lipossomos de ASO. As quantidades de TBARS gerados pela peroxidação \bullet OH em ASO estão de acordo com estudos anteriores que relataram os níveis de peroxidação \bullet OH em diferentes tipos de membranas (De LIMA et al., 2004). A concentração inibitória de 50% da peroxidação (IC_{50}) foi atingida em 15 mg/mL de α -ESA. Na concentração de 22,5 mg/mL, o ácido graxo inibiu a peroxidação \bullet OH em ASO em aproximadamente 77%. De acordo com os estudos de De LIMA e colaboradores, a quercetina, um flavonóide conhecido por seu potencial antioxidante, apresentou uma IC_{50} de $0,10 \pm 0,01$ mM para a lipoperoxidação induzida pelo radical hidroxil em lipossomos de ASO (De LIMA et al., 2004). Com IC_{50} em 15 mg/mL, atribui-se ao α -ESA uma concentração de 0,054 mM, ou seja, em torno de metade da quantidade deste AG é necessária para inibir a mesma peroxidação promovida pela quercetina.

A atividade protetora do α -ESA corrobora com o efeito relatado por Dhar e colaboradores (DHAR, GHOSH E BHATTACHARYYA, 1999) para pequenas concentrações de α -ESA nos níveis de peroxidação lipídica no plasma, lipoproteína, membranas de eritrócitos e de tecidos do fígado não-enzimático de ratos. Em baixas concentrações, os ácidos graxos trienoicos conjugados, tais como o α -ESA, podem atuar na eliminação de radicais livres, eliminando ou reduzindo a formação de hidroperóxidos (ibid.). Além disso, é possível que a oxidação de α -ESA, resulte na formação de ácidos graxos dienoico conjugados que também atuam como antioxidantes (BELURY, 1995). Como a peroxidação lipídica também está relacionada com alterações nas propriedades físico-químicas da membrana (PETRESCU et al.,

2001; KUNIMOTO, INOUE e NOJIMA, 1981; VERMA, 1986; JACOB e MASON, 2005), este trabalho investigou a relação entre os efeitos antioxidantes observados de α -ESA e a sua influência na dinâmica molecular de membranas lipídicas.

5.3. Efeitos do α -ESA na dinâmica de membranas de fosfatidilcolina presentes em lipossomos de ASO

A caracterização dos efeitos causados pelo α -ESA nas propriedades dinâmicas da fosfatidilcolina de soja foi realizada utilizando as técnicas de HATR-FTIR, RMN, DSC e UV-visível. Tais medidas foram realizadas com a finalidade de comparar o comportamento de lipossomos de fosfatidilcolina de soja (presente na ASO) sem α -ESA com o daqueles contendo o ácido graxo.

Os espectros de HATR-FTIR de lipossomos de fosfatidilcolina de soja foram obtidos para monitoramento dos efeitos de diferentes concentrações de α -ESA em regiões específicas das fosfatidilcolinas. A Figura 23 mostra os espectros de fosfatidilcolina presente em lipossomos contendo ASO na ausência e na presença de α -ESA 30mg/ml. Para lipossomos puros, as seguintes bandas de vibração foram detectadas e analisadas: (a) $\nu_{as} PO_2^-$, a 1217 cm^{-1} , (b) $\nu_{as} CN^+C$, a 974 cm^{-1} , (c) $\nu_{as} NCH$, a 3.005 cm^{-1} (d) $\nu C=O$, em 1734 cm^{-1} , (e) $\nu_s CH_2$ e $\nu_{as} CH_2$, a 2853 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} , respectivamente (Figura 23). As frequências de vibração dos estiramentos relacionados com os grupos de fosfatidilcolina de soja estão de acordo com a literatura (LÓPEZ-GARCÍA et al., 1993). Entretanto, para os espectros correspondentes a lipossomos contendo ASO, todos os valores de frequência dos grupos de

fosfatidilcolina na ausência e aqueles na presença de 30 mg/mL de α -ESA mantiveram-se praticamente os mesmos.

A influência α -ESA em cada um destes grupos de lipídios também foi estudada por análise de alterações nos valores de frequência, assim como a largura de banda a $\frac{3}{4}$ da altura do pico. Estes resultados, juntamente com os obtidos a partir das outras técnicas utilizadas, foram interpretados considerando-se o efeito do ácido graxo nas regiões polares, de interface e hidrofóbicas da fosfatidilcolina.

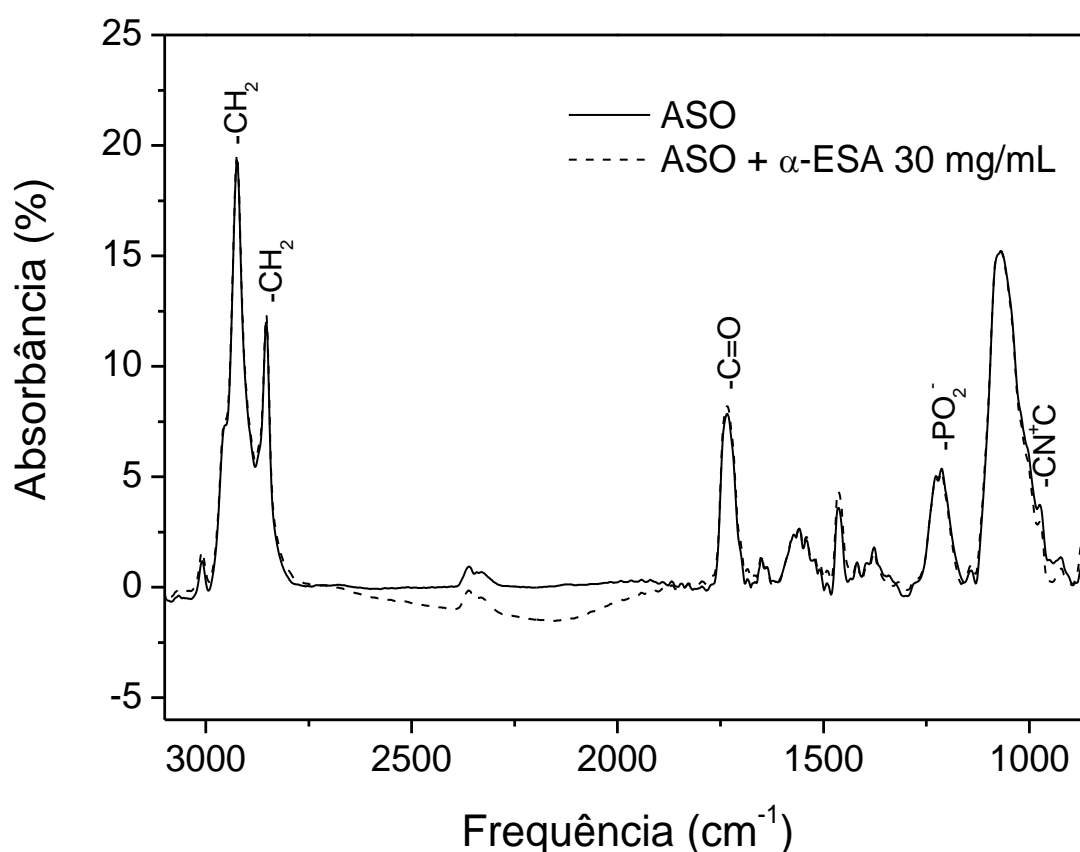


Figura 23. Espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presentes em lipossomos de asolecitina (ASO) puros e na presença de 30 mg/mL de ácido α -eleostearico (α -ESA), equivalente a uma proporção α -ESA:ASO de 0,2 (m,m).

5.4. Interação do α -ESA com a cabeça polar da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO

Sabe-se que a bicamada de fosfatidilcolina consiste em um conjunto de associações eletrostáticas intermoleculares carregadas positivamente nos grupos N-metil e negativamente nos grupos fosfato. Assim, é importante avaliar a influência do α -ESA na dinâmica destes dois grupos da cabeça polar dos lipídios, já que eles desempenham um papel importante na manutenção da configuração da bicamada e nas propriedades de barreira da membrana (YEAGLE e MARTIN, 1978.).

A respeito do efeito de α -ESA na região polar de lipídios, a Figura 24 mostra uma ampliação dos espectros de HATR-FTIR de lipossomos de ASO puros e na presença de 30 mg/mL de α -ESA, na região do $\nu_{as} PO_2^-$. Em ambas as amostras, a banda do $\nu_{as} PO_2^-$ apresenta um “ombro” em um valor de frequência menor. Isto ocorre em função das interações fracas via ligação de hidrogênio entre os grupos fosfato e a colina lipídica (CIESLIK-BOCZULA et al., 2009; BANERJEE, PAL e GUHA, 2012). Como citado anteriormente, a análise da banda de $\nu_{as} PO_2^-$ é útil para monitorar o estado de hidratação dos grupos de cabeça polar de fosfolipídios (LÓPEZ-GARCÍA et al., 1993). Um aumento de frequência da banda de $\nu_{as} PO_2^-$ induzido por uma molécula exógena indica uma desidratação do grupo fosfato, enquanto que um decréscimo na mesma frequência corresponde à hidratação da região (CASAL, MANTSCH e HAUSER, 1989). Uma vez que nenhuma variação na frequência de $\nu_{as} PO_2^-$ foi observada após a interação com α -ESA, pode-se concluir que o ácido graxo não provocou variações nas quantidades de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato

lipídico e os átomos de hidrogênio do α -ESA ou de água (KAN-ZHI et al., 1996). Entretanto, na Figura 24, pode-se observar que α -ESA reduz a largura da banda de ν_{as} PO_2^- em cerca de 2 cm^{-1} , sugerindo que o ácido graxo pode causar uma pequena ou indireta diminuição na dinâmica do grupo fosfato em lipossomos de ASO (ver item 3.1).

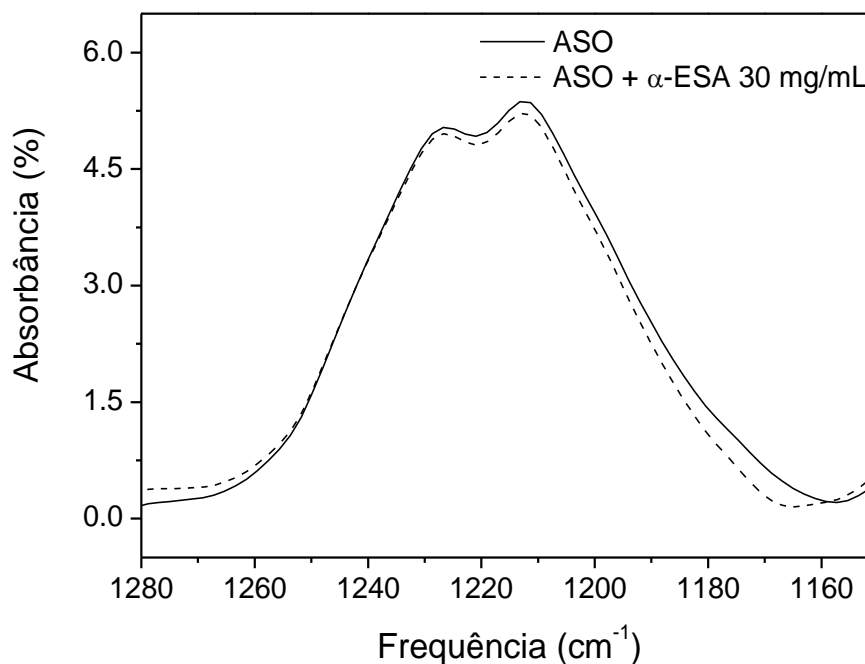


Figura 24. Ampliação dos espectros de FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de asolecitina (ASO) puros e na presença de ácido α -eleosteárico (α -ESA) 30 mg/mL (o espectro completo está representado na Figura 23) na região do estiramento axial assimétrico do PO_2^- .

Sabe-se que as alterações relacionadas com a intensidade dos componentes do estiramento assimétrico da colina, ν_{as} CN^+C a 974 cm^{-1} , pode refletir alterações de conformação deste grupo em função da sua distância em relação ao grupo fosfato. A

intercalação de moléculas de água entre os dois grupos carregados pode também mudar os estiramentos assimétricos da colina, o que inclui também o ν_{as} NCH a 3005 cm^{-1} (GRDADOLNIK, KIDRIC e HADZI, 1991). De acordo com a Figura 23, a não variação de valores de frequência ou de forma das bandas de colina indica que o α -ESA não influencia na hidratação do grupo polar da cabeça lipídica. Estes resultados estão de acordo com o comportamento inalterado em relação à frequência da banda de ν_{as} PO_2^- na presença de α -ESA.

De forma a obterem-se mais informações acerca do efeito do α -ESA na dinâmica da cabeça polar de fosfatidilcolina presente em ASO, foram realizadas medidas de RMN de T_1 para os núcleos de ^1H da colina lipídica. A Figura 25 mostra as curvas de T_1 de ^1H relacionadas com lipossomos de ASO na ausência e na presença de 30 mg/mL de α -ESA. A presença do ácido graxo nas membranas parece aumentar o T_1 da região de colina lipídica de $0,3\text{ s}$ (valor correspondente ao lipossomo de ASO puro) para $0,5\text{ s}$ (valor correspondente ao lipossomo de ASO na presença de α -ESA). Esta diferença de cerca de 30% pode refletir uma discreta redução na mobilidade da colina (De LIMA et al., 2007; LEPORE, ELLENA e CAFISO, 1992). Dado que o aumento de T_1 está relacionado com um aumento dos valores de τ_c , o comportamento induzido por α -ESA na colina parece corroborar com um efeito de ordenamento na região de colina lipídica. As conclusões relativas aos grupos fosfato lipídico e colina, obtidas por meio de técnicas de FTIR e RMN sugerem que α -ESA causa um efeito discreto de ordenação em grupos presentes na cabeça polar da fosfatidilcolina presente em lipossomos contendo ASO.

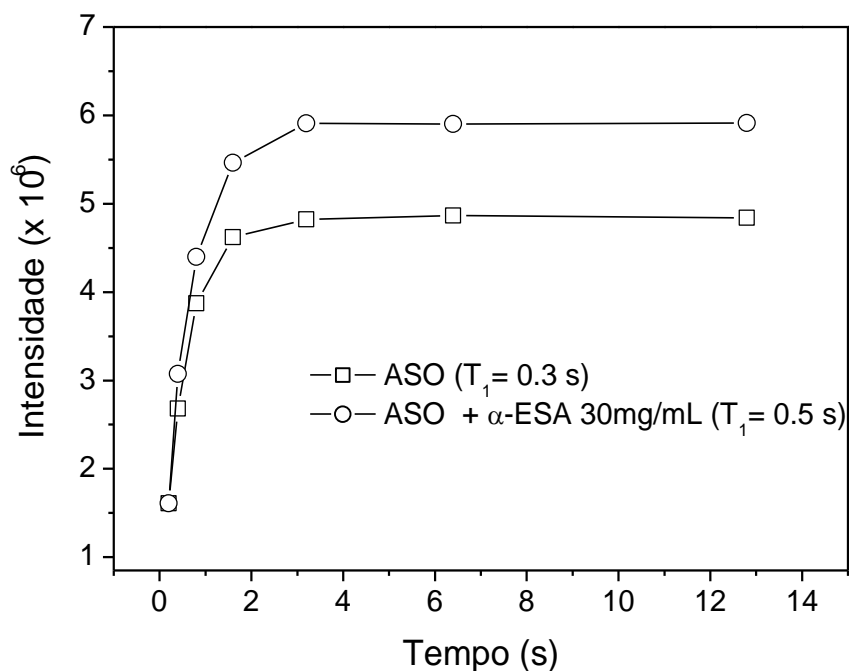


Figura 25. Tempo de relaxação longitudinal (T_1) de ^1H da colina na ausência (PC, quadrados abertos) e na presença de 30 mg/mL de ácido α -eleosteárico (α -ESA:PC = 0,2, m/m, círculos abertos). Os dados de ^1H T_1 foram alcançados a 60 MHz, a 23 °C, utilizando um intervalo de tempo de correlação (τ_c) de 0,2-102,4 s.

5.5. Influência do α -ESA na região de interface da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO

Os efeitos do α -ESA na região de interface da fosfatidilcolina foram estudados através da análise do ν C=O (1734 cm^{-1} , frequência em lipossomos de ASO puros) do lipídio, na presença e na ausência do ácido graxo. A Figura 26 demonstra a variação da frequência de HATR-FTIR das bandas de ν C=O em função de diferentes concentrações de α -ESA. Pela análise da Figura 23, nenhuma alteração de frequência

em ν C=O da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO foi observada após a interação com o α -ESA. Como citado anteriormente, o estiramento da banda ν C=O está relacionado a mudanças no seu ambiente, tais como ligações de hidrogênio ou polaridade (ARRONDO e GOÑI, 1998). A variação nula de frequência entre as bandas de ν C=O em lipossomos de ASO puros e na presença de α -ESA (Figura 23) sugerem que o ácido graxo não interage via ligação hidrogênio com o grupo carbonila da fosfatidilcolina. As variações na largura da banda da C=O em função do aumento nas concentrações de α -ESA estão apresentadas na Figura 26. A partir desta figura, pode-se observar que as concentrações crescentes de α -ESA reduziram os valores de largura da banda de ν C=O. Na concentração de 30 mg/mL, o ácido graxo parece ser responsável por uma diminuição da largura da banda de ν C=O de 15 cm^{-1} , em lipossomas puros, para $13,3\text{ cm}^{-1}$, o que corresponde a uma redução de 11 % na largura inicial de banda.

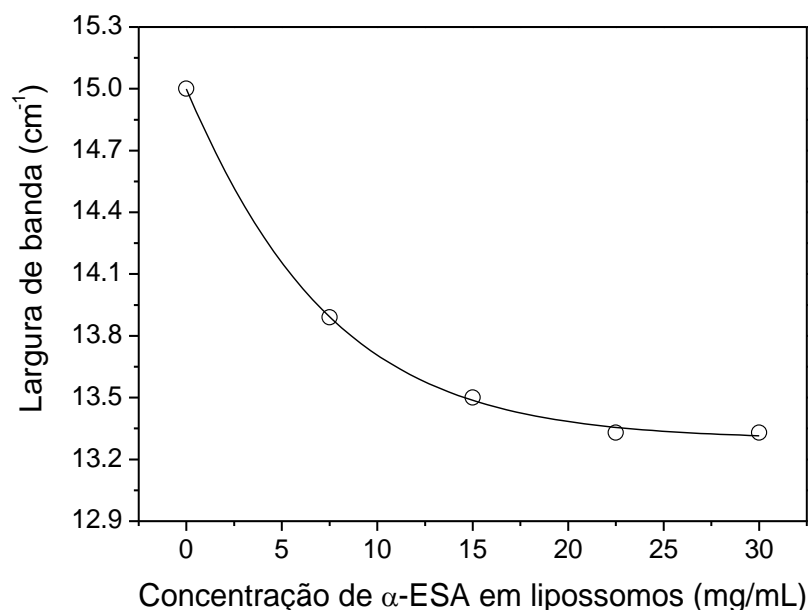


Figura 26. Variações da largura de banda do estiramento C=O da fosfatidilcolina presente em lipossomos de asolecitina (ASO) após interação com diferentes concentrações de ácido α -eleosteárico (α -ESA).

A amplitude da banda ν C=O parece ser atribuível às absorções de éster da carbonila localizados em sn-1 e sn-2 da cadeia, os quais não são equivalentes (WONG e MANTSCH, 1988). A diminuição na largura da banda ν C=O pode ser atribuída à existência de grupos ésteres da carbonila altamente imobilizados nas cadeias lipídicas. Sabe-se que a conversão dos lipídios de estados líquido cristalinos para a fase de gel coincide com uma mudança a partir de uma banda mais larga a um estreitamento de ν C=O (LEWIS et al., 1990; LEWIS e MCELHANEY, 2002). Neste trabalho, os resultados sugerem que o efeito de ordenamento de α -ESA ocorre não só na região polar dos lipídios, mas também afeta a região interfacial de fosfatidilcolina presente em lipossomas de ASO.

5.6. Efeitos do α -ESA nos metilenos da cadeia acil de fosfatidilcolina presentes em lipossomos de ASO

Como citado anteriormente, alterações nas frequências de HATR-FTIR de ν_s CH₂ e ν_{as} CH₂ observadas em 2853 cm⁻¹ e 2924 cm⁻¹, respectivamente, em lipossomos de ASO, podem refletir o grau de ordem conformacional, bem como a isomerização trans/gauche no sistema lipídico (SEVERCAN, SAHIN e KAZANCI, 2005). A partir da análise da Figura 23, não foi observada influência de α -ESA nas frequências de ν_s CH₂ e ν_{as} CH₂. Assim, o ácido graxo não parece influenciar a isomerização trans/gauche do sistema lipídico. Para o ν_{as} CH₂ não houve mudança em relação à largura da banda. Foi observado, entretanto, um efeito do ácido graxo, em diferentes concentrações, sobre as larguras de banda do ν_s CH₂ (Figura 27).

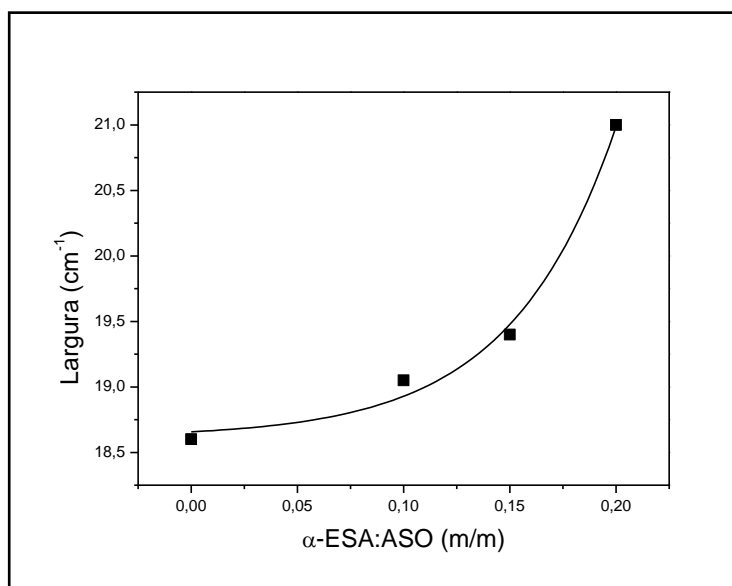


Figura 27. Efeito de diferentes concentrações de ácido α -eleostearico (α -ESA) sobre as larguras de banda do ν_s CH₂ de fosfatidilcolina de soja.

A partir da Figura 27, pode-se observar que o α -ESA é responsável pelo alargamento da ν_s CH₂ de um modo concentração-dependente. Após a incorporação de 30 mg/mL de α -ESA, a largura de banda ν_s CH₂ sofreu um alargamento de 18,6 cm⁻¹ (em lipossomos de ASO puros) para 21 cm⁻¹. Esta variação de 2,4 cm⁻¹, induzida por α -ESA, na banda de ν_s CH₂ corresponde a um alargamento de cerca de 13%. Como citado anteriormente, um alargamento de 2,4 cm⁻¹ está na faixa de valores esperados para um efeito de desordem no sistema lipossomal (MANNOCK, LEWIS e MCELHANEY, 2010). Como não foram observadas alterações nas frequências do estiramento CH₂ das cadeias acil, é possível que o aumento na mobilidade de grupos CH₂ promovido pelo α -ESA não esteja relacionado com a conversão de confôrmeros trans para gauche (CASAL, MANTSCH e HAUSER, 1989).

Mais informações sobre o efeito de α -ESA nas cadeias de hidrocarbonetos de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO foram obtidas por análise calorimétrica. Experimentos com DSC foram realizados a fim de determinar a influência α -ESA sobre o fluxo de calor relacionado com a transição de fase da fosfatidilcolina e da ordem. Em lipossomas de ASO, observou-se uma transição endotérmica, demonstrada na faixa negativa de -40 a -18 °C (Figura 28). Esta faixa de temperatura é esperada para fosfatidilcolinas insaturadas hidratadas, tais como o ácido oleico (LYNCH e STEPONKUS, 1989; ULRICH et al., 1994).

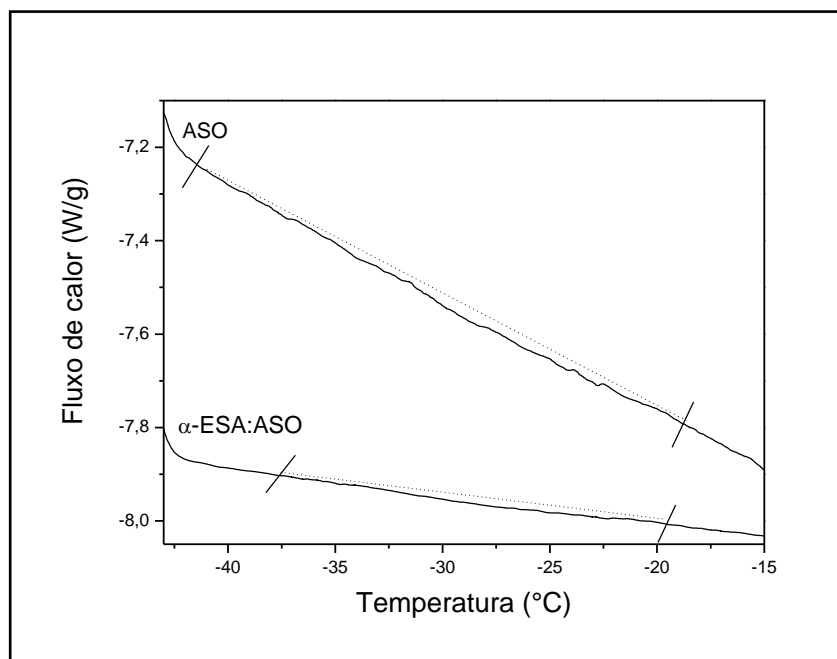


Figura 28. Medidas de DSC para lipossomos de asolecitina (ASO) com e sem ácido α -eleosteárico (α -ESA) incorporado (α -ESA:ASO).

A partir desta transição, calculou-se a variação de entalpia de transição de fase (ΔH) para os lipossomos na ausência e na presença de α -ESA. Estes resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Influência do ácido α -eleosteárico (α -ESA) nos valores de variação de entalpia (ΔH) da fosfatidilcolina de soja (ASO).

Amostra	ΔH (J/g)
ASO	1,97
α -ESA:ASO 0,05 (m/m)	0,92
Variação	1,05

A análise indica que o α -ESA reduziu o valor de ΔH dos lipossomos de ASO em aproximadamente 53%. Assim, é possível que o ácido graxo promova um rearranjo molecular de fosfatidilcolina para um estado mais desordenado, que corrobora com os resultados de FTIR. O efeito de desordem causada por α -ESA em membranas fosfolipídicas pode ser atribuído à localização da dupla ligação *cis* do ácido graxo (ZHAO et al., 2011). A ligação dupla *cis* do α -ESA tem uma conformação normalmente "angular ou inclinada" que pode afetar o empacotamento da região hidrofóbica da membrana fosfatidilcolina. Subbayah e colaboradores (Subbayah et al., 2010) observaram um efeito fluidificante para lipossomos de dipalmitoilfosfatidilcolina depois da inserção de moléculas de fosfatidilcolina contendo um ácido 9-*cis*,11-*trans*-linoleico conjugado numa das sua cadeia acil. Estes autores também relatam que a conjugação de ligações duplas tem uma forte influência na estrutura física do ácido graxo e é um fator importante associado ao efeito fluidização da membrana.

5.7. Medidas de Turbidez

O efeito global de α -ESA em membranas de ASO foi investigado através de estudos de turbidez a 400 nm. A Figura 29 mostra a influência de diferentes concentrações do ácido graxo sobre a turbidez dos lipossomos.

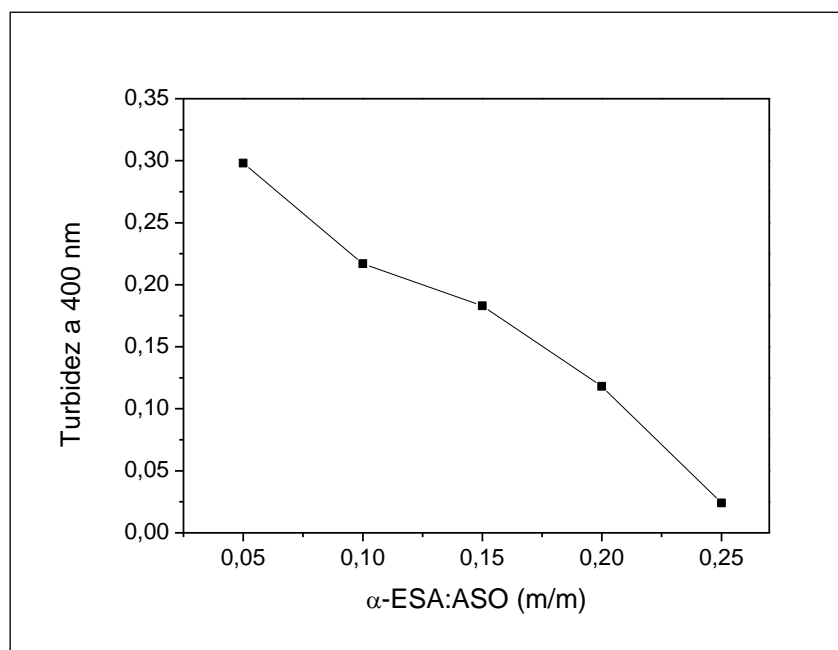


Figura 29. Mudanças de turbidez para lipossomos de asolecitina (ASO) após a interação com diferentes concentrações de ácido α -eleosteárico (α -ESA). Os valores de densidade óptica foram obtidos a 400 nm em um espectrofotômetro de UV-visível.

Uma redução correspondente a 20% do valor inicial de turbidez dos lipossomos de ASO foi observada após a incorporação de 30 mg/mL de α -ESA na membrana. A diminuição no valor de densidade óptica está relacionada a uma redução no tamanho das partículas. Estes efeitos podem causar um decréscimo na turbidez do sistema (KORKMAZ e SEVERCAN, 2005; KAZANCI, SEVERCAN e ZORLU, 2000). A redução da turbidez da membrana também pode ser observada na transição da fase gel para a líquido-cristalina, principalmente devido às alterações no índice de refração dos lipídios como consequência de variações na densidade do lipídio durante a fusão (YI e MACDONALD, 1973). Pode ser visto na Figura 29 que o α -ESA tem um efeito global reduzindo a fluidez de lipossomos de fosfatidilcolina.

Este efeito global está suportado pelos resultados de HATR-FTIR, RMN e pelos estudos de DSC. É importante observar que no pH fisiológico (7,4), o grupo carboxila de lipídios e ácidos graxos pode estar parcialmente protonado, gerando uma carga negativa na molécula (Massey, 2001). Assim, a interação dipolar entre o grupo carboxila do α -ESA e da região da colina na fosfatidilcolina pode refletir em mudanças relacionadas ao valor de T_1 da colina lipídica. Assim, esta interação pode ser responsável por um acréscimo de ordem nesta região polar. Como consequência da interação dipolar entre a colina de lipídios e o grupo carboxila do α -ESA, a ordem das regiões polar e interfacial de lipídios também pode ser afetada. Isso corrobora com o discreto efeito de ordenamento provocado pelo α -ESA no fosfato e grupos carbonila, observados pela técnica de HATR-FTIR.

As conclusões sobre a interação, bem como o efeito de ordenação de α -ESA na região lipídica polar corroboram também com estudos de ESR (ressonância paramagnética eletrônica, do inglês, *Electron Spin Resonance*) e RMN de ^1H , que investigaram o efeito de ácidos graxos, como ácido oleico e monoleína, na permeabilidade da fosfatidilcolina de ovo. Este estudo determinou que a interação entre os ácidos graxos insaturados com a cabeça polar fosfatidilcolina, assim como as suas cadeias graxas flexíveis levam a uma passagem da fosfatidilcolina de sua forma cilíndrica tradicional para um complexo de lipídico em forma de "cone" em que a região da cabeça polar tem uma área menor em relação à região hidrofóbica. Isto pode desestabilizar a configuração da bicamada, aumentando a permeabilidade da membrana (MURANUSHI et al., 1981).

Estudos anteriores relataram que os níveis de peroxidação lipídica da membrana são influenciados pela carga e pela difusão de espécies reativas, pela composição da

membrana no que diz respeito aos ácidos graxos insaturados, bem como as propriedades intrínsecas de compostos antioxidantes no sistema (De LIMA et al., 2004; KHAIRUTDINOV, CODDINGTON e HURST, 2000; KAGAN et al., 1990). As propriedades intrínsecas dos antioxidantes incluem a sua reatividade química, a sua distribuição entre as regiões de lipídios hidrofílicos e hidrofóbicos e a mobilidade dos lipídios que podem criar condições para a acessibilidade mútua entre as espécies reativas e os compostos antioxidantes (SERBINOVA et al., 1991). Em lipossomos de ASO, o efeito de ordem promovido pelo α -ESA na cabeça lipídica polar pode limitar a difusão de \bullet OH para esta região da membrana (Figura 30). A influência do empacotamento em difusão de espécies reativas de membrana também foi relatado por Khairutdinov e colaboradores para o peroxinitrito (KHAIRUTDINOV, CODDINGTON e HURST, 2000). Por outro lado, o efeito de desordem global do α -ESA em membranas de fosfatidilcolina, provavelmente atribuído a sua dupla ligação *cis*, pode facilitar as interações entre o \bullet OH e α -ESA. Isso pode facilitar uma atividade antioxidante de α -ESA. A relação entre os níveis de peroxidação lipídica e da ordem de regiões específicas da membrana foi previamente relatada para outras moléculas antioxidantes, como a melatonina e alfa tocoferol (De LIMA et al., 2007; SERBINOVA et al., 1991).

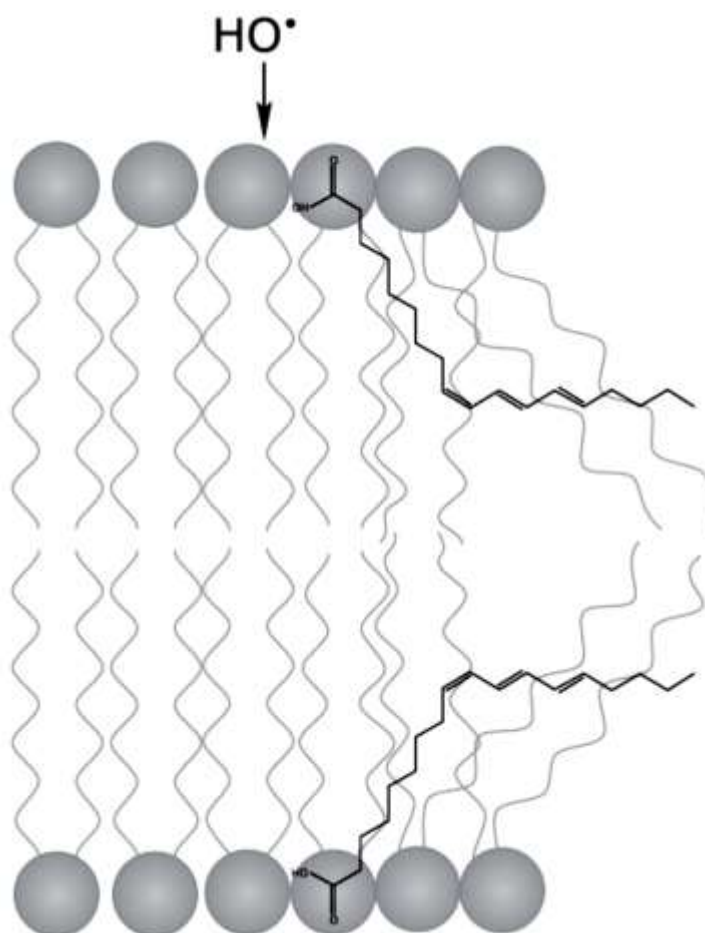


Figura 30. Representação do efeito promovido pelo ácido α -eleostearico (α -ESA) em lipossomos de asolecitina de soja (ASO).

Além das propriedades do α -ESA como sequestrador de espécies reativas, é possível que seu efeito na dinâmica da membrana fosfatidilcolina de soja contribua como um mecanismo secundário antioxidante contra os danos causados por espécies reativas.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi realizada a purificação e o isolamento do ácido α -eleosteárico a partir do óleo de tungue e investigamos sua influência na dinâmica de lipossomos constituídos por ASO. Acreditamos que este trabalho possa contribuir para o desenvolvimento de medicamentos que utilizem o α -ESA em sua composição.

Os resultados apontam detalhes de como é possível purificar o α -ESA e como ele interage com o modelo de membrana lipossomal:

- Na purificação do α -ESA a partir do óleo de tungue, obtivemos α -ESA com 95,9% de pureza quando recristalizado com acetona e com um rendimento de 24,98%. Quando recristalizado com solução etanólica (EtOH/água, 9:1), obteve-se uma pureza de 92,2%, menor em relação ao primeiro resultado, com um rendimento de 20,68% de α -ESA.
- A influência do α -ESA na peroxidação *in vitro* da membrana mostrou os efeitos das concentrações crescentes de α -ESA em lipossomos de ASO *in vitro* com peroxidação induzida pelo \bullet OH que parece ter uma atividade antioxidante *in vitro* contra o dano induzido por \bullet OH em lipossomos de ASO. A concentração inibitória de 50% da peroxidação (IC_{50}) foi atingida em 15 mg/mL de α -ESA. Na concentração de 22,5 mg/mL, o ácido graxo inibiu a peroxidação \bullet OH em ASO em aproximadamente 77%.
- Para os espectros de FTIR correspondentes a lipossomos contendo ASO, todos os valores de frequência dos grupos de fosfatidilcolina na ausência e aqueles na presença de 30 mg/mL de α -ESA mantiveram-se praticamente os mesmos.

- Nenhuma variação na frequência de $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ foi observada após a interação com α -ESA. Assim, pode-se concluir que o ácido graxo não provocou variações nas quantidades de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato lipídico e os átomos de hidrogênio do α -ESA ou de água. Contudo, pode-se observar que α -ESA reduziu a largura da banda de $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ em cerca de 2 cm^{-1} , sugerindo que o ácido graxo pode causar uma pequena ou indireta diminuição na dinâmica do grupo fosfato em lipossomos de ASO.
- A não variação de valores de frequência ou de forma das bandas de colina em FTIR indica que o α -ESA não influencia na hidratação do grupo polar da cabeça lipídica. Estes resultados estão de acordo com o comportamento inalterado em relação à frequência da banda de $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ na presença de α -ESA.
- Sobre efeito do α -ESA na dinâmica da cabeça polar de fosfatidilcolina presente em ASO, as medidas de RMN de T_1 para os núcleos de ^1H da colina lipídica indicaram que a presença do ácido graxo nas membranas parece aumentar o T_1 da região de colina lipídica. Esta diferença de cerca de 30% pode refletir uma discreta redução na mobilidade da colina. Portanto, o comportamento induzido por α -ESA na colina parece corroborar com um efeito de ordenamento na região de colina lipídica. As conclusões relativas aos grupos fosfato lipídico e colina, obtidas por meio de técnicas de FTIR e RMN sugerem que α -ESA causa um efeito discreto de ordenação em grupos presentes na cabeça polar da fosfatidilcolina presente em lipossomos contendo ASO.
- A variação nula de frequência entre as bandas de FTIR para $\nu \text{C=O}$ em lipossomos de ASO puros e na presença de α -ESA sugeriram que o ácido graxo não interage via ligação de hidrogênio com o grupo carbonila da fosfatidilcolina.

Observou-se, contudo, que as concentrações crescentes de α -ESA reduziram os valores de largura da banda de ν C=O. O ácido graxo parece ser responsável por uma diminuição da largura da banda de ν C=O em 11 %. A diminuição na largura da banda ν C=O pode ser atribuída à existência de grupos ésteres da carbonila altamente imobilizados nas cadeias lipídicas. Os resultados sugerem que o efeito de ordenamento de α -ESA ocorre não só na região polar dos lipídios, mas também afeta a região interfacial de fosfatidilcolina presente em lipossomas de ASO.

- Na cadeia acil, não foi observada influência de α -ESA nas frequências de ν_s CH₂ e ν_{as} CH₂ em FTIR. Assim, o ácido graxo não parece influenciar a isomerização trans/gauche do sistema lipídico. Para o ν_{as} CH₂ não houve mudança em relação à largura da banda. Foi observado, entretanto, um efeito do ácido graxo, em diferentes concentrações, sobre as larguras de banda do ν_s CH₂ em que pode-se observar que o α -ESA é responsável pelo alargamento de 13% da ν_s CH₂ de um modo concentração-dependente.
- As análises em DSC indicam que o α -ESA reduziu o valor de ΔH dos lipossomas de ASO em aproximadamente 53%. Assim, é possível que o ácido graxo promova um rearranjo molecular de fosfatidilcolina para um estado mais desordenado, que corrobora com os resultados de FTIR. O efeito de desordem causada por α -ESA em membranas fosfolipídicas pode ser atribuído à localização da dupla ligação *cis* do ácido graxo. A ligação dupla *cis* do α -ESA tem uma conformação normalmente "angular ou inclinada" que pode afetar o empacotamento da região hidrofóbica da membrana fosfatidilcolina.

- Uma redução correspondente a 20% do valor inicial de turbidez dos lipossomos de ASO foi observada após a incorporação de 30 mg/mL de α -ESA na membrana. Estes efeitos podem causar um decréscimo na turbidez do sistema. O α -ESA tem um efeito global reduzindo a fluidez de lipossomos de fosfatidilcolina.

7. REFERÊNCIAS

1. ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, pp. 102-109, 2000.
2. ARRONDO, J.L.R.; GOÑI, F.M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 96, pp. 53-68, 1998.
3. ARSOV, Z.; QUARONI, L.; Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids**, v. 150, pp. 35-48, 2007.
4. AUSSENAC, F.; LAGUERRE, M.; SCHMITTER, J.-M.; DUFOURC, E. J. Detailed structure and dynamics of bicelle phospholipids using selectively deuterated and perdeuterated labels. 2H NMR and molecular mechanics study. **Langmuir**, v. 19, pp. 10468-10479, 2003.
5. BANERJEE, S.; PAL, T.K.; GUHA, S.K. Probing molecular interactions of poly (styrene-co-maleic acid) with lipid matrix models to interpret the therapeutic potential of the co-polymer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1818, pp. 537-550, 2012.
6. BAYNES, J. W. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. **Diabetes**, v. 40, 1991.
7. BELURY, M.A. Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. **Nutr. Rev.**, v. 53, pp. 83-89, 1995.

8. BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, pp. 34-42, 2001.
9. BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 295-305, 1984.
10. BROWN, J. B. Low-temperature Crystallization of the Fatty Acids and Glycerides. **Chem. Rev.**, v. 29, n. 2, pp. 333–354, 1941.
11. BROWN, K. University of Florida (UF), 2008 - Center for Aquatic and Invasive Plants. Disponível em: <<http://plants.ifas.ufl.edu/node/31>>. Acesso em março de 2011.
12. BROWN, M.F. Theory of spin-lattice relaxation in lipid bilayers and biological membranes. Dipolar relaxation. **J. Chem. Phys.**, v. 80, pp. 2808–2831, 1984.
13. BURR, G. O.; BURR, M. M. On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. **J. Biol. Chem.**, v. 86, p. 587-621, 1930.
14. CAO, Y.; YANG, L.; GAO, H. L.; CHEN, J. N.; CHEN, Z. Y.; REN, Q. S. Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC–MS and NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 145, pp. 128–133, 2007.
15. CARLOTTI, C., AUSSENAC, F., DUFOURC, E. Towards high resolution ¹H-NMR in biological membranes: magic angle spinning of bicelles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1564, pp. 156-164, 2002.
16. CASAL, H.L.; CAMERON, D.G.; SMITH, I.C.P.; MANTSCH, H.H. *Acholeplasma laidlawii* membranes: a Fourier transform infrared study of the influence of protein on lipid organization and dynamics. **Biochemistry**, v. 19, pp. 444-451, 1980.

17. CASAL, H.L.; MANTSCH, H.H.; HAUSER, H. Infrared and ³¹P-NMR studies of the interaction of Mg²⁺ with phosphatidylserines: effect of hydrocarbon chain unsaturation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 982, pp. 228-236, 1989.
18. CASTELLI, F.; TROMBETTA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers, **J. Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, pp. 135-141, 1997.
19. CHANG, C.; WAN, S. China's Motor Fuels from Tung Oil. **Ind. Eng. Chem.**, v.39, n. 12, pp. 1543–1548, 1947.
20. CHEN, C.; TRIPP, C.P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1778, pp. 2266-2272, 2008.
21. CHEN, S.; SHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. **Eur. J. Biochem.**, v. 260, p. 726-735, 1999.
22. CHOI, S.H.; WARE, W.; LAUTERBACH, S.R.; PHILLIPS, W.M. Infrared spectroscopic studies on the phosphatidylserine bilayer interacting with calcium-ion — effect of cholesterol. **Biochemistry**, v. 30, pp. 8563–8568, 1991.
23. CHRISTIE, W. W. The AOCS Lipid Library (2011) – Part 5. Trienoic Fatty Acids. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org>>. Acesso em fev 2013.
24. CIESLIK-BOCZULA, K.; SZWED, J.; JASZCZYSZYN, A.; GASIOROWSKI, K.; KOLL, A. Interactions of dihydrochloride fluphenazine with DPPC liposomes: ATR-IR and P-31 NMR studies. **J. Phys. Chem. B**, v. 113, pp. 15495-15502, 2009.

25. De LIMA, V. R. **Desenvolvimento de estratégias para investigar a Localização e efeitos de fármacos incorporados em membranas lipídicas.** Santa Catarina: UFSC, 2009. Tese (Doutorado); Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
26. De LIMA, V. R.; CARO, M.S.B.; MUNFORD, M. L.; DESBAT, B.; DUFOURC, E.J.; PASA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Influence of melatonina on the order of phosphatidylcholine based membranes. **J. Pineal Res.**, v. 49, pp. 169-175, 2010.
27. De LIMA, V.R.; CARO, M.S.B.; TAVARES, M.I.B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **J. Pineal Res.**, v. 43, pp. 276-282, 2007.
28. De LIMA, V.R.; MORFIM, M.P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants. **Chem Phys Lipids**, v. 132, pp. 197-208, 2004.
29. DHAR, P.; GHOSH, S.; BHATTACHARYYA, D.K. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. **Lipids**, v. 34, pp. 109-114, 1999.
30. DUFOURC, E.J. Solid-state NMR in biomembranes, in: B. Larijani; C. Rosser; R. Woscholski (Eds.), *Chemical biology: applications and techniques*, John Wiley & Sons, London, pp. 113-131, 2006.
31. EL MAGHRABY, G.M.M.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Drug interactions and locations in liposomes: correlation with polar surface areas. **Int. J. Pharm.**, v. 292, pp. 179-185, 2005.

32. ENGBERTS, J. B. F. N.; HOEKSTRA, D. Vesicle-forming synthetic amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1241, pp. 323-340, 1995.
33. FEIGENSON, G.W.; CHAN, S.I. Nuclear magnetic relaxation behavior of lecithin multilayers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 96, pp. 1312-1319, 1974.
34. FENSKE, D.B.; JARRELL, H.C. Phosphorus-31 two-dimensional solid-state exchange NMR. Application to model membrane and biological systems. **Biophys. J.**, v. 59, pp. 55-69, 1991.
35. GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 7, pp.65-86, 1989;
36. GRDADOLNIK, J.; KIDRIC, J.; HADZI, D. Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles multilayers an infrared spectroscopic study. **Chem. Phys. Lipids**, v. 59, pp. 57-68, 1991.
37. HABER, F.; WEISS, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. **Proc. R. Soc. London Ser. A.**, v. 147, pp. 332-351, 138, 1934
38. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine.** New York: Oxford University Press, 2000.
39. HEREĆ, M.; ISLAMOV, A.; KUKLIN, A.; GAGOŚ, M.; GRUSZECKI, W.I. Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. **Chem. Phys. Lipids**, v. 147, pp. 78-86, 2007.
40. HILDITCH, T. P.; MORTON, R. A.; RILEY, J. P. The spectrographic determination of linoleic, linolenic and elaeostearic acids. **Analyst**, v. 70, pp. 68-74, 1945.

41. HOLMES, R. L.; PACK, F. C.; MINOR, J. C.; MCKINNEY, R. S. The characteristics of domestic tung oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 31, pp. 417–418, 1954.
42. HOPE, M.J.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; JANOFF, A.S.; CULLIS, P.R.; Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Phys. Lipids**, v. 40, pp. 89-107, 1986.
43. IGARASHI, M.; TSUZUKI, T.; KAMBE, T.; MIYAZAWA T. Recommended methods of fatty acid methylester preparation for conjugated dienes and trienes in food and biological samples. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 50, n. 2, pp.121-8, 2004.
44. JACOB, R. F.; MASON, R. P. Lipid peroxidation induces cholesterol domain formation in model membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 280, pp. 39380-39386, 2005.
45. JANSHOFF, A.; STEINEM, C.;Transport across artificial membranes—an analytical perspective. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, pp. 433-451, 2006.
46. KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; BAKAROVA, R.A.; STOYTCHEV, T.S.; ERIN, A.N.; PRILIPKO, L.L.; EVSTIGNEEVA, R.P. Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol: the role of the hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, pp. 2403-2413, 1990.
47. KAN-ZHI, L.; JACKSON, M.; SOWA, M.G.; HAISONG, J.; DIXON, I.M.C.; MANTSCH, H.H. Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy. **Biochimi. Biophys. Acta**, v. 1315, pp. 73-77, 1996

48. KAUTZ, J. **Síntese de biodiesel etílico a partir do óleo de Tungue (*Aleurites fordii*)**. Rio Grande-FURG. 2010. Dissertação de mestrado; Universidade Federal do Rio Grande, 2010.
49. KAUTZ, J.; LYSYK, G.; D'OCA, M. G. M., CLEMENTIN, R. M. Extração do óleo de tungue (*Aleuritis Fordii*) para produção de biodiesel. **Anais do XVI Encontro de Química da Região Sul** - Santa Catarina, 2008.
50. KAZANCI, N.; SEVERCAN, F.; ZORLU, F. Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations. **Biosci. Rep.**, v. 20, pp. 177–184, 2000.
51. KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicol.**, v. 149, pp. 43-50, 2000.
52. KHAIRUTDINOV, R.F.; CODDINGTON, J.W.; HURST, J.K. Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. **Biochemistry**, v. 39, pp. 14238-14249, 2000.
53. KOPPENOL, W.H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Lett.**, v. 264, pp. 165-167, 1990.
54. KORKMAZ, F.; SEVERCAN, F. Effect of progesterone on DPPC membrane: evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 440, pp. 141-147, 2005.
55. KROON, P.A.; KAINOSHO, M.; CHAN, S.I. Proton magnetic resonance studies of lipid bilayer membranes experimental determination of inter- and intramolecular nuclear relaxation rates in sonicated phosphatidylcholine bilayer vesicles. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 433, pp. 282–293, 1976.

56. KUNIMOTO, M.; INOUE, K.; NOJIMA, S. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 646, pp. 169-178, 1981.
57. LEE, D.C.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. **Biosci. rep.**, v. 6, pp. 235-256, 1986.
58. LEPORE, L.S.; ELLENA, J.F.; CAFISO, D.S. Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles. **Biophys. J.**, v. 61, pp. 767-775, 1992.
59. LEWIS, R.N.A.H.; MANNOCK, D.A.; MCELHANEY, R.N.; WONG, P.T.T.; MANTSCH, H.H. Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphism of 1,2-di-O-acyl-3-O (α -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols. **Biochemistry**, v. 29, pp. 8933-8943, 1990.
60. LEWIS, R.N.A.H.; MCELHANEY, R.N. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids**, v. 96, pp. 9–21, 1998.
61. LEWIS, R.N.A.H.; MCELHANEY, R.N. Vibrational spectroscopy of lipids, in: J. M. Chalmers, Griffiths, P.R. (Eds.), *The handbook of vibrational spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., pp. 3447–3464, 2002.
62. LI, F.; LAROCK, R. C. Synthesis, Structure and Properties of New TungOil-Styrene-Divinylbenzene Copolymers Prepared by Thermal Polymerization. **Biomacromolecules**, v. 4, pp. 1018-1025, 2003.
63. LÓPEZ-GARCÍA, F.; MICOL, V.; VILLALAÍN, J.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with

- phosphatidylserine in the presence of calcium. **Biochim Biophys Acta**, v. 1169, pp. 264-272, 1993.
64. LYNCH, D.V.; STEPONKUS, P.L. Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury. **Biochim Biophys Acta**, v. 984, pp. 267-272, 1989.
65. MANNOCK, D. A.; LEWIS, R.N.A.H.; MCELHANEY, R.N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1798, pp. 376-388, 2010.
66. MANRIQUE-MORENO, M.; GARIDEL, P.; SUWALSKY, M.; HOWE, J.; BRANDENBURG, K. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1788, pp. 1296–1303, 2009.
67. MANRIQUE-MORENO, M.; HOWE, J.; SUWALSKY, M.; GARIDEL, P.; BRANDENBURG, K. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. **Lett. Drug Des. Discovery**, v. 7, pp. 50-56, 2010.
68. [MANTSCH, H.H.; MCELHANEY, R.N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy.](#) **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, pp. 213–226, 1991.
69. MASSEY, J.B. Interfacial properties of phosphatidylcholine bilayers containing vitamin E derivatives. **Chem. Phys. Lipids**, v. 109, pp. 157-174, 2001.

70. MOON, H.; GUO, D.; LEE, H.; CHOI, Y.; KANG, J.; JO, K.; EOM, J.; YUN, C.; CHO, C. Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPAR α and inhibition of ERK 1/2. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 2, pp. 396–402, 2010.
71. MOURITSEN, O.G. Theoretical models of phospholipids phase transitions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, pp. 179-194, 1991.
72. MURANUSHI, N.; TAKAGI, N.; MURANISHI, S.; SEZAKI, H. Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer. **Chem. Phys. Lipids**, v. 28, pp. 269-279, 1981.
73. NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Silver ion chromatography and lipids. The AOCS Lipid Library (2009). Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org>>. Acesso em mar 2013.
74. OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.
75. OHVO-REKILÄ, H.; RAMSTED, B.; LEPPIMÄKI, P.; SLOTTE, J. P.; Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, pp. 66-97, 2002.
76. OHYASHIKI, T.; NUNOMURA, M. A marked stimulation of Fe³⁺-dependent lipid peroxidation in phospholipids liposomes under acidic conditions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1484, pp. 241-250, 2000.
77. PARDO, V. L.; FAGUNDES, C. A. M.; CALDAS, S. S.; KURZ, M. H.; CLEMENTIN, R. M.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Development and Validation of a Method for the Determination of Fatty Acid Methyl Ester Contents

- in Tung Biodiesel and Blends. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 89, n. 4, pp. 631-637, 2012.
78. PETRESCU, A.D.; GALLEGOS, A.M.; OKAMURA, Y.; STRAUSSERD, J.F.; SCHROEDER, F. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. **J. Biol. Chem.**, v. 276, pp. 36970-36982, 2001.
79. REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progr. Neurobiol.**, v. 56, pp. 359-384, 1998.
80. ROACH, J. A. G.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; KRAMER, J. K. G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, pp. 207-226, 2002.
81. SERBINOVA, E.; KAGAN, V.; HAN, D.; PACKER, L., Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. **Free Radic Biol Med**, v. 10, pp. 263–275, 1991.
82. SEVERCAN F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1668, pp. 215-222, 2005.
83. SHANG, Q.; JIANG, W.; LU, H.; LIANG, B. Properties of Tung oil biodiesel and its blends with 0# diesel. **Bioresource Technology**, v. 101, pp. 826–828, 2010.
84. SILVERSTEIN, R. M. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos/Robert M. Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle; trad. Ricardo Bicca de Alencastro. – Rio de Janeiro : LTC, 2007.

85. SÖDERLUND, T. **Membrane Interactions of Small Solutes. Studies with Drugs and Osmolytes.** Finland: UH, 2003. Tese (Doutorado); University of Helsinki, 2003.
86. STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, pp. 89-137, 1984.
87. SUBBAYAH, P.V.; SIRCAR, D.; AIZEZI, B.; MINTZER, E. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers on the biophysical and biochemical properties of model membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1798, pp. 506-514, 2010.
88. TAMM, L.K.; TATULIAN, S.A.Q. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. **Rev. Biophys. J.**, v. 30, pp. 365-429, 1997.
89. TATULIAN, S.A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids. **Biochemistry**, v. 42, pp. 11898-11907, 2003.
90. TEIXEIRA, A.; MORFIM, M.P.; CORDOVA, C.A.S.; CHARÃO, C.C.T.; LIMA, V.R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Melatonin protects against pro oxidant enzymes and reduces LPO in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 262-268, 2003.
91. THOMAS, A. W.; THOMSON, J. C. The Preparation of Pure Eleostearic Acids from Chinese Wood Oil. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 56, n. 4, pp. 898–898, 1934.
92. TIBERG, F.; Improving drug delivery by use of lipid self-assembly particle structures- beyond liposomes and emulsions. *Business Briefing Pharma Outsourcing*. Disponível em: <http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/Tiberg.pdf>, 2005.

93. TOYRAN, N.; SEVERCAN, F. Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study. **J. Mol. Struct.**, v. 123, pp. 165-176, 2003.
94. TSUZUKI, T.; TOKUYAMA, Y.; IGARASHI, M.; MIYAZAWA T. Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 8, pp.1417-1425, 2004b.
95. TSUZUKI, T.; TOKUYAMA, Y.; IGARASHI, M.; NAKAGAWA, K.; Ohsaki, Y.; Komai, M.; MIYAZAWA T. α -Eleostearic Acid (9Z11E13E-18:3) Is Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid (9Z11E-18:2) in Rats. **J. Nutr.**, v. 134, pp. 2634-2639, 2004a.
96. ULRICH, A.S.; SAMI, M.; WATTS, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1191, pp. 225-230, 1994.
97. VAN MEER, G.; VAN GENDEREN, I.L. Physicochemical questions in lipid sorting. In: HILDESON, H.J.; RALSTON, G.B. **Physicochemical methods in the study of biomembranes**. New York, 1994.
98. VERMA, S. P. Low levels of irradiation modify lipid domains in model membranes: a laser Raman study. **Radiat. Res.**, v. 107, pp. 183-193, 1986.
99. WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochem.**, v. 33, pp. 4449-4453, 1994.
100. WANG C.; JONES F. N. Stability and Film Properties of Tung Oil Modified SoybeanAlkyd Emulsion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 78, pp. 1698–1706, 2000.

101. WONG, P.T.T.; MANTSCH, H.H. High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1,2-diacylphospholipids. **Chem. Phys. Lipids**, v. 46, pp. 213-224, 1988.
102. YANG, LIN; CAO, YING; CHEN, JING-NAN; CHEN, ZHEN-YU. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, 4212–4217, 2009.
103. YEAGLE, P. L. **The membranes of cells**. California: Academic Press, 1993.
104. YI, P.N.; MACDONALD, R.C. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine. **Chem Phys Lipids**, v. 11, pp. 114–134, 1973.
105. YIN, J.J.; SMITH, M.J.; EPPLEY, R.M.; PAGE, S.M.; SPHON, J.A. Effects of Fumosin B₁ on lipid peroxidation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1371, p. 134-142, 1998.
106. ZHANG, M.; CAO, Y.; HUANG, R. Primary Study on Purification of Eleostearic Acid. **Biomass Chemical Engineering**, v. 41, n. 2, 2007.
107. ZHAO, G.; SUBBAYAH, P.V.; CHIU, S.W.; JAKOBSSON, E.; SCOTT, H.L. Conjugated double bonds in lipid bilayers: a molecular dynamics simulation study. **Chem. Phys. Lipids**, v. 164, pp. 251-257, 2011.
108. ZHAO, L.; FENG, S.; KOCHERGINSKY, N.; KOTETSKI, I. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. **Int. J. Pharm.** 338, pp. 258-256, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1. Artigo submetido ao periódico *Bioorganic Chemistry*.

**EFFECTS OF α -ELEOSTEARIC ACID ON ASOLECTIN LIPOSOMES DYNAMICS:
RELEVANCE TO ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Robson Simplício de Sousa, Alessandro Oliveira de Moraes Nogueira, Viviane Gobel Marques, Rosilene Maria Clementin, Vânia Rodrigues de Lima.

Manuscript Number:

Title: EFFECTS OF α -ELEOSTEARIC ACID ON ASOLECTIN LIPOSOMES DYNAMICS: RELEVANCE TO ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY

Article Type: Regular Article

Keywords: α -eleostearic acid; asolectin; liposomes; lipid peroxidation; hydroxyl radical; FTIR; NMR; DSC.

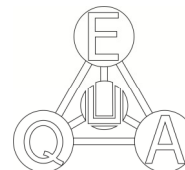
Corresponding Author: Dr. Vania Rodrigues de Lima, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Federal University of Rio Grande

First Author: Robson Simplício de Sousa

Order of Authors: Robson Simplício de Sousa; Alessandro Oliveira de Moraes Nogueira; Viviane Gobel Marques; Rosilene M Clementin; Vania Rodrigues de Lima, Ph.D.

Abstract: In this study, the effect of α -eleostearic acid (α -ESA) on the in vitro hydroxyl radical (\bullet OH)-induced lipid peroxidation of soybean asolectin (ASO) liposomes was investigated and correlated to changes caused by this fatty acid in the membrane dynamics. The influence of α -ESA on the dynamic properties of liposomes, such as hydration, mobility and order, were followed by horizontal attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (HATR-FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and UV-visible techniques. α -ESA showed an in vitro antioxidant activity against the damage induced by \bullet OH in ASO liposomes. The analysis of HATR-FTIR frequency shifts and bandwidths and 1 H NMR spin-lattice relaxation times, related to specific lipid groups, showed that α -ESA causes an ordering effect on the polar and interfacial regions of ASO liposomes, which may restrict the \bullet OH diffusion in the membrane. DSC enthalpy variation analysis suggested that the fatty acid promoted a disordering effect on lipid hydrophobic regions, which may facilitate interactions between the reactive specie and α -ESA. Turbidity results showed that α -ESA induces a global disordering effect on ASO liposomes, which may be attributed to a change in the lipid geometry and shape. Results of this study may allow a more complete view of α -ESA antioxidant mode of action against \bullet OH, considering its influence on the membrane dynamics.



Federal University of Rio Grande

Rio Grande, April 26th, 2013.

Dear Editor,

I have attached the manuscript entitled "Effects of α -eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: relevance to its antioxidant activity" by Robson Simplício de Souza, Alessandro Oliveira de Moraes Nogueira, Viviane Gobel Marques, Rosilene Maria Clementin and Vânia Rodrigues de Lima (corresponding author) to be submitted for publication in *Bioorganic Chemistry*. In the study reported in this paper, the antioxidant effect of α -eleostearic acid on the *in vitro* hydroxyl radical-induced lipid peroxidation of soybean asolectin liposomes was investigated and correlated to changes caused by this fatty acid in the membrane dynamics. The influence of α -eleostearic acid on the dynamic properties of liposomes, such as hydration, mobility and order, were followed by horizontal attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance, differential scanning calorimetry and UV-visible techniques. Results of this study may allow a more complete view of α -eleostearic acid antioxidant mode of action against hydroxyl radical, considering its influence on the membrane dynamics. Neither the manuscript nor its contents in some other form has been previously published by any of the authors. Besides, it is not under consideration for publication in any other journal. All authors have seen and approved the submission of this manuscript.

I am looking forward to your reply.

Sincerely yours,

Vânia Rodrigues de Lima, Ph.D.
Federal University of Rio Grande
School of Chemical and Food Engineering
Av. Itália km 8, s/n - Campus Carreiros
96.201-900 - Rio Grande, RS, Brazil
Tel. no.: +55 53 3293 5226

Reviewer Suggestions

1) **Dr. Marcela Manrique-Moreno:** Universidad de Antioquia/ Instituto de Química/ calle 70 No. 52 - 21 | Apartado Aéreo 1226 , Medellín , Colômbia.

Tel: +574219 8332

+574444 8332

E-mail: mmanrique@matematicas.udea.edu.co

2) **Dr. Maria Ines Bruno Tavares:** Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano/ Av. Horácio Macedo 2030, Bl J, Centro de Tecnologia/ Ilha do Fundão, 21941-598 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil / Caixa-postal: 68525

Tel: +552125628103

Fax: +552122701317

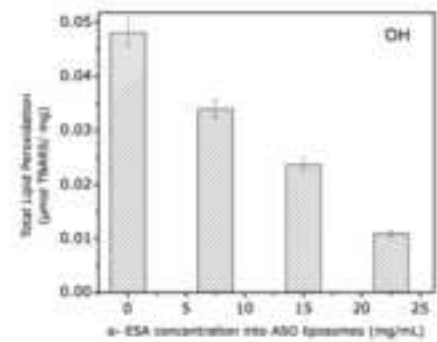
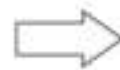
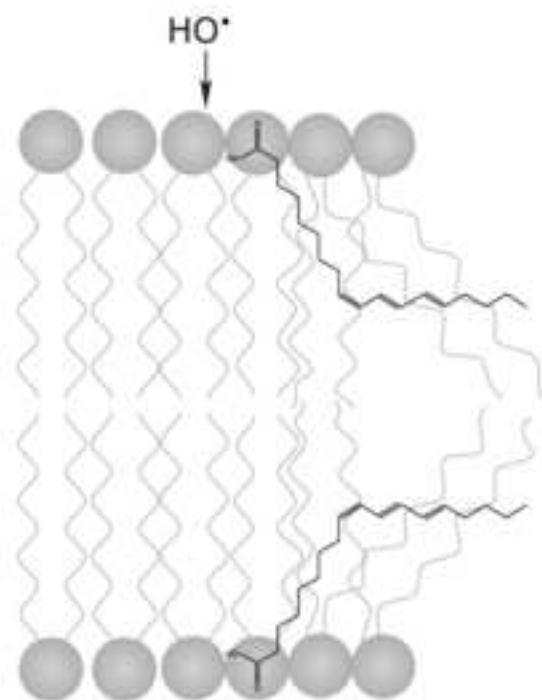
E-mail: mibt@ima.ufrj.br

3) **Dr. Fábio C.L. Almeida:** Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Ciências Biomédicas/ Departamento de Bioquímica/ Av. Carlos Chagas Filho 373 CCS - Bl. K Anexo CNRMN, Cid. Universitária, 21941-902 - Rio de Janeiro, RJ – Brazil.

Tel: +552131042326, Ramal: 34

Fax: +5521 31042326

E-mail: falmeida@cnrmn.bioqmed.ufrj.br



Highlights

- α -Eleostearic acid antioxidant effect was correlated to changes in lipid dynamics;
- The fatty acid orders lipid polar/ interfacial groups, as shown by FTIR and NMR;
- It may restrict the \bullet OH diffusion toward polar/ interfacial region of the membrane;
- α -Eleostearic acid disorders the lipid non-polar region, as shown by FTIR and DSC;
- This disorder may facilitate α -eleostearic acid and free radical interactions.

Research article

**EFFECTS OF α -ELEOSTEARIC ACID ON ASOLECTIN LIPOSOMES
DYNAMICS: RELEVANCE TO ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY**

Robson Simplício de Sousa, Alessandro Oliveira de Moraes Nogueira, Viviane Gobel Marques, Rosilene Maria Clementin, Vânia Rodrigues de Lima *

Research Group of Membrane Molecular Interactions, School of Chemical and Food Engineering, Post-graduation Program in Technological and Environmental Chemistry, Federal University of Rio Grande, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande-RS, 96203-900, Brazil;

* Corresponding author: Vânia Rodrigues de Lima, Ph.D., Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, Campus Carreiros, Rio Grande-RS, 96203-900, Brazil. Tel: +55 53 32935226; Fax: +55 53 32336990, E-mail address: vrlima23@hotmail.com

Abstract

In this study, the effect of α -eleostearic acid (α -ESA) on the *in vitro* hydroxyl radical (\bullet OH)-induced lipid peroxidation of soybean asolectin (ASO) liposomes was investigated and correlated to changes caused by this fatty acid in the membrane dynamics. The influence of α -ESA on the dynamic properties of liposomes, such as hydration, mobility and order, were followed by horizontal attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (HATR-FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and UV-visible techniques. α -ESA showed an *in vitro* antioxidant activity against the damage induced by \bullet OH in ASO liposomes. The analysis of HATR-FTIR frequency shifts and bandwidths and ^1H NMR spin-lattice relaxation times, related to specific lipid groups, showed that α -ESA causes an ordering effect on the polar and interfacial regions of ASO liposomes, which may restrict the \bullet OH diffusion in the membrane. DSC enthalpy variation analysis suggested that the fatty acid promoted a disordering effect on lipid hydrophobic regions, which may facilitate interactions between the reactive specie and α -ESA. Turbidity results showed that α -ESA induces a global disordering effect on ASO liposomes, which may be attributed to a change in the lipid geometry and shape. Results of this study may allow a more complete view of α -ESA antioxidant mode of action against \bullet OH, considering its influence on the membrane dynamics.

Keywords: α -eleostearic acid; asolectin; liposomes; lipid peroxidation; hydroxyl radical; FTIR; NMR; DSC.

Introduction

The α -eleostearic acid (9Z11E13E octadecatrienoic acid, α -ESA) is a conjugated fatty acid (Figure 1) which can be obtained from tung (*Aleurites fordii*) oil [1]. Its π conjugation system may be responsible for prooxidant or antioxidant activities. On one hand, α -ESA shows a selective and considerable suppressive effect on tumor growth via induction of apoptosis by promoting lipid peroxidation in membranes [2, 3]. On the other hand, α -ESA can reduce the levels of lipid peroxidation caused by oxidative stress in plasma, lipoproteins and erythrocyte membrane [4].

Figure 1

It is known that lipid peroxidation is related to significant modifications in the membranes, such as the rearrangement or loss of double bonds, variations in membrane fluidity degree, increase of permeability and changes in thermotropic phase properties [5-8]. Exogenous molecules which can affect lipid peroxidation levels may also cause changes in membrane properties and dynamics [9-11]. To the best of our knowledge, the effects of α -ESA in membrane physico-chemical properties have not been completely elucidated. Thus, it is important to establish a basic knowledge about the interactions concerning α -ESA and membranes in order to contribute to better understanding of its effects on the membrane dynamics and lipid peroxidation process.

The molecular dynamics of the membrane can be investigated by models such as liposomes, which are suitable for *in vitro* studies of structure and properties. Liposomal systems facilitate the control of phospholipid composition, structure and dynamics [12, 13]. In this study, the effect of α -ESA on the *in vitro* hydroxyl radical (\bullet OH) - induced lipid peroxidation of soybean asolectin (ASO) liposomes was studied and correlated to the fatty acid influence on the membrane dynamics. It is worth mentioning that ASO contains a mixture of phospholipids, which includes the soybean phosphatidylcholine (SPC, Figure 2).

Figure 2

The influence of α -ESA on liposome dynamic properties, such as hydration, mobility and order, were followed by horizontal attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (HATR-FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) techniques and turbidity essays.

Abbreviations: ASO, soybean asolectin; DSC, differential scanning calorimetry; ΔH , enthalpy variation; α -ESA, α -eleostearic acid; FTIR, Fourier transform infrared spectroscopy; HATR-FTIR, horizontal attenuated total reflection - Fourier transform infrared spectroscopy; $\cdot\text{OH}$, hydroxyl radical; MLV, multilamellar large vesicles; NMR, nuclear magnetic resonance; S.D., standard deviation; SPC, soybean phosphatidylcholine; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TCA, trichloroacetic acid; τ , correlation time; ν , stretching vibration.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Soybean asolectin (ASO, containing 25% of SPC), salts, tricine, deuterated water/ sodium 3-(trimethylsilyl)-[2,2,3,3-²H₄]-1-propionate (TSP, 0.05%) and thiobarbituric acid were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide, phosphate buffer (KH₂PO₄) and trichloroacetic acid (TCA) were purchased from Synth (São Paulo, SP, Brasil). Lipids were used without further purification and all the other chemicals were of analytical grade.

2.2. Preparation of α -ESA

α -Eleostearic acid was obtained from tung oil, which was purchased from Campestre Ltda (São Paulo, SP, Brazil). It was purified by saponification of 25 g tung oil with KOH/CH₃CH₂OH and neutralized by H₂SO₄ [14]. α -ESA was isolated from the other fatty acids by recrystallization using acetone [15].

2.3. Preparation of liposomes

Multilamellar large vesicles (MLV) containing ASO 150 mg/mL were produced pure or loaded with α -ESA, through lipid co-solubilization in CHCl₃ followed by solvent evaporation under vacuum. The dried films were then resuspended at room temperature from the walls of a round bottom flask by vortexing in tricine/MgCl₂ buffer 10 mM, pH 7.4 [16]. In order to prepare liposomes which contained α -ESA, different fatty acid concentrations were added during the solvent co-solubilization process [17]. The α -ESA concentrations added to liposomes ranged from 0 to 30 mg/mL.

2.4 Lipid peroxidation essays

Peroxidation of ASO liposomes was induced by hydroxyl radical (\cdot OH). \cdot OH was produced from the reaction of H₂O₂ 2.8mM, FeCl₃ 0.02mM and ascorbate 0.1mM, adapted from the study carried out by Halliwell and co-

workers [18]. $\cdot\text{OH}$ was added to a dispersion of ASO liposomes pure or containing different concentrations of α -ESA (ranging from 0 to 30 mg/mL) and KH_2PO_4 10mM at pH 7.4. The samples were then incubated for 30 min at 37°C. The lipid peroxidation level was obtained by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method [19, 20]. This method is based on the quantification of the complex produced by the reaction between malondialdehyde and thiobarbituric acid, in the presence of TCA. The amount of TBARS was calculated from optical densities at 535 nm, obtained by a Shimadzu UV-2550 UV-vis spectrophotometer (Kyoto, JP), using an extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Results were shown as mean \pm standard deviation (S.D.) of triplicates from three independent experiments. In all experiments, controls were obtained by adding reagents except lipid membranes in the reaction medium.

2.5. HATR-FTIR experiments

HATR-FTIR measurements were performed using a Shimadzu IR Prestige-21 spectrometer (Kyoto, JP) at 23°C. ASO liposomes 150 mg/mL, pure or loaded with α -ESA (in the concentration range from 0 to 30 mg/mL) were deposited on a ZnSe crystal support and immersed into the tricine/ MgCl_2 buffer 10mM, pH 7.4. Interferograms were averaged for 50 scans and recorded in the frequency range from 400 to 4000 cm^{-1} . The spectra were analyzed by Shimadzu IR solution software 1.5. Frequency variations were detected through the analysis of α -ESA-induced shifts of ASO vibrational bands. Changes in the bandwidth of the lipid groups stretching bands were measured relative to a straight base line at $\frac{3}{4}$ of peak height position. The following lipid group vibrations were analyzed: the phosphate antisymmetric stretching vibration, in the range of frequency from 1260 to 1220 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$); the choline antisymmetric stretching vibrations, in frequency values around 970 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$) and near 3005 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{NCH}$); the carbonyl stretching mode, in the frequency range from 1725 to 1740 cm^{-1} ($\nu \text{C=O}$); the symmetric and antisymmetric stretching vibrations of the acyl chains methylenes, with the frequency values around 2850 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$) and 2920 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$),

respectively. It is worth pointing out that these vibrations are related to phosphatidylcholine groups [21, 22].

2.6. NMR studies

Choline ^1H spin lattice relaxation times (T_1) of ASO liposomes, empty or loaded with α -ESA, were obtained at 60 MHz by a NMR Anasazi Instrument spectrometer (Indianapolis, USA), by inversion recovery pulse sequences. The correlation time (τ) values ranged from 0.2 to 102.4 seconds. Temperature was held constant at 23°C. Chemical shifts were referenced to TSP (0 ppm) [9]. Relaxation time values and relative intensities were obtained by fitting the exponential data to the NUTS code.

2.7. DSC measurements

DSC measurements of ASO liposomes, pure or loaded with α -ESA, were performed by a TA Instrument 2010 DSC cell (New Castle, DE). The heating rate was set to 1 °C/min in a temperature range from 10 to 60°C, under nitrogen flow (50/50 mL min⁻¹). An empty aluminium pan was used as reference [9]. The ΔH was obtained by integrating the area under the DSC peak using the Software Universal 4.0 C from TA Instruments.

2.8. Turbidity essays

Turbidity measurements of liposomes containing ASO 150 mg/mL, pure or loaded with α -ESA (in the concentration range from 0 to 30 mg/mL) were performed at 400 nm using a Shimadzu UV-2550 UV-vis spectrophotometer (Kyoto, JP).

3. Theory section – Instrumental techniques

FTIR is a suitable technique to study lipid membranes at the submolecular level [23, 24]. Horizontal attenuated total reflection FTIR (HATR-FTIR) has been used to study liposomes since it prevents membrane damage caused by the IR laser [23, 25]. In the case of phosphatidylcholine, the FTIR spectrum shows vibration bands which can be divided into three different regions corresponding to the polar, interfacial and hydrophobic moieties of the lipid [26]. Typical vibrations of covalently bonded atoms can be classified as “bending” and “stretching”. The latter involves changes in the bond lengths [27]. The main stretching bands related to phosphatidylcholine groups are: the phosphate antisymmetric stretching vibration ($\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$, 1260-1220 cm^{-1}) and the choline antisymmetric stretching vibrations ($\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$, $\sim 970 \text{ cm}^{-1}$ and $\nu_{\text{as}} \text{NCH}$, $\sim 3005 \text{ cm}^{-1}$) both located in the lipid polar region; the interfacial carbonyl stretching mode ($\nu \text{C}=\text{O}$, 1725-1740 cm^{-1}) and the symmetric and antisymmetric stretching vibrations of the hydrophobic acyl chains methylenes ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$, $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ and $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$, $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$) [21, 22].

The presence of an exogenous molecule incorporated into the membrane can induce changes in the lipid FTIR bands, such as shifts and bandwidth variations. These changes can provide information about physico-chemical processes taking place in the systems [28]. With respect to the lipid polar region, $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ is sensitive to hydration conditions. The frequency values usually decrease with increasing hydration [29]. Thus, if an exogenous molecule modifies the number and orientations of hydrogen bounded water molecules around this lipid head group, a shift in the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ frequency value must be observed in the FTIR spectrum. Variations of the bandwidth of specific lipid bands, such as $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$, give information about the system dynamics since the bandwidth is affected by rotational, translational and/or collisional effects [30]. As the membrane dynamics increases, an increase in lipid peaks bandwidth will be observed [31].

The analysis of $\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$ and $\nu_{\text{as}} \text{NCH}$ may reflect conformation changes of the choline group due to its separation from the phosphate region related to possible intercalation of water molecules between these two charged groups [32]. The choline group is associated with water by dipole interactions which can be affected by lipid-molecule interaction [29]. In this study, HATR-FTIR

information concerning the α -ESA influence on the choline group dynamics was complemented by ^1H NMR spin lattice relaxation time measurements (T_1), since the relaxation of ^1H occurs predominantly through dipolar interactions involving neighboring ^1H nuclei [33-35]. The T_1 is the time constant for the spin system to reach equilibrium with its surroundings [36]. Relaxation times are related to correlation time, which defines the time it takes for a molecule to reorient in a given membrane phase. Thus, T_1 measurements may provide dynamic information concerning membrane specific regions, which includes the influence of a molecule in lipid fast motions, such as rotation [37].

The hydration degree of the lipid interface region may be monitored by the analysis of HATR-FTIR carbonyl stretching vibration, since it is sensitive to the hydration state, polarity, degree and nature of the hydrogen bonding interactions in the lipid-water interface [29]. A decrease in the ν C=O frequency may mean the strengthening of existing hydrogen bonding or formation of new hydrogen bonding between the lipid and the interacting molecule [28, 38]. Variations related to carbonyl stretching bandwidth may reflect conformational changes in the membrane interfacial region. The ν C=O bandwidth increases as the motional freedom of this lipid region enhances [25].

The analysis of acyl chains methylenes HATR-FTIR bands is very useful to the study of physical properties of lipids, since they are sensitive to the hydrophobic chain conformation [39]. Shifts in the frequency values of ν_s CH₂ and ν_{as} CH₂ are related to the conversion from trans to gauche conformers [40]. Trans-gauche isomerization is included in the gel-to-liquid crystalline lipid phase transition, as well as in a series of intermediate states which consist of mixtures of lipid molecules in both gel and liquid crystalline conformations. These states may differ in the number of lipids in the available single lipid substrates and in their lateral arrangement in the lipid matrix [41]. Changes in ν_s CH₂ and ν_{as} CH₂ FTIR bandwidths reflect alterations in the motional freedom degree related to the lipid hydrophobic region [42]. The ν CH₂ bandwidth is also sensitive to the phase transition [30]. At more ordered phase states, such as the gel one, these bands are sharp and centered at lower frequency, indicating the predominance of immobile hydrocarbon chains [43]. As the phase state becomes more disordered, these bands broaden and their peak frequencies may increase by

values ranging from approximately 1.5 to 3 cm^{-1} for $\nu_s \text{CH}_2$ and from 2.5 to 5 cm^{-1} for $\nu_{as} \text{CH}_2$. These changes are related to the increasing mobility of the vibrating groups of the hydrocarbon chains [39]. The bandwidth is sensitive to the presence of gauche conformers, as well as to the restriction related to librational or torsional motion of the lipid chains [44].

The influence of exogenous molecules on lipid acyl chains thermodynamic behavior may also be monitored by differential scanning calorimetry (DSC). Acyl chains can undergo phase transitions at specific temperatures, depending on the structure of the lipid. Important information concerning the transitions and order related to the acyl chain assembly can be obtained by DSC, by measuring the enthalpy variation of the lipid transition (ΔH) [9, 45]. ΔH is related to the actual heat required for the entire transition, and can be calculated from the integration of the area under the DSC exothermic or endothermic transition peak. The enthalpy of a membrane is given by the time or spatial average over all available phase states. ΔH measurements enable information to be gotten on structural modifications which have occurred in lipid bilayers in the presence of an exogenous molecule [22, 46].

Lipid phase transitions can also be related to changes in the system turbidity. Lipid turbidity can be defined as its “apparent absorbance” and UV-visible spectrophotometers are advisable to investigate the possibilities of observing phase transitions of lipids. For example, a decrease in the optical density related to dipalmitoylphosphatidylcholine aqueous dispersion was observed at its phase transition temperature [47]. Therefore, this decrease in the lipid turbidity is related to the transition from ordered states to disordered ones.

4. Results and Discussion

4.1. α -ESA influence on *in vitro* lipid peroxidation of ASO liposomes

To determine the α -ESA influence on the membrane *in vitro* peroxidation, ASO liposomes, pure and loaded with the fatty acid, were submitted to oxidation induced by hydroxyl radical ($\bullet\text{OH}$) and the TBARS level was then determined.

Figure 3 shows the effect of increasing concentrations of α -ESA on the *in vitro* \bullet OH-induced peroxidation of ASO liposomes.

Figure 3

The TBARS quantities demonstrated in Figure 3 were generated by the \bullet OH peroxidation in ASO and are in agreement with previous studies which reported the levels of \bullet OH peroxidation in different kinds of membranes [48]. In Figure 3, one can observe that α -ESA seems to have a protective activity against the damage induced by \bullet OH in ASO liposomes. The α -ESA half inhibition concentration (IC_{50}) was reached in 15 mg/mL. At the concentration of 22.5 mg/mL, the fatty acid inhibited the \bullet OH-induced ASO peroxidation in approximately 77%. The α -ESA antioxidant activity corroborates with the effect reported by α -ESA in the lipid peroxidation levels of rat plasma, lipoprotein, erythrocyte membranes and non enzymatic liver tissue [4]. It is known that conjugated trienoic fatty acids, such as α -ESA, may scavenge free radicals, thereby eliminating or reducing the formation of hydroperoxides [4]. Furthermore, the oxidation of α -ESA may result in the formation of conjugated dienoic fatty acids that also act as antioxidants [49]. Since lipid peroxidation is also related to changes in membrane physico-chemical properties [5-8], our study aimed to investigate a possible relationship between the observed antioxidant effects of α -ESA and the influence of this fatty acid on the molecular dynamics of lipid membrane. Therefore, results of the α -ESA effects on ASO liposomes physico-chemical properties are presented below.

4.2. α -ESA effects on ASO liposome dynamics

Characterization of the effects caused by α -ESA on the ASO liposomes dynamical properties was performed by HATR-FTIR, NMR and DSC techniques. The instrumental measurements were performed in order to compare the behavior of pure liposomes to those loaded with the fatty acid. Thus, MLVs were employed to determine details of bilayer structures since their large size (near 2 μ m) makes structural analysis with techniques such as NMR more straightforward by comparison with smaller vesicles [16].

The HATR-FTIR spectra of ASO liposomes were obtained in order to understand the effects of different concentrations of α -ESA on specific lipid regions. Figure 4 shows the spectra which correspond to ASO liposomes pure and those containing α -ESA 30 mg/mL.

Figure 4

For pure ASO liposomes, the following vibrational peak frequencies were detected and analyzed: (a) $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ at 1217 cm^{-1} , (b) $\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$ at 974 cm^{-1} , (c) $\nu_{\text{as}} \text{NCH}$ at 3005 cm^{-1} (d) $\nu \text{C}=\text{O}$ at 1734 cm^{-1} , (e) $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ and $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ at 2853 cm^{-1} and 2924 cm^{-1} , respectively. These frequencies of stretching vibrations correspond to SPC groups, which represent 25% of the total lipid mixture contained in ASO [50]. The α -ESA influence on each of the SPC groups was studied by analyzing changes in the frequency values, as well as the bandwidth at $\frac{3}{4}$ of peak height position. Information obtained from HATR-FTIR essays were complemented by NMR and DSC data. All results were interpreted considering the effect of the fatty acid on the polar, interfacial and hydrophobic ASO regions.

4.2.1 α -ESA interaction with ASO polar head

It is known that phosphatidylcholine bilayers consist of an interlocking set of intermolecular electrostatic associations of the negatively charged phosphate with the positively charged choline groups of neighboring lipids. Thus, it is important to evaluate the α -ESA influence on the dynamics of these two lipid polar head groups since they play an important role in the maintenance of the bilayer configuration and the barrier properties [51]. In the spectra shown in Figure 4, all the frequency values of the groups related to pure ASO liposomes and ASO liposomes in the presence of α -ESA 30 mg/mL remain almost the same.

With respect to the α -ESA effect on the lipid polar region, Figure 5 shows a zoom of Figure 4 spectra in the region of $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ vibrations.

Figure 5

In both samples, corresponding to ASO liposomes pure and in the presence of α -ESA 30 mg/mL, the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ band shows a small shoulder at lower frequency. This is due to the hydrogen-bonded phosphate groups, a consequence of its weak hydrogen bonding interaction with the lipid choline region [52, 53]. As mentioned before, the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ band is useful to monitor the hydration state of the polar head groups of phospholipids [42]. An α -ESA-induced increase in the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ band frequency would indicate a dehydration of the phosphate group, while a decrease in the same frequency could correspond to the hydration of this region [40]. In this study, since no variation in the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ frequency was observed after lipid interaction with α -ESA, it can be concluded that the fatty acid does not cause changes in the quantities of hydrogen bonds among the lipid phosphate group and the hydrogen atoms of the α -ESA or water [54]. However, Figure 5 shows that α -ESA reduced the bandwidth of $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ bandwidth in approximately 2 cm^{-1} , suggesting that the fatty acid may cause a slight or indirect decrease in the phosphate group dynamics.

Changes induced by α -ESA in the intensity of the $\nu_{\text{as}} \text{CN}^+\text{C}$ band at 974 cm^{-1} , as well as its influence on $\nu_{\text{as}} \text{NCH}$ at 3005 cm^{-1} were also investigated. Figure 4 shows no α -ESA influence on the shape or frequency values related to the choline bands. These results are in agreement with the unchanged behavior of the $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ band in the presence of α -ESA, confirming that the fatty acid has no influence on the ASO polar head group hydration.

In order to obtain more information about the α -ESA effect on the polar head dynamics, NMR choline ^1H T_1 measurements were performed. Figure 6 shows ^1H T_1 curves related to the choline region of ASO liposomes pure and loaded with α -ESA 30 mg/mL.

Figure 6

The presence of α -ESA in the liposomes seems to increase the T_1 of SPC choline region from 0.3 s (value corresponding to pure ASO liposomes) to

0.5 s (value corresponding to ASO liposomes loaded with α -ESA). This difference of approximately 30 % may reflect a decrease in the choline motional freedom [35, 55]. Since the increase of T_1 is related to an increase in τ_c values, the α -ESA induced- change in choline behavior corroborates with an ordering effect in this lipid region. Thus, the findings concerning the lipid phosphate and choline groups, obtained by FTIR and NMR techniques, suggest that α -ESA causes a discrete ordering effect on ASO head region.

4.2.2 α -ESA influence on the ASO interfacial region

The α -ESA effects on the ASO interfacial region were studied by comparing the analysis of the HATR-FTIR ν C=O band in ASO liposomes, pure and in the presence of the fatty acid. As mentioned before, the ν C=O band is related to changes in its environment, such as hydrogen bonding or polarity [27]. The analysis of Figure 4 shows no changes in the ASO ν C=O frequency after interaction with α -ESA. Thus, these results suggest that there is no hydrogen bond between the fatty acid and the ASO carbonyl group. Variations in ν C=O bandwidth as a result of increasing α -ESA concentrations are shown in Figure 7.

Figure 7

In Figure 7, one can observe that increasing concentrations of α -ESA reduced the ν C=O bandwidth values slightly. At 30 mg/mL, the fatty acid seems to be responsible for a reduction in the ν C=O bandwidth, from 15 cm^{-1} to 13.3 cm^{-1} , which corresponds to 11% of the value related to pure ASO liposomes.

The broadness of the ν C=O band seems to be attributable to the absorptions of carbonyl ester located in sn-1 and sn-2 chain, which are not equivalent [56]. A sharp ν C=O band can be attributed to the existence of highly immobilized ester carbonyl groups in the lipid chains. For lipids, it is known that the conversion of liquid crystalline states to the gel phase coincides with a change from a broader to a narrower ν C=O band [57, 58]. In our study, it may

suggest that an ordering effect of α -ESA occurs not only at the polar region but also affects the interfacial region of ASO membranes.

It is worth mentioning that, at physiological pH (7.4), the carboxyl group of lipids and fatty acids may be partially unprotonated, generating a molecular negative charge [59]. Thus, a dipolar interaction between the α -ESA carboxyl group and the phosphatidylcholine choline region may be reflected in changes related to the lipid choline T_1 value, as reported in this study by NMR results. This interaction may be responsible for an increase in the lipid choline region order. As a consequence of the dipolar interaction between the lipid choline and the α -ESA carboxyl group, the order of the lipid polar and interfacial regions may also be affected. It corroborates with the slighter α -ESA ordering effect observed in lipid phosphate and carbonyl groups by the HATR-FTIR technique.

4.2.3. α -ESA effects on ASO acyl chain methylenes

In Figure 4, one can observe that no shifts in the HATR-FTIR frequencies values of ASO methylene stretching bands were induced by α -ESA. As mentioned before, changes in ν_s CH₂ and ν_{as} CH₂ band frequencies may reflect the average trans-gauche isomerization in the lipid system [28]. Thus, α -ESA does not seem to influence the trans-gauche isomerization of the lipid system.

The influence of increasing concentrations of α -ESA on the bandwidth of ASO acyl chains methylenes stretching bands was also investigated (Figure 8).

Figure 8

In Figure 8, one can observe that α -ESA was responsible for the broadening of ν_s CH₂, in a concentration-dependent manner. After the incorporation of α -ESA 30 mg/mL, the ν_s CH₂ bandwidth broadened from 18.6 cm⁻¹ to 21 cm⁻¹. This α -ESA-induced variation of 2.4 cm⁻¹ in the ν_s CH₂ bandwidth corresponds to a broadening of approximately 13%, which is included in the range of values expected for a disordering effect on the liposomal system [39]. As no shifts in acyl chains CH₂ stretching were

observed, the increase in CH₂ mobility promoted by α -ESA may not have been related to a conversion from trans to gauche conformers [40].

DSC experiments were performed in order to determine the α -ESA influence on the ASO liposomes phase transition and order. From DSC curves (data not shown), an endothermic transition in the negative range from -40 to -18° C was observed. This range corresponds to the typical negative range of fully hydrated unsaturated phosphatidylcholine, including those containing oleic acids in their hydrophobic region (note that Figure 2 shows that it is one of the fatty acids present in SPC) [60]. From this transition, the enthalpy variation (ΔH) values related to ASO liposomes, in the absence and in the presence of α -ESA, were obtained. These results are shown in Table 1.

Table 1

The analysis of Table 1 indicates that α -ESA reduces the ASO ΔH value in approximately 53%. Thus, the fatty acid may promote a SPC molecular rearrangement to a more disordered state, which corroborates with the FTIR findings. The disordering effect caused by α -ESA on phospholipid membranes may be attributed to the location of the fatty acid *cis* double bond [61]. The α -ESA *cis* double bond has a typical “kinked” conformation which can affect the packing of the hydrophobic region of the phosphatidylcholine membrane. Subbayah and co-workers [62] observed a fluidizing effect for dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes after the insertion of phosphatidylcholine molecules containing *cis9-trans11* conjugated linoleic acid in one of its acyl chain. These authors also reported that the conjugation of double bounds has a strong influence on the physical structure of the fatty acid and that it is an important factor associated to the membrane fluidizing effect.

4.2.4. Turbidity measurements. The global effect of α -ESA on ASO liposomes was investigated by turbidity studies at 400 nm. Figure 9 shows the influence of different α -ESA concentrations on the liposomes turbidity.

Figure 9

A reduction corresponding to 20% of the initial ASO turbidity value was observed after the incorporation of α -ESA 30 mg/mL into the membrane. The reduction in the absorbance values is related to a decrease in aggregation and fusion of the vesicles; it implies in the reduction of the particle size [38, 63]. The reduction of membrane turbidity can also be observed in gel to liquid-crystalline phase transitions, mainly due to changes in the lipids refractive index as a consequence of variations in lipid density during melting [47]. Thus, α -ESA seems to have a global effect related to the increase of the ASO liposomes fluidity.

Turbidity results are supported by our FTIR, NMR and DSC studies. The ordering effect caused by interaction of the unsaturated fatty acids with phosphatidylcholine polar head, as well as the influence of its *cis*-double bond in lipid acyl chains, may leads to a transition from the phosphatidylcholine typical cylindrical shape to a “cone” shaped lipid complex where the polar headgroup region has a smaller area than the hydrophobic region. It may destabilize the bilayer configuration, enhancing the membrane permeability [61, 64].

5. Conclusion

Previous studies reported that membrane lipid peroxidation levels are influenced by the charge and diffusion of the reactive species, the membrane fatty acid unsaturated bonds content and order, as well as the intrinsic properties of antioxidant compounds in the system [48, 65, 66]. \bullet OH is the most reactive among reactive oxygen species and its biological importance was discussed by other authors [65, 67]. The lipid mobility can create conditions for mutual accessibility among the reactive species and the antioxidant compound [68]. Antioxidant intrinsic properties include its chemical reactivity and its distribution between the hydrophilic and hydrophobic lipid regions. In ASO liposomes, the ordering effect promoted by α -ESA in the lipid polar head may restrict the \bullet OH diffusion toward this region of the membrane. The influence of membrane packing on reactive species diffusion is also related by Khairutdinov and co-workers for peroxynitrite [65]. On the other hand, the α -ESA disordering effect on phosphatidylcholine membranes, attributed to its *cis* double bound,

may facilitate the interactions between the $\cdot\text{OH}$ and α -ESA. It may provide a more efficient antioxidant activity of α -ESA. The relationship among the lipid peroxidation levels and the order of specific regions of the membrane was previously reported to other antioxidant molecules, such as melatonin and alpha tocopherol [35, 68]. Besides the α -ESA scavenging properties, the effect of α -ESA on the asolectin membrane dynamics may contribute as an antioxidant secondary mechanism against the damage caused by reactive species.

Findings described in this study can contribute to get a broader view of the α -ESA biological activity which can be useful to the development of new strategies for lipid peroxidation-related disease therapy.

6. Acknowledgments

The authors would like to thank the Brazilian agencies Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support. This paper is part of Robson Simplicio de Sousa's Master's studies at the Post-graduation Program in Technological and Environmental Chemistry, The authors are also indebted to professor Daniela Bianchini, Ph.D., from Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, RS, Brazil, for DSC measurements.

7. References

- [1] Y. Fang, The polymerization of α -eleostearic acid in the dipalmitoylphosphatidylcholine- α -eleostearic acid liposome, *Chin. J. Polym. Sci.* 4 (1987) 346-352.
- [2] T. Tsuzuki, Y. Tokuyama, M. Igarashi, T. Miyazawa, [Tumor growth suppression by \$\alpha\$ -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation, *Carcinogenesis* 25 \(2004\) 1417-1425.](#)
- [3] H. Moon, D. Guo, H. Lee, Y. Choi, J. Kang, K. Jo, J. Eom, C. Yun, C. Cho, [Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPARc and inhibition of ERK 1/2, *Cancer Sci.* 101 \(2010\) 396-402.](#)
- [4] P. Dhar, S. Ghosh, D.K. Bhattacharyya, [Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid \(9 cis, 11 trans, 13 trans\) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats, *Lipids* 34 \(1999\) 109-114.](#)

- [5] A.D. Petrescu, A.M. Gallegos, Y. Okamura, J.F. Strauss3rd, F. Schroeder, Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36970-36982.
- [6] M. Kunimoto, K. Inoue, S. Nojima, Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 646 (1981) 169-178.
- [7] [S.P. Verma, Low levels of irradiation modify lipid domains in model membranes: a laser Raman study, *Radiat. Res.* 107 \(1986\) 183-193.](#)
- [8] [R.F. Jacob, R.P. Mason, Lipid peroxidation induces cholesterol domain formation in model membranes, *J. Biol. Chem.* 280 \(2005\) 39380-39386.](#)
- [9] V.R. De Lima, M.S.B. Caro, M.L. Munford, B. Desbat, E.J. Dufourc, A. Pasa, T.B. Creczynski-Pasa, Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine based membranes, *J. Pineal Res.* 49 (2010) 169-175.
- [10] A. Saija, F. Bonina, D. Trombetta, A. Tomaino, L. Montenegro, P. Smeriglio, F. Castelli, Flavonoid-biomembrane interactions: a calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Int. J. Pharm.* 124 (1995) 1-8.
- [11] J. Londoño-Londoño, V.R. De Lima, C. Jaramillo, T. Creczynski-Pasa, Hesperidin and hesperitin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids, *Arch. Biochem. Biophys.* 499 (2010) 6-16.
- [12] [A.M. Samuni, A. Lipman, Y. Barenholz, Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration, *Chem. Phys. Lipids* 105 \(2000\) 121-134.](#)
- [13] [F. Castelli, D. Trombetta, A. Tomaino, F. Bonina, G. Romeo, N. Uccella, A. Saija, Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 37 \(1997\) 135-141.](#)
- [14] [A.W. Thomas, J.C. Thomson, The preparation of pure eleostearic acids from chinese wood oil, *J. Am. Chem. Soc.* 56 \(1934\) 898.](#)
- [15] M. Zhang, Y. Cao, R. Huang, Primary study on purification of eleostearic acid, *Biomass Chem. Eng.* 41 (2007) 35-37.
- [16] [M.J. Hope, M.B. Bally, L.D. Mayer, A.S. Janoff, P.R. Cullis, Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles, *Chem. Phys. Lipids* 40 \(1986\) 89-107.](#)
- [17] [A.G. Tempone, R.A. Mortara, H.F. De Andrade Jr, J.Q. Reimão, Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis, *Int. J. Antimicrob. Agents* 36 \(2010\) 159-163.](#)

- [18] [B. Halliwell, M.C. Gutteridge, O.I. Aruoma, The deoxyribose method: a simple test-tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, Anal. Biochem. 165 \(1987\) 215–219.](#)
- [19] [H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. 95 \(1979\) 351-358.](#)
- [20] [R.P. Bird, A.H. Draper, Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination, Methods Enzymol. 105 \(1984\) 295–305.](#)
- [21] [M. Hereć, A. Islamov, A. Kuklin, M. Gagoś, W.I. Gruszecki, Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine, Chem. Phys. Lipids 147 \(2007\) 78-86.](#)
- [22] [M. Manrique-Moreno, J. Howe, M. Suwalsky, P. Garidel, K. Brandenburg, Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes, Lett. Drug Des. Discovery 7 \(2010\) 50-56.](#)
- [23] [L.K. Tamm, S.A.Q. Tatulian, Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers, Rev. Biophys. J. 30 \(1997\) 365-429.](#)
- [24] [S.A. Tatulian, Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids, Biochemistry 42 \(2003\) 11898-11907.](#)
- [25] [Z. Arsov, L. Quaroni, Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy, Chem. Phys. Lipids 150 \(2007\) 35-48.](#)
- [26] [H.H. Mantsch, R.N. McElhaney, Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy, Chem. Phys. Lipids 57 \(1991\) 213–226.](#)
- [27] [J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi, Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes, Chem. Phys. Lipids 96 \(1998\) 53-68.](#)
- [28] [F. Severcan, I. Sahin, N. Kazanci, Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes- evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, Biochim. Biophys. Acta 1668 \(2005\) 215-222.](#)
- [29] [M. Manrique-Moreno, P. Garidel, M. Suwalsky, J. Howe, K. Brandenburg, The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids, Biochim. Biophys. Acta 1788 \(2009\) 1296–1303.](#)

- [30] [D.C. Lee, D. Chapman, Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes, Biosci. Rep. 6 \(1986\) 235-256.](#)
- [31] [N. Toyran, F. Severcan, Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model membranes: an FTIR study, J. Mol. Struct. 123 \(2003\) 165-176.](#)
- [32] [J. Grdadolnik, J. Kidric, D. Hadzi, Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles multilayers an infrared spectroscopic study, Chem. Phys. Lipids 59 \(1991\) 57-68.](#)
- [33] [P.A. Kroon, M. Kainosho, S.I. Chan, Proton magnetic resonance studies of lipid bilayer membranes experimental determination of inter- and intramolecular nuclear relaxation rates in sonicated phosphatidylcholine bilayer vesicles, Biochim. Biophys. Acta 433 \(1976\) 282–293.](#)
- [34] [M.F. Brown, Theory of spin-lattice relaxation in lipid bilayers and biological membranes. Dipolar relaxation, J. Chem. Phys. 80 \(1984\) 2808–2831.](#)
- [35] [V.R. De Lima, M.S.B. Caro, M.I.B. Tavares, T.B. Creczynski-Pasa, Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms, J. Pineal Res. 43 \(2007\) 276-282.](#)
- [36] [M. Bloom, J. Thewalt, Spectroscopic determination of lipid dynamics in membranes, Chem. Phys. Lipids 73 \(1994\) 27-38.](#)
- [37] [E.J. Dufourc, Solid-state NMR in biomembranes, in: B. Larijani, C. Rosser, R. Woscholski \(Eds.\), Chemical Biology: Applications and Techniques, John Wiley & Sons, London, 2006, pp. 113-131.](#)
- [38] [F. Korkmaz, F. Severcan, Effect of progesterone on DPPC membrane: evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics, Arch. Biochem. Biophys. 440 \(2005\) 141-147.](#)
- [39] [D.A. Mannoock, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes, Biochim. Biophys. Acta 1798 \(2010\) 376-388.](#)
- [40] [H.L. Casal, H.H. Mantsch, H. Hauser, Infrared and ³¹P-NMR studies of the interaction of Mg²⁺ with phosphatidylserines: effect of hydrocarbon chain unsaturation, Biochim. Biophys. Acta 982 \(1989\) 228-236.](#)
- [41] [W.W.V. Osdol, R.L. Biltonen, M.L. Johnson, Measuring the kinetics of membrane phase transitions, J. Biochem. Biophys. Methods 20 \(1989\) 1-46.](#)
- [42] [F. López-García, V. Micol, J. Villalaín, J.C. Gómez-Fernández, Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in the presence of calcium, Biochim. Biophys. Acta 1169 \(1993\) 264-272.](#)

- [43] [R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhane, The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy, Chem. Phys. Lipids 96 \(1998\) 9–21.](#)
- [44] [H.L. Casal, D.G. Cameron, I.C.P. Smith, H.H. Mantsch, *Acholeplasma laidlawii* membranes: a Fourier transform infrared study of the influence of protein on lipid organization and dynamics, Biochemistry 19 \(1980\) 444-451.](#)
- [45] [R.L. Biltonen, D. Lichtenberg, The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations, Chem. Phys. Lipids 64 \(1993\) 129-142.](#)
- [46] [G.M.M. El Maghraby, A.C. Williams, B.W. Barry, Drug interactions and locations in liposomes: correlation with polar surface areas, Int. J. Pharm. 292 \(2005\) 179–185.](#)
- [47] [P.N. Yi, R.C. MacDonald, Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine, Chem. Phys. Lipids 11 \(1973\) 114–134.](#)
- [48] [V.R. De Lima, M.P. Morfim, A. Teixeira, T.B. Creczynski-Pasa, Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants, Chem. Phys. Lipids 132 \(2004\) 197-208.](#)
- [49] [M.A. Belury, Conjugated dienoic linoleate: a polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties, Nutr. Rev. 53 \(1995\) 83-89.](#)
- [50] [W. Zhang, H. He, Y. Feng, S. Da, Separation and purification of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from soybean degummed oil residues by using solvent extraction and column chromatography, J. Chromatogr. B 798 \(2003\) 323-331.](#)
- [51] P.L. Yeagle, R.B. Martin, Membrane Transport Processes, Raven Press, New York, 1978.
- [52] [K. Cieslik-Boczula, J. Szwed, A. Jaszczyszyn, K. Gasiorowski, A. Koll, Interactions of dihydrochloride fluphenazine with DPPC liposomes: ATR-IR and ³¹P NMR studies, J. Phys. Chem. B 113 \(2009\) 15495-15502.](#)
- [53] [S. Banerjee, T.K. Pal, S.K. Guha, Probing molecular interactions of poly \(styrene-co-maleic acid\) with lipid matrix models to interpret the therapeutic potential of the co-polymer, Biochim. Biophys. Acta 1818 \(2012\) 537-550.](#)
- [54] [L. Kan-Zhi, M. Jackson, M.G. Sowa, J. Haisong, I.M.C. Dixon, H.H. Mantsch, Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta 1315 \(1996\) 73-77.](#)
- [55] [L.S. Lepore, J.F. Ellena, D.S. Cafiso, Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles, Biophys. J. 61 \(1992\) 767-775.](#)

- [56] P.T.T. Wong, H.H. Mantsch, High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1,2-diacylphospholipids, *Chem. Phys. Lipids* 46 (1988) 213-224.
- [57] R.N.A.H. Lewis, D.A. Mannoek, R.N. McElhane, P.T.T. Wong, H.H. Mantsch, Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphism of 1,2-di-O-acyl-3-O (b-D-glucopyranosyl)-sn-glycerols, *Biochemistry* 29 (1990) 8933-8943.
- [58] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhane, Vibrational spectroscopy of lipids, in: J. M. Chalmers, P. R. Griffiths (Eds.), *The Handbook of Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 2002, pp. 3447–3464.
- [59] J.B. Massey, Interfacial properties of phosphatidylcholine bilayers containing vitamin E derivatives, *Chem. Phys. Lipids* 109 (2001) 157-174.
- [60] D.V. Lynch, P.L. Steponkus, Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury, *Biochim. Biophys. Acta* 984 (1989) 267-272.
- [61] G. Zhao, P.V. Subbaiah, S.W. Chiu, E. Jakobsson, H.L. Scott, Conjugated double bonds in lipid bilayers: a molecular dynamics simulation study, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 251-257.
- [62] P.V. Subbaiah, D. Sircar, B. Aizezi, E. Mintzer, Differential effects of conjugated linoleic acid isomers on the biophysical and biochemical properties of model membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1798 (2010) 506-514.
- [63] N. Kazancı, F. Severcan, F. Zorlu, Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations, *Biosci. Rep.* 20 (2000) 177–184.
- [64] N. Muranushi, N. Takagi, S. Muranishi, H. Sezaki, Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer, *Chem. Phys. Lipids* 28 (1981) 269-279.
- [65] R.F. Khairutdinov, J.W. Coddington, J.K. Hurst, Permeation of phospholipid membranes by peroxytrite, *Biochemistry* 39 (2000) 14238–14249.
- [66] V.E. Kagan, E.A. Serbinova, R.A. Bakarova, T.S. Stoytchev, A.N. Erin, L.L. Prilipko, R.P. Evstigneeva, Mechanisms of stabilization of biomembranes by alpha-tocopherol: the role of the hydrocarbon chain in the inhibition of lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.* 40 (1990) 2403-2413.
- [67] S.I. Liochev, I. Fridovich, The Haber-Weiss cycle- 70 years later: an alternative view, *Redox. Rep.* 7 (2002) 55-56.
- [68] E. Serbinova, V. Kagan, D. Han, L. Packer, Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol., *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 263–275.

Figure Captions

Figure 1. Structure of α -eleostearic acid (α -ESA, 9Z11E13E octadecatrienoic acid).

Figure 2. Structure of soybean phosphatidylcholine (SPC). R or R' = oleic (18:1), linoleic (18:2) or linolenic (18:3) acid.

Figure 3. Variation of total lipid peroxidation induced by hydroxyl radical (\bullet OH) as a function of increasing concentrations of α -eleostearic acid (α -ESA) incorporated into asolectin (ASO) liposomes. Results were obtained by TBARS method and shown as mean \pm S.D. of triplicates from three independent experiments.

Figure 4. FTIR spectra of asolectin (ASO) liposomes pure and in the presence of α -eleostearic acid 30 mg/mL (ASO+ α -ESA). Interferograms were obtained from the average of 50 scans, with a resolution of 2 cm^{-1} , in a frequency range of $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Figure 5. Zoom of the FTIR spectra of asolectin (ASO) liposomes, pure and in the presence of α -eleostearic acid 30 mg/mL (ASO+ α -ESA), in the asymmetric phosphate stretching region ($\nu_{\text{as}}\text{ PO}_2^-$). The zoom was obtained from the full spectra shown in Figure 4. Interferograms were obtained from the average of 50 scans, with a resolution of 2 cm^{-1} in a frequency range of $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Figure 6. Asolectin choline proton spin lattice relaxation times ($^1\text{H T}_1$) in the absence (ASO, open squares) and in the presence of α -eleostearic acid 30 mg/mL (ASO + α -ESA, open circles). The $^1\text{H T}_1$ data were reached at 60 MHz, 23°C , using a τ range of 0.2-102.4 s.

Figure 7. Bandwidth variations related to asolectin (ASO) carbonyl stretching vibration ($\nu\text{ C=O}$) after interaction with different concentrations of α -eleostearic acid (α -ESA). The curve was obtained from HATR-FTIR interferograms, which

were averaged for 50 scans at 2 cm^{-1} resolution, in frequencies ranging from 400 to 4000 cm^{-1} .

Figure 8. Effect of different concentrations of α -eleostearic acid (α -ESA) on the bandwidths of acyl chains methylenes symmetric stretching vibrations ($\nu_s\text{ CH}_2$) of asolectin (ASO) liposomes. The curve was obtained from HATR-FTIR interferograms averaged for 50 scans at 2 cm^{-1} resolution, with frequencies ranging from 400 to 4000 cm^{-1} .

Figure 9. Turbidity changes for asolectin (ASO) liposomes after interaction with different concentrations of α -eleostearic acid (α -ESA). The optical density values were obtained at 400 nm by a UV-visible spectrophotometer.

Table**Table 1.** Influence of α -eleostearic acid (α -ESA) 30 mg/mL on asolectin (ASO) enthalpy variation (ΔH) values^a.

Membrane system	ΔH (J/g)
ASO	1.97
ASO + α -ESA	0.92
$\Delta\Delta H$	1.05

^a ΔH of ASO liposomes, pure or loaded with α -eleostearic acid (ASO + α -ESA), were calculated from DSC thermograms.

Figure1

[Click here to download high resolution image](#)

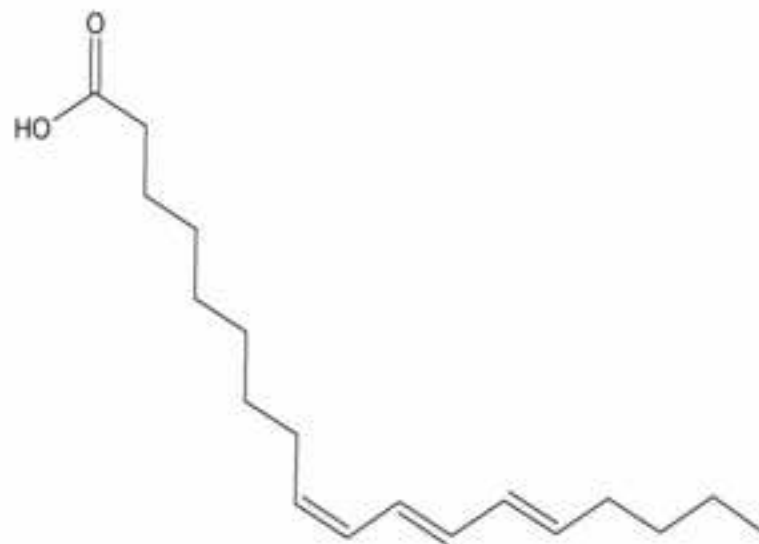


Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

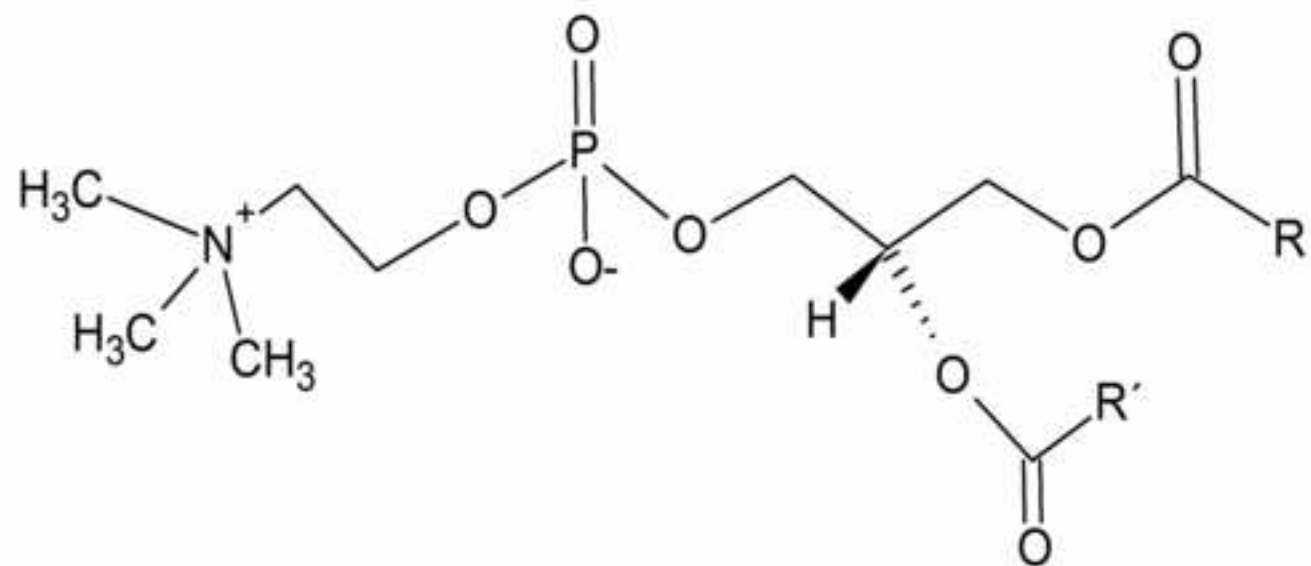


Figure3

[Click here to download high resolution image](#)

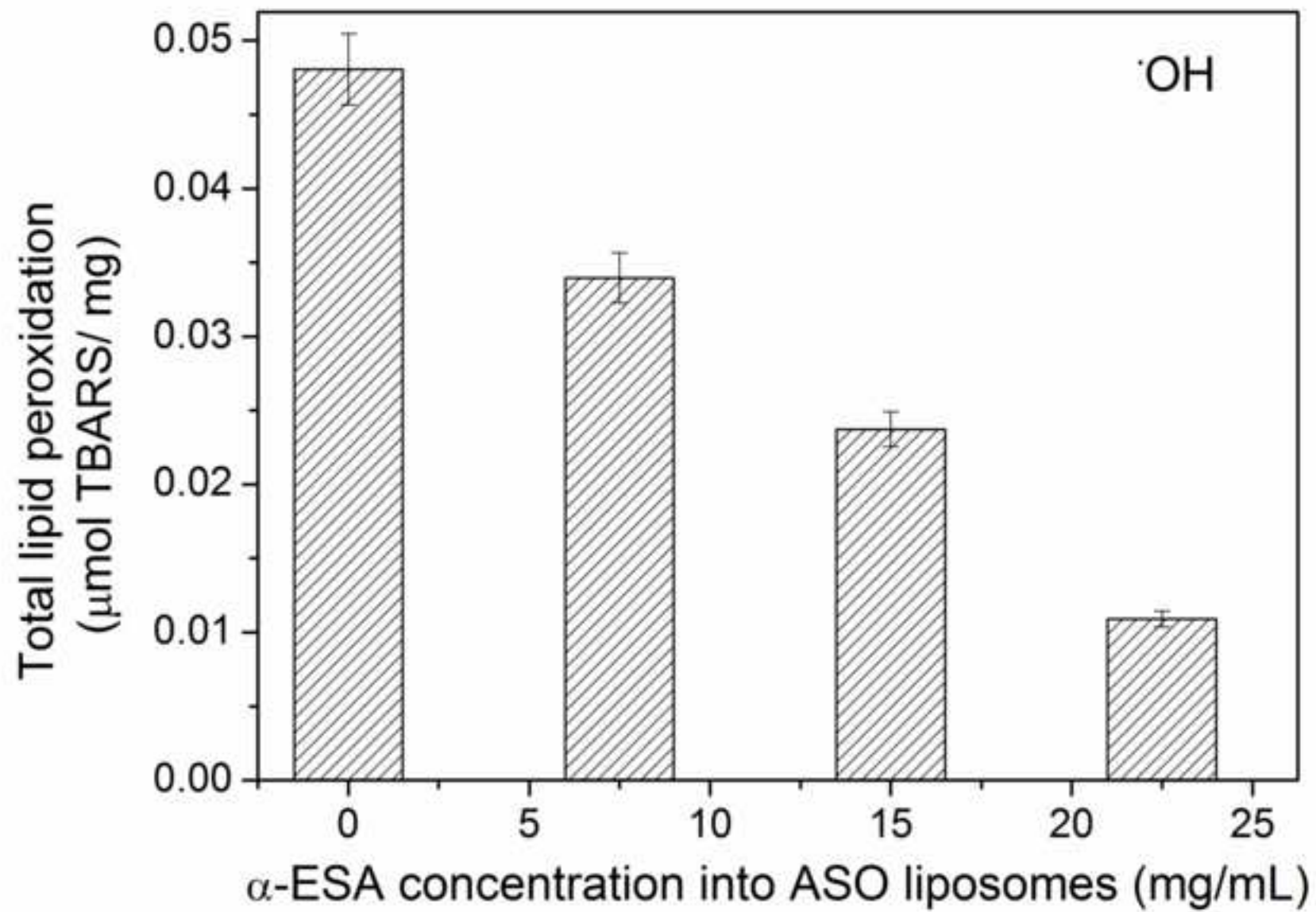


Figure4

[Click here to download high resolution image](#)

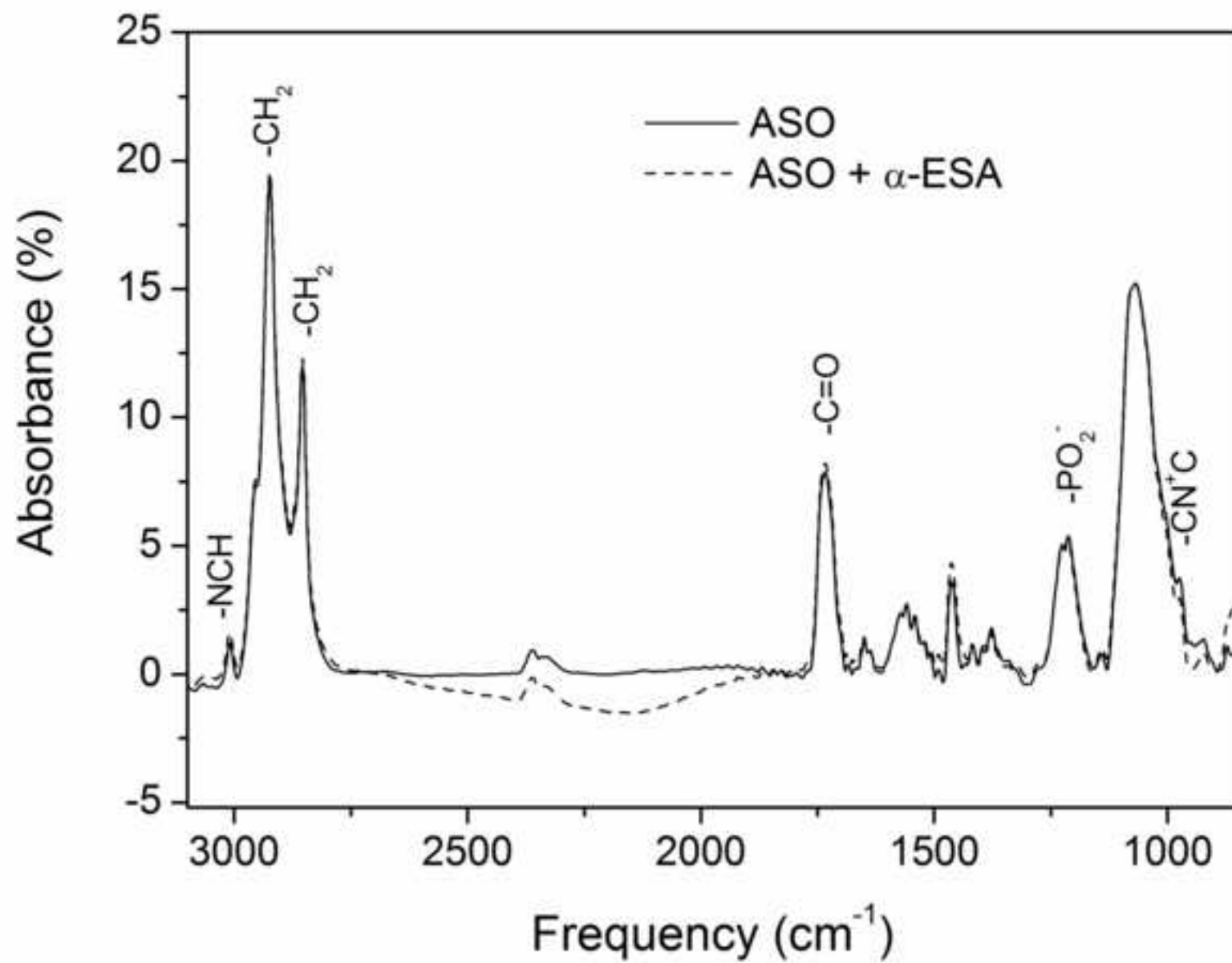


Figure5

[Click here to download high resolution image](#)

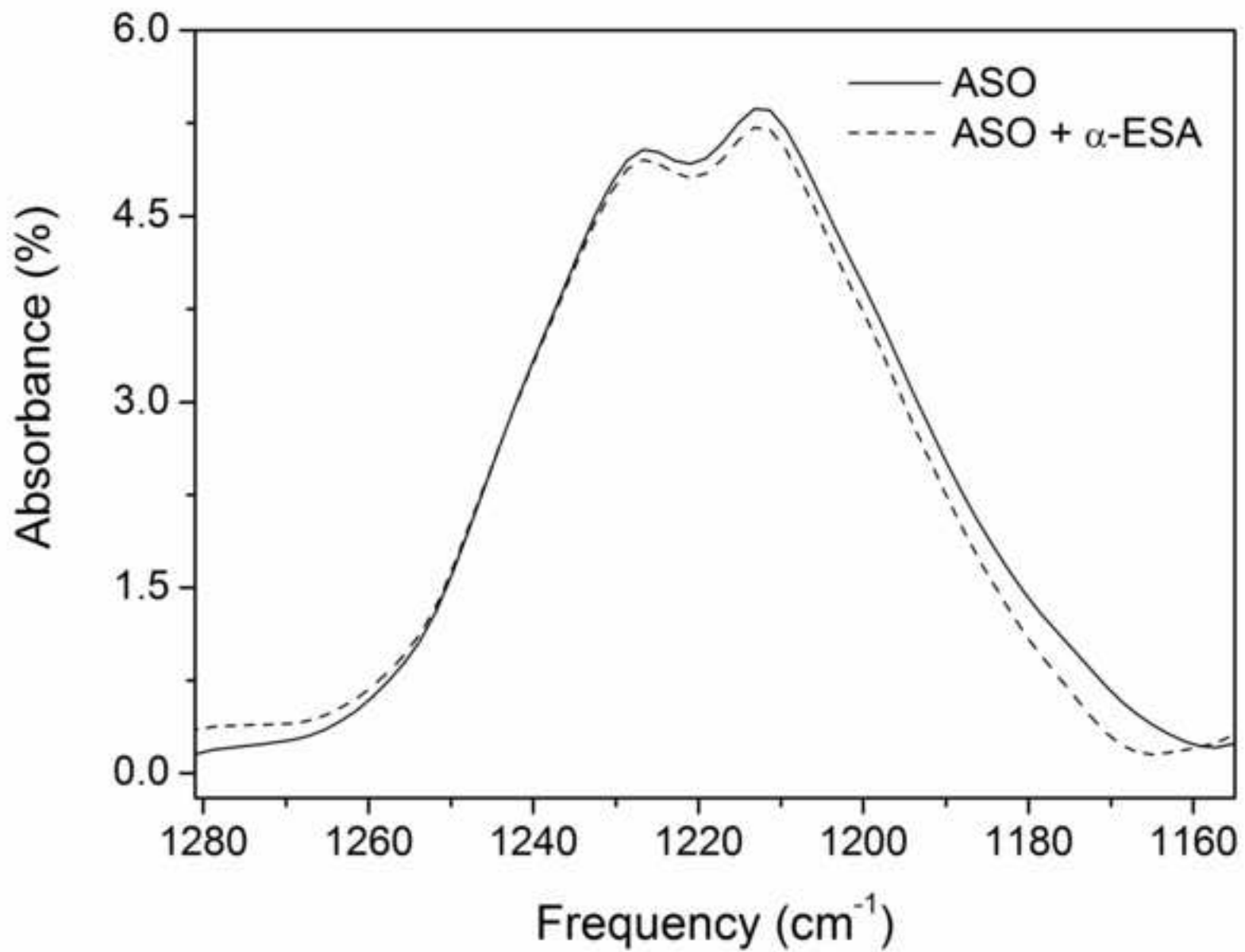


Figure6
[Click here to download high resolution image](#)

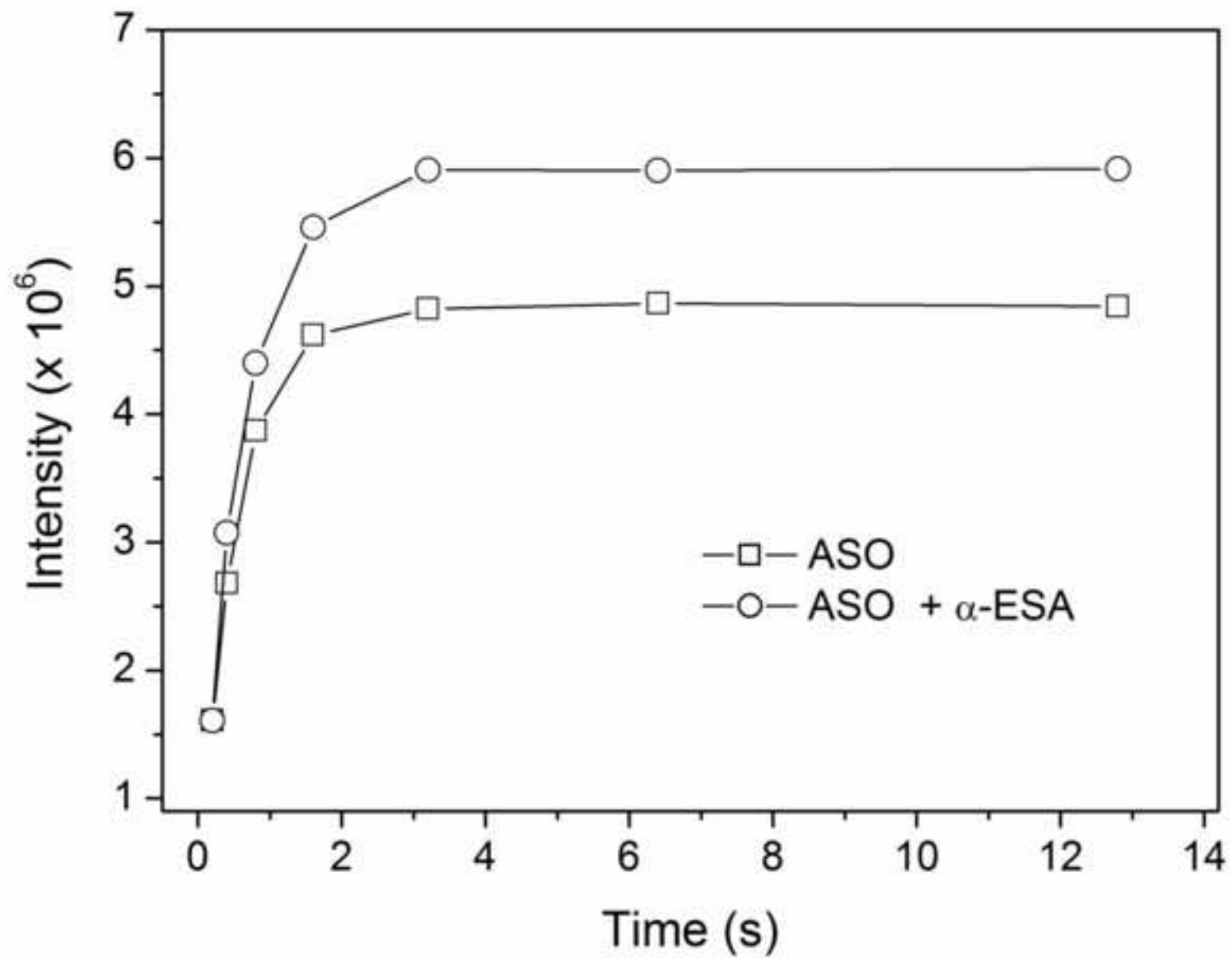


Figure7

[Click here to download high resolution image](#)

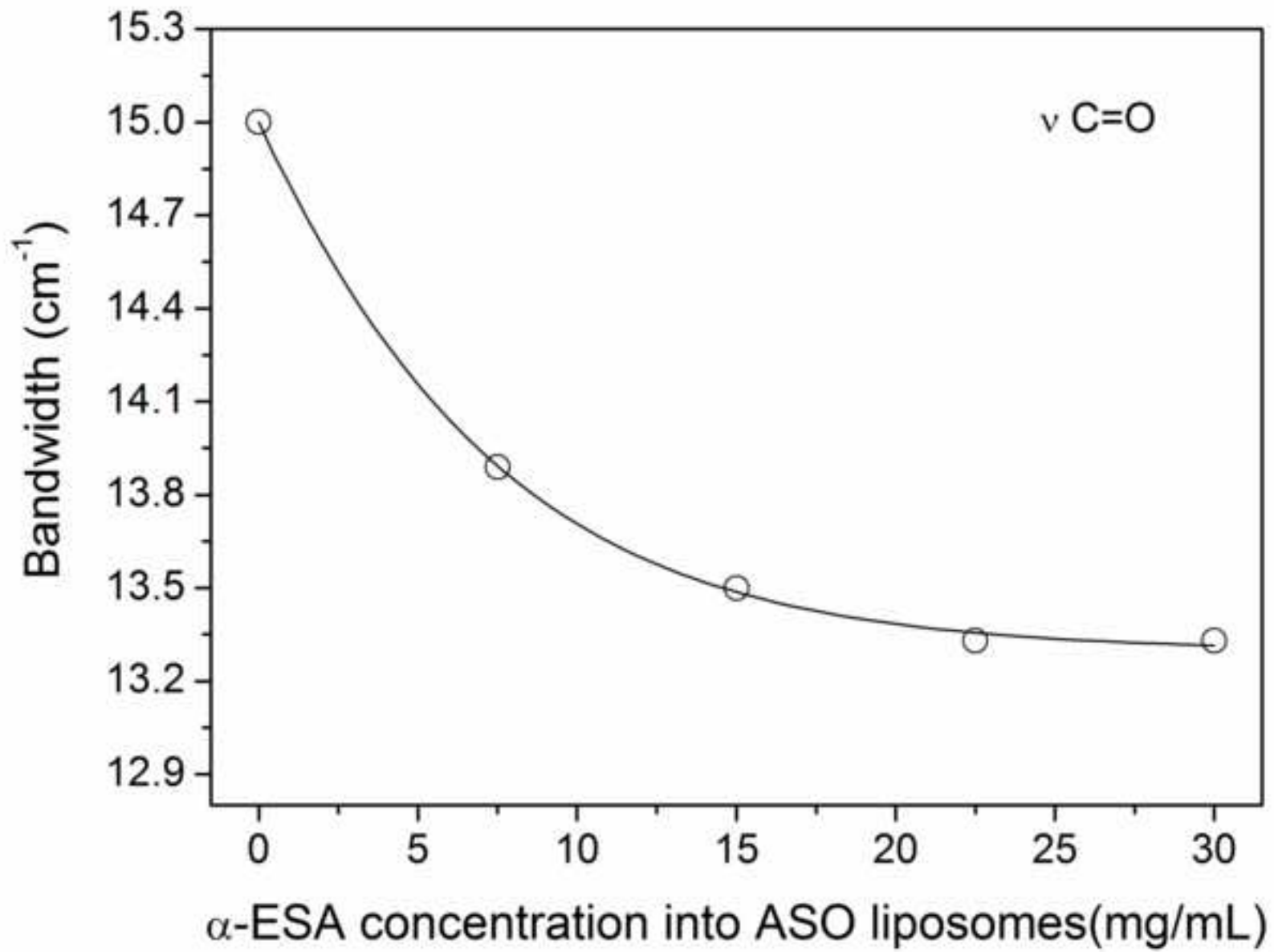


Figure8

[Click here to download high resolution image](#)

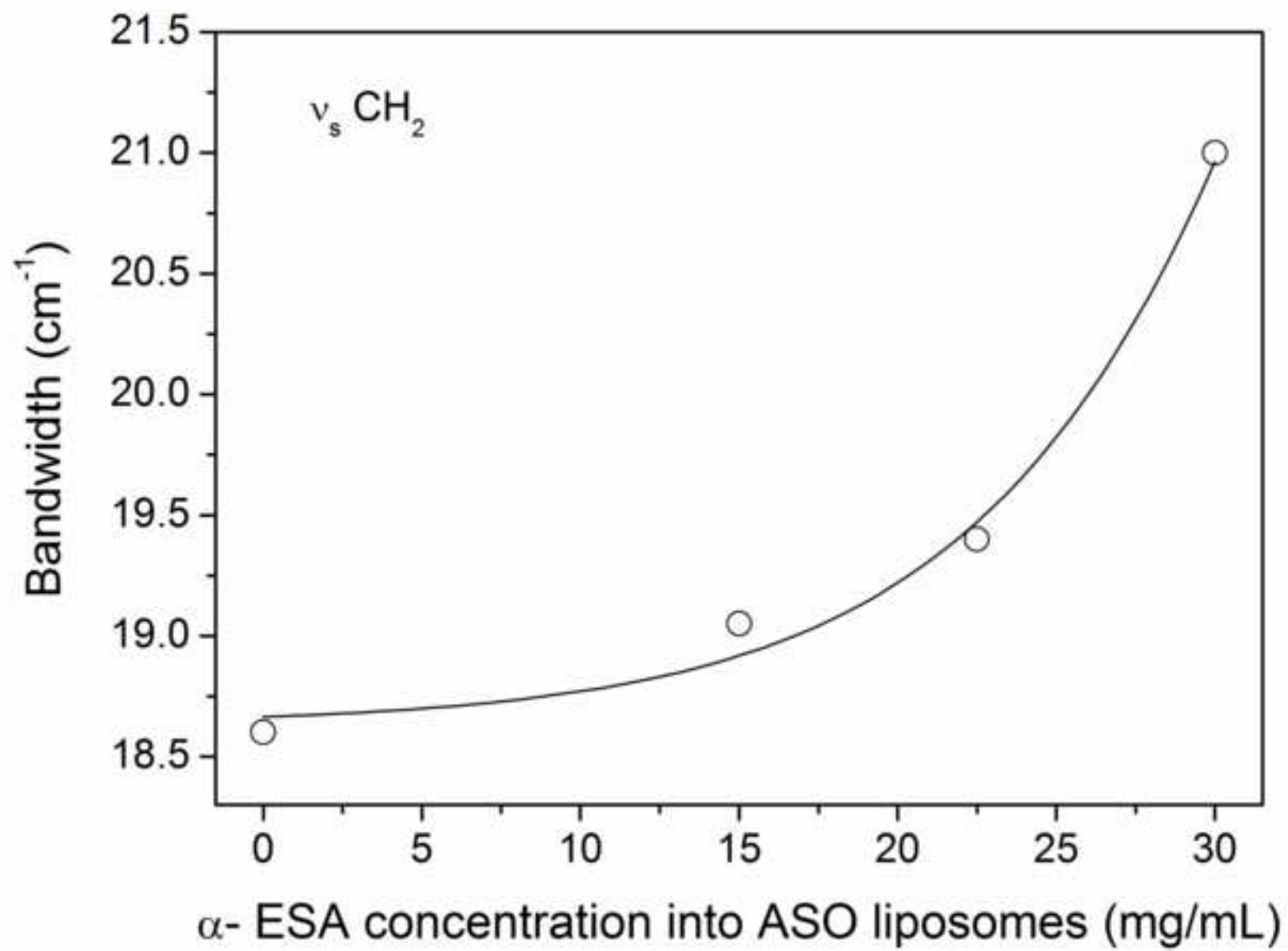


Figure9

[Click here to download high resolution image](#)

